

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

Limonium brasiliense (BOISS.) KUNTZE, *Plumbaginaceae*
(BAICURU): DESENVOLVIMENTO GALÊNICO DE EXTRATOS

Dissertação apresentada por
MARA LANE CARVALHO CARDOSO
para obtenção do Grau Acadê-
mico de Mestre em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. PEDRO ROS PETROVICK

PORTO ALEGRE - 1990

Dissertação apresentada e aprovada em 20 de abril de 1990,
perante banca constituída dos professores:

Drª Amélia Terezinha Henriques

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dr. Nicolai Sharapin

Universidade Estadual de Campinas

Dr. Pedro Ros Petrovick - Orientador

Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

C 268

CARDOSO, Mara Lane Carvalho

Limonium brasiliense (Boiss.) Kuntze, *Plumbaginaceae* (Baicuru): desenvolvimento galênico de extratos. - Porto Alegre : 1990. - 101p.

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

1. Tecnologia farmacêutica: fitoterápicos.

I. TÍTULO

CDU: 615.322:582.919

Índices para catálogo sistemático:

615.4 Tecnologia Farmacêutica

547.9 Produtos Naturais

615.322 Farmacognosia

À
Minha mãe, Marisa
Meu esposo, Luiz
Minhas filhas,
Fernanda e Camila.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Pedro Ros Petrovick, pela orientação, dedicação, paciência e amizade durante o decorrer do presente trabalho.

A todos os professores deste curso, em especial, professor Eloir Paulo Schenkel, pela grande ajuda e incentivo.

Ao Prof. Mario Junges, pela matéria-prima utilizada no presente trabalho.

Ao professor e amigo George Ortega, pelo incentivo em realizar este curso, e a grande ajuda prestada no decorrer do mesmo.

Aos professores do DFF da UEM, pela permissão do afastamento para a realização da parte experimental.

Às amigas, Cynara, Veronice e Marli pelos anos de convivência.

Aos mais que amigos e colegas, Profª Selma Lucy Franco e João Carlos Palazzo de Mello pelo incentivo, amizade, sinceridade nos momentos difíceis no decorrer destes anos de convivência.

Meus sinceros agradecimentos aos Prof. Luiz Carlos Marques (UEM) e Edna Scramin (UFMS), pela grande ajuda prestada na realização da caracterização microscópica do baicuru.

Aos colegas de curso, Karla, Lauren, Vitor Alberto, Silvia, Miriam, Diva, Luciana e todos aqueles com quem tive a oportunidade de conviver até a conclusão deste trabalho, pela amiza-

de e compreensão.

Aos meus familiares, em especial meus tios Elvio e Arlete pelo carinho, amizade e compreensão nas horas difíceis.

À CAPES e CNPq, pela concessão das bolsas de estudo.

A todos, que, mesmo não tenham sido citados, não serão esquecidos, pela colaboração na realização deste trabalho.

RESUMO

Para se conseguir fitoterápicos com qualidade precisa-se avaliar as diversas etapas de sua obtenção, analisar a da matéria-prima até a obtenção do produto acabado.

Seguindo esta premissa foi desenvolvida uma preparação farmacêutica na forma de extrato hidroalcoólico das raízes de *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze, *Plumbaginaceae* (Baicuru).

As raízes foram caracterizadas a partir da identificação botânica, de métodos físico-químicos, avaliação quantitativa da composição química por CCD associada a espectrometria no ultravioleta, através do ácido gálico. A influência dos seguintes fatores tecnológicos; teor de etanol no líquido extrativo, tempo de maceração e granulometria da droga, foi avaliada através da análise fatorial do tipo 2ⁿ.

O projeto fatorial mostrou-se adequado para avaliação da influência dos fatores tecnológicos à produção de fitoterápicos com o baicuru, pela obtenção de maior rendimento em ácido gálico. A concentração etanólica do mênstruo e o tempo de maceração são os fatores tecnológicos com maior influência sobre rendimento de ácido gálico.

A avaliação de estabilidade do extrato hidroalcoólico estandardizado foi realizada pelo método da degradação térmica acelerada.

ABSTRACT

In order to obtain phytotherapeutic drugs with quality it must be important evaluate the raw-matherial and the several stages of manufacture.

Hydroalcoholic macerates were prepared with roots from *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze, *Plumbaginaceae* (Baicuru).

The roots were standardized through botanic identification, physico-chemical methods and quantitative evaluation by TLC associated to ultraviolet, based on the contend of galic acid.

The influence of some technological factors such as ethanol concentration in the extraction liquid, maceration time and granulometry of the plant matherial was analysed using 2ⁿ factorial design.

The factorial analysis demonstrated to be suitable to evaluate the influence of these technological factors to phytotherapeutic production with the baicuru.

The ethanolic concentration of the menstruum and the maceration time were the most influents technological factors on the yield of galic acid.

The evaluation of hydroalcoholic extract stability was realized under acelerated thermal degradation conditions.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO	1
2. PARTE EXPERIMENTAL	9
2.1 MATERIAL	
2.1.1 Matéria-prima vegetal	9
2.1.2 Aparelhos e equipamentos	9
2.1.3 Reagentes, soluções, substâncias re- ferência	10
2.2 METODOLOGIA	
2.2.1 Caracterização da matéria-prima ve- getal	11
2.2.1.1 Caracterização botânica	11
2.2.1.2 Caracterização química preliminar	12
2.2.1.3 Tratamentos prévios da dro- ga	12
2.2.1.4 Perda por dessecação	13
2.2.1.5 Análise granulométrica por tamisação	13
2.2.1.6 Teor de extrativo	14
2.2.1.7 Resíduo seco	14
2.2.1.8 Determinação de taninos pre- cipitáveis por caseína	14
2.2.1.9 Avaliação da estabilidade du- rante armazenamento	16
2.2.2 Análise cromatográfica	16
2.2.3 Métodos de extração	19
2.2.3.1 Turbolização (ETB)	19
2.2.3.2 Maceração (EMB)	19

2.2.4	Caracterização dos extratos	21
2.2.4.1	Determinação do pH	21
2.2.4.2	Determinação da densidade	21
2.2.4.3	Análise cromatográfica	21
2.2.4.4	Purificação dos extratos	22
2.2.4.5	Análise quantitativa	23
2.2.4.5.1	Curva de calibração: preparo da solução padrão de ácido gá- lico	23
2.2.4.5.2	Doseamento do EMP e ETP	24
2.2.5	Estandarização do extrato	24
2.2.5.1	Avaliação do comportamento do ex- trato em relação ao tempo de ma- ceração	24
2.2.5.2	Análise fatorial	25
2.2.5.2.1	Projeto fatorial	25
2.2.5.2.2	Avaliação do projeto fatorial	26
2.2.5.2.3	Análise de variância do projeto fatorial, ...	28
2.2.5.3	Cálculos estatísticos	30
2.2.6	Ensaio preliminares para o estudo da es- tabilidade do macerado otimizado	30

3. RESULTADOS

3.1 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA

3.1.1	Caracterização botânica/Descrição micros- cópica da raiz	32
3.1.2	Caracterização química preliminar	33
3.1.3	Tratamento prévio da droga	38
3.1.4	Perda por dessecação	39
3.1.5	Teor de extrativo	39
3.1.6	Análise granulométrica	40
3.1.7	Determinação de taninos precipitáveis por caseína	41
3.1.8	Avaliação da estabilidade durante ar- mazenamento	41

3.2	ANÁLISE CROMATOGRÁFICA	41
3.2.1	Análise cromatográfica da matéria-prima	42
3.2.2	Análise cromatográfica do extrato tur- bolizado, segundo o método de purifica- ção	44
3.2.3	Espectros no ultravioleta de ácido gá- lico obtidos por dois métodos de puri- ficação do ETB	48
3.2.4	Espectro no ultravioleta da substância R nos ET purificado pelo método R	49
3.2.5	Cromatografia em camada delgada em ce- lulose microcristalina do ETP.....	50
3.2.6	Cromatografia em papel do ETP	51
3.2.7	Análise cromatográfica dos macerados	52
3.3	MÉTODOS DE EXTRAÇÃO	54
3.4	CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO TURBOLIZADO (ET)	55
3.4.1	Determinação do pH	55
3.4.2	Determinação do resíduo seco	55
3.4.3	Determinação da densidade do extrato tur- bolizado (ETB) através de areômetro des- crito na farmacopéia brasileira 3ª edição ...	55
3.5	DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA (CCD/UV)	56
3.5.1	Curva padrão de absorção de ácido gálico ...	56
3.5.2	Determinação quantitativa do ETP	57
3.6	ESTANDARDIZAÇÃO DO TEMPO DE MACERAÇÃO	57
3.7	ANÁLISE FATORIAL DOS EXTRATOS MACERADOS (EM)	58
3.7.1	Análise de variância	61
3.7.2	Teste Fisher (Teste F)	62
3.7.3	Método de Tukey	62
4.	DISCUSSÃO	68
5.	CONCLUSÕES	94
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	- Combinações dos fatores para realização dos experimentos	26
2	- Forma padrão para avaliação dos efeitos principais e interações em um projeto fatorial 2^3	29
3	- Perda por dessecação do material fresco	39
4	- Análise granulométrica por tamisação das raízes de <i>Limonium brasiliense</i> (Boiss.) Kuntze, rasuradas	40
5	- Comportamento das zonas cromatográficas dos macerados EMP ₁ , EMP ₂ (veja Figura 12) e ETP frente a diversos sistemas de detecção	53
6	- Coloração dos extratos em função do método extrativo, concentração etanólica e tempo de extração	54
7	- Valores do pH para o extrato turbolizado (ET) e para os solventes	55
8	- Resíduo seco para o turbolizado (ET)	55
9	- Valores de absorção da solução padrão de ácido gálico determinado diretamente por UV, a 273nm	56
10	- Valores de absorção da solução padrão de ácido gálico determinados por CCD/UV, a 273nm	56

Tabela	Página
11 - Concentração de ácido gálico no turbolizado purificado pelo método CCD/UV, (n=5)	57
12 - Concentração de ácido gálico nos macerados obtidos com etanol a 50% (V/V), após purificação em função do tempo de maceração, pelo método CCD/UV, (n=3)	57
13 - Valor do pH dos líquidos extratores e dos macerados (EM) à temperatura ambiente pela média de 5 determinações	58
14 - Densidade dos extratos em função do método extrativo e das variáveis tempo de extração, granulometria e concentração etanólica, (n=5)	58
15 - Resíduo seco dos macerados brutos (E M B) em função da concentração etanólica do líquido extrator, da granulometria e do tempo de maceração, (n=5)	59
16 - Concentração de ácido gálico nos macerados purificados, em função dos fatores de extração pelo método CCD/UV (n=5)	60
17 - Efeitos e interações principais (E/I) calculados a partir da forma padrão sobre o pH, densidade (d), resíduo seco (RS) e concentração de ácido gálico (AG), nos macerados	60
18 - Concentração de ácido gálico (AG) nos macerados purificados (EMP), por CCD/UV para análise de variância	61
19 - Dados do Teste F para o ácido gálico nos macerados purificados, pelo método CCD/UV	62
20 - Diferença entre as médias obtidas nos tratamentos para o teste de Tukey referentes a concentração de ácido gálico no EMP pelo método CCD/UV	63

Tabela	Página
21 - Comportamento do pH do extrato estandardizado (EE) e da solução de ácido gálico a 1,0mg/ml em etanol a 50% (V/V), (SP) em função do tempo e da temperatura de armazenamento	64
22 - Concentração de ácido gálico no extrato estandardizado em função do tempo e temperatura de armazenamento, (n=3)	65
23 - Concentração de ácido gálico na solução hidroalcoólica a 50% (V/V) de ácido gálico a 1,0mg/ml exposta a 60°C em função do tempo de armazenamento, (n=3)	66

LISTA DE FIGURAS

Figuras	Página
1 - Corte transversal da raiz do <i>Limonium brasiliense</i>	34
2 - Corte transversal da raiz do <i>Limonium brasiliense</i>	35
3 - Corte transversal da raiz do <i>Limonium brasiliense</i> . Lenho mostrando um feixe cuneiforme, com vasos disseminados entre tecido fibroso e parênquima lenhoso, separados por raios medulares	36
4 - Corte transversal da raiz do <i>Limonium brasiliense</i>	37
5 - Análise cromatográfica, no sistema 3, do decocto 10% e das substâncias referência ácido gálico (AG) e catequina (CA)	42
6 - Análise cromatográfica, no sistema 6 da solução B e das substâncias referência ácido gálico (AG), catequina (CA), epicatequina (EP) e extrato bruto (EXT)	43
7 - Análise cromatográfica no sistema 4, do turbolizado purificado pelo método R (EPR) e das substâncias referência ácido gálico (AG) e catequina (CA)	44
8 - Análise cromatográfica no sistema 5 do tur-	

	bolizado purificado pelo método A (ETP _A) e das substâncias referência ácido gálico (AG) e catequina (CA)	45
9 -	Análise cromatográfica, no sistema 2, do turbolizado purificado pelo método A (ETP _A) e das substâncias referência ácido gálico (AG), catequina (CA)	46
10 -	Análise cromatográfica, no sistema 8, do turbolizado pelo método A (ETP _A) e substância referência ácido gálico (AG)	47
11 -	Espectros no ultravioleta de ácido gálico após separação por CCD e extração com metanol. 1. Ácido gálico padrão, 2. ácido gálico isolado do turbolizado purificado pelo método R, 3. ácido gálico isolado do extrato purificado pelo método A; antes (—) e após (---) adição de NaOH	48
12 -	Espectro no ultravioleta da substância R, isolada do turbolizado purificado pelo método R após separação por CCD e extração com metanol; antes (---) e após adição de NaOH (—)	49
13 -	Cromatografia bidimensional, no sistema 1, do ETP e das substâncias referência catequina (CA) e epicatequina (EP)	50
14 -	Análise cromatográfica, no sistema 7, do turbolizado purificado e dos padrões ácido gálico (AG), catequina (CA)	51

- 15 - Análise cromatográfica dos macerados 70% (EMP₁) e 50% (EMP₂) e substâncias referência de ácido gálico no sistema 8 52
- 16 - Análise cromatográfica, no sistema 8, do extrato estandardizado submetido à degradação térmica nos tempos 1, 10 e 21 dias (D) às temperaturas de 40°C e 60°C acompanhadas de um extrato controle a 4°C nos tempos: zero, 10 e 21 dias 67
- 17 - Histograma da distribuição granulométrica da droga rasurada 72
- 18 - Curvas características de retenção e passagem da análise por tamisação da matéria-prima vegetal 73
- 19 - Curvas padrão de absorção de ácido gálico a 273nm pelos métodos direto e CCD/UV, respectivamente 81
- 20 - Relação entre absorvância do padrão e absorvância do padrão após eluição da silicagel 82
- 21 - Concentração de ácido gálico nos extratos macerados com etanol a 50% (V/V), em relação ao tempo de extração 85
- 22 - Avaliação do pH do extrato hidroalcoólico estandardizado, submetido ao ensaio de envelhecimento em função das temperaturas 4, 40 e 60°C e tempo de armazenamento (dias) 91

LISTA DE ABREVIATURAS

- A - Absorvância
- AG - Ácido gálico
- bm - banho-maria
- CA - Catequina
- CCC - Cromatografia contra-corrente
- CCD - Cromatografia em camada delgada
- CCD/REM - Cromatografia em camada delgada por remissão
- CG - Cromatografia gasosa
- CLAE - Cromatografia líquida de alta eficiência
- CP - Cromatografia em papel
- d - densidade
- dms - Diferença mínima significativa
- EB - Extratos brutos
- EE - Extrato estandardizado
- EMB - Extrato macerado bruto
- EMP - Extrato macerado purificado
- EMP₁ - Macerado com teor etanólico de 50% purificado
- EMP₂ - Macerado com teor etanólico de 70% purificado
- EP - Epicatequina
- ETP_A - Extrato purificado pelo método A
- EPR - Extrato purificado pelo método R
- ETB - Extrato turbolizado bruto
- ETP - Extrato turbolizado purificado

- FR - Fração resíduo porcentual
- ICN - Instituto de Ciências Naturais
- m - Dimensão granulométrica (mm)
- \bar{m} - Dimensão granulométrica média (mm)
- P - Fração passagem porcentual
- R - Fração retida notamis em porcentual
- RS - Resíduo seco
- SP - Solução padrão de ácido gálico (mg/ml)

1. INTRODUÇÃO

Embora o uso de plantas medicinais pela população nas mais diversas enfermidades constitua uma prática antiga, no Brasil a desinformação a respeito do seu uso racional e de aspectos sobre seu emprego tecnológico, constitui uma barreira na introdução destes agentes terapêuticos no sistema institucionalizado de saúde.

Até o início de nosso século as plantas medicinais ocupavam uma posição nobre na prescrição médica e na auto-medicação. Com o avanço da síntese de medicamentos, garantindo doseificação exata, o uso das drogas de origem vegetal veio a perder o seu lugar na terapia (BERNHARD, 1980; BLUMENTHAL-BARBY, 1986).

A preocupação em levar à população medicamentos que possuam segurança terapêutica faz com que pesquisadores venham a desenvolver e intensificar as pesquisas em produtos naturais (MENßEN, 1979 e 1982; SPAICH & GRACZA, 1980; BERNHARD, 1980; STELLMACH, 1980; VAN OS, 1980; BAUER & WAGNER, 1983; SONAGLIO, 1987).

Para assegurar a qualidade de fitoterápicos faz-se necessário desenvolver técnicas que garantam a manutenção da qualidade da matéria-prima, do ciclo tecnológico e do produto acabado.

Vários são os fatores que podem influenciar na preparação de um extrato (CLAUS & TYLER, 1965; SIEGFRIED, 1971; HAGER & SEIDEL, 1979; MEIER-BRATSCHI, 1979; MENßEN, 1979; BERNHARD, 1980; e STELLMACH, 1980; BONATI, 1980). Entre eles são citados:

- A concentração do princípio ativo na planta. Esta variação pode ser decorrente de fatores taxonômicos, genéticos e edáficos. Dai a preocupação na escolha da época do ano e do local de coleta, preferindo sempre o habitat natural ou cultivo em locais apropriados onde o terreno, clima, etc., sejam os mais próximos do natural.
- Secagem da droga. A escolha do método de secagem vai depender muito dos constituintes químicos da planta, objetivando sempre a estabilização da droga.
- Preparação da droga. Compreende desde a lavagem do farmacógeno, separação das partes a serem utilizadas (retirada de toda a matéria estranha que possa levar a adulteração do produto acabado) até a redução da mesma.
- Extração. Com líquido extrator adequado empregando método com maior seletividade extratora e menor custo.

O largo emprego do *Limonium brasiliense* pela medicina popular, despertou interesse de vários pesquisadores, levando a sua inclusão na primeira edição da farmacopéia brasileira (PHARMACOPEIA, 1929). Sua indicação pela população é muito vasta, sendo empregada nas formas de infuso e decocto, como antissépticos nas infecções genito-urinárias, adstringente, depurativo, normalizador nas dismenorréias, diurético, no tratamento de úlceras, de reumatismo, artritismo, hidropsia, diarréia crônica e engorgitamentos glandulares (COIMBRA, 1958; REITZ, 1965; LIFCHITZ, 1968; CRUZ, 1979).

O emprego do baicuru como matéria-prima na indústria farmacêutica carece de informações quanto aos critérios de qua-

lidade a serem seguidos. Embora sejam comercializadas especialidades na forma de tinturas e elixires não se encontram indicações quanto aos cuidados tecnológicos para a obtenção de extratos padronizados, nem de métodos de verificação da qualidade do produto final. Esta situação compromete o produto, levando a crer que deva existir no mercado especialidades com grande disparidade de ação biológica.

Para justificar sua grande utilização popular foram realizados alguns estudos, constatando-se que extratos dioxânicos das folhas do baicuru apresentavam ação antibiótica contra *Bacillus mycoides*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* e *Serratia marcescens* (MOTA, 1963).

ROSITO (1975), detectou uma ação bacteriostática, "in vitro", do extrato hidroetanólico das raízes do baicuru para *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, entre outros.

JAHNS & CRESCENTE (1976) observaram em ensaios farmacológicos e clínicos atividade antagônica à bradicinina e à ocitocina, quando da associação do extrato fluido de *Limonium brasiliense* a paracetamol.

MOURA (1984) determinou, para o extrato etanólico das raízes do baicuru, ação antiinflamatória e antibacteriana, sendo os taninos e ácido gálico, respectivamente, responsáveis pelas mesmas. Toxicidade excessiva foi detectada em doses elevadas do extrato etanólico (superiores a 2,0g/kg).

Quanto a composição química, poucos foram os trabalhos realizados com este vegetal, no entanto, sabe-se que os maiores responsáveis pelas ações biológicas do baicuru são os taninos e seus precursores. DALPE (1884) já havia relatado a presença de taninos, de uma substância com reação positiva para alcalóides,

cuja presença até hoje não foi comprovada e óleo essencial. Em 1920, DIAS DA SILVA relatou, além da presença de taninos, óleo volátil, substância resinosa, silicato solúvel e cinzas com teor de 4,5%.

A presença de taninos hidrolisáveis, condensados, ácido 4-metoxi-gálico, β -sitosterol e saponinas triterpênicas foram descritas por ROSITO (1975).

Mais recentemente MOURA (1984) isolou do extrato das raízes ácido gálico, seu éster etílico, ácido elágico, β -sitosterol, benzoato de benzila, sacarose, miricetina, uma cumarina e saponinas triterpênicas.

Na indústria farmacêutica são produzidas várias especialidades que contêm plantas medicinais. O que se constata porém é que existem na área da análise farmacêutica grandes problemas ainda não sobrepujados, ligados ao ensaio das preparações, das quais ainda não se consegue analisar de modo total e significante seus componentes declarados (HALBACH, 1983).

Na lei dos medicamentos da Alemanha de 1976 (AMG) os fitoterápicos são medicamentos e por isto, estão sujeitos ao controle como qualquer outro de origem sintética. De acordo com a AMG a qualidade, a segurança e o controle de qualidade são pré-requisitos fundamentais para um medicamento. A lei define qualidade como as condições que um medicamento possui para que sejam determinadas por ensaio de identidade, doseamento, pureza, propriedades químicas, físicas e biológicas ou através do processo de produção (HALBACH, 1983).

Se as substâncias ativas são desconhecidas é necessário tentar achar um componente que seja o mais típico possível para esta matéria-prima e que na produção do extrato primário seja

também extraído. A essa substância se dá o nome de referência ou guia. (HALBACH, 1983; FROHNE, 1984; LIST & SCHMIDT, 1984). Neste caso procura-se identificar a matéria-prima de forma incontestável.

Com a introdução de técnicas cromatográficas conseguiu-se um elevado progresso na avaliação químico-analítica de fitoterápicos. A cromatografia em camada delgada pode ser empregada como método de escolha, por ser rápida e eficiente, requer pequena quantidade de material, além de possuir maior diversidade de utilização do que a cromatografia em coluna e maior poder de separação do que a cromatografia em papel (RIBÉREAU-GAYON, 1968; FRANIAU & MUSSCHE, 1972).

A vantagem das técnicas cromatográficas está na praticidade das mesmas, permitindo isolar, identificar e quantificar os componentes de interesse, como na cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), cromatografia gasosa (CG), cromatografia em camada delgada por remissão (CCD/REM), cromatografia contra corrente (CCC), além da separação e extração por cromatografia em papel e camada delgada com quantificação por métodos químicos (volumetria) ou físico-químicos (espectrofotometria no UV, fotocolorimetria) (BERNHARD, 1980; MENßEN, 1981).

A separação ou quantificação de taninos se consegue com o auxílio de cromatografia em papel, métodos colorimétricos baseados na susceptibilidade dos fenóis à oxidação por certos reagentes, como o de Folin-Denis (A.O.A.C., 1955); técnicas que se baseiam na adsorção dos taninos em gelatina, caseína, soroalbumina bovina e mais comumente pó de pele cromada, para isolar as frações tanantes das não tanantes (SCHMIDT, 1955; HAGERMAN, 1978; BUNDESVEREINIGUNG, 1979).

A quantificação pelo método indireto em cromatografia em camada delgada (CCD) ou cromatografia em papel (CP), requer após desenvolvimento do cromatograma, eluição das manchas cromatográficas de interesse, com solventes adequados para posteriormente determinar a absorvância por espectrofotometria no UV. A aplicação deste método pode envolver perdas e erros conseqüentes da aplicação, desenvolvimento, detecção e eluição (SRIVASTAVA & KISHORE, 1985) exigindo experimentação prévia extensiva e rigoroso controle das condições de ensaio para que o método seja viável (TYMAN, 1978).

A CLAE tem encontrado aplicação crescente na separação e quantificação das mais diversas misturas em extrativos vegetais (ZIEGLER et alii, 1975; WULP & NAGEL, 1976; ROSS & BRAW, 1977; BEASLEY et alii, 1977; GALENSA & HERRMANN, 1980; REVILLA et alii, 1986).

Como as condições de extração podem influenciar consideravelmente o produto final, devem ser conhecidas quantitativa e qualitativamente estas influências, a fim de obter reprodutibilidade de resultados entre os lotes.

Na extração nem sempre utiliza-se um só eluente, mas sim misturas como etanol/água e para a extração seletiva geralmente uma seqüência de solventes. O solvente ideal deve reunir as seguintes características:

- alto poder de dissolução;
- baixo ponto de ebulição;
- pequena solubilidade em água;
- sem resíduo de destilação;
- não inflamável; e
- se permanecer no produto, adequabilidade fisiológica.

A aparelhagem para a extração vai depender do método empregado. Os aparelhos descritos na Farmacopéia são empregados na obtenção de pequenas quantidades de tinturas ou extratos. Limitantes são as dimensões dos frascos agitadores e percoladores. Para produções maiores são usados aparelhos especiais.

Os métodos de extração mais utilizados fundamentam-se na maceração e na percolação (VOIGT & BORNSCHEIN, 1982).

A maceração é um procedimento simples de extração, consistindo no contato prolongado da droga com o líquido extrator, a temperatura ambiente, durante um tempo determinado, que varia com a droga, com agitação freqüente. A separação entre o líquido e o resíduo se faz por filtração e prensagem. É considerado um método de extração não exaustivo, pois leva ao equilíbrio de concentração dos solutos entre a droga e a micela.

Na turbolização, um método derivado da maceração, a droga e o líquido extrator são submetidos à ação de rotores de grande velocidade. A ruptura da droga e a constante agitação elevam o rendimento, considerando-se o tempo de extração. A temperatura não deve ultrapassar os 40°C, devendo excluir a perda de solvente por fechamento hermético do recipiente (DÄRR, 1979; VOIGT & BORNSCHEIN, 1982).

A percolação se caracteriza pela renovação constante do solvente na extração. É uma técnica de extração onde se consegue um máximo de substâncias extraíveis em torno de 95% sendo considerado um método exaustivo.

A análise fatorial vem sendo empregada na ciência farmacêutica como um plano de otimização de experimentos (LIST & SCHMIDT, 1984; GOLD, 1984; PLAIZIER-VERCAMMEN & DE NÈVE, 1980).

Inclui a combinação de vários conjuntos de tratamentos ou

fatores, permitindo a avaliação das respostas obtidas simultaneamente para os diversos fatores e também do efeito das alterações nos níveis de cada fator. YATES (1937) descreve as aplicações e as limitações do delineamento fatorial. Na otimização e na avaliação de experimentos objetivando a obtenção de fitoterápicos tem-se, no entanto, pequena experiência, embora a mesma tenha apresentado resultados altamente satisfatórios (MELLO, 1989).

Outros métodos estatísticos, como Tukey e Duncan permitem verificar os contrastes significativos quando em experimentos que conduzam a análise de variância e o teste F apresenta o valor significativo, que indica haver diferença significativa entre médias de tratamentos (Tukey) e/ou blocos (Duncan) (RODRIGUES, 1986).

Partindo de estudos fitoquímicos realizados para algumas plantas de largo emprego na medicina popular, dentre elas o *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze, desenvolveu-se extratos variando a granulometria, tempo de maceração e teor alcoólico, no intuito de obter um extrato otimizado que preencha os requisitos de qualidade e segurança terapêutica.

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1 MATERIAL

2.1.1 Matéria-prima vegetal

As raízes do *Limonium brasiliense* foram coletadas no município de Rio Grande, RS, em julho de 1986, no Campus do Museu Oceanográfico da Fundação Universidade de Rio Grande pelo Prof. Mário Junges da referida Universidade. O material vegetal foi lavado com água corrente e cortado grosseiramente para a secagem.

A identificação morfológica das raízes do *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze foi realizada a partir da comparação com exsicatas depositadas no herbário da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sob número ICN - 53433, descrita por MOURA (1984) e identificada pela profª Lilian Auler Mentz, do Departamento de Botânica da UFRGS.

2.1.2 Aparelhos e equipamentos

- Aparelho de tamisação vibratório Retsch com tamises segundo DIN 12791 - série 4188
- areômetro DIN 12791 - série M100
- balança analítica - Sartorius tipo 2402
- banho de água - Fanem

- bomba de vácuo - Fanem modelo Cal com vacuômetro de 0-760mm Hg (0-101kPa)
- espectrofotômetro Perkin-Elmer Coleman-124 com registrador Perkin-Elmer-56
- estufa de ar circulante Memmert modelo Tv 60µL
- estufas termostatzadas Biomatic.
- estufas a vácuo Heraues RVT 360
- evaporador rotatório Büchi - RV 2
- lâmpada universal de quartzo Fluotest 254 e 366nm
- moinho de discos
- prensa hidráulica manual Hafico para 5 l
- turbolizador Arno super

2.1.3 Reagentes, soluções, substâncias referência

Todos os reagentes empregados nas extrações e análises foram de grau pró-análise, a menos que indicado diferentemente. Foi utilizado etanol comercial 93,6°GL (aproximadamente 96,6 INPM) (firma PEREIRA).

SOLUÇÕES

- Solução de acetato de chumbo a 10% (m/V);
- solução de ácido clorídrico 1N
- solução de ácido sulfúrico 0,1N
- solução de carbonato de sódio R (EUROPEAN Pharmacopoeia, 1975)
- solução de cloreto férrico 1 e 2% em metanol (m/V);
- solução de cloreto de alumínio 5% em etanol (m/V);
- solução de ferricianeto de potássio 1% (m/V);
- solução de hidróxido de sódio 1% em metanol (m/V);

- solução de vanilina clorídrica: (HASLAM, 1966);
- Reagente Folin R (EUROPEAN Pharmacopoeia, 1975);
- safranina e azul de Astra (BOMTEMPI, 1988);
- solução tampão acetato CI pH 5,1 (EUROPEAN Pharmacopoeia, 1975);
- solução tampão acetato pH 4,0;
- solução tampão fosfato pH 7,0;
- reagente natural A (RIBÉREAU-GAYON, 1968).

Substâncias Referência*

- Ácido gálico - Catequina - Epicatequina.

2.2 METODOLOGIA

2.2.1 Caracterização da matéria-prima vegetal

2.2.1.1 Caracterização botânica

A caracterização das raízes foi feita através de observações macroscópica direta com o material fresco.

A observação microscópica foi executada em cortes histológicos feitos através de micrótomo, do material seco submetido a um banho de água. Empregou-se como corantes a safranina e azul de Astra.

2.2.1.2 Caracterização química preliminar

Para detecção de taninos foram empregados os métodos descritos por SCHMIDT (1955) e HASLAM (1966).

Para a realização dos testes preparou-se um decocto a 10% (m/V) com a droga seca e rasurada segundo a Farm. Bras. II (FAR-

* Substâncias fornecidas pelo Curso de Pós-Graduação em Farmácia - UFRGS.

MACOPÉIA, 1959).

Reação com acetato de chumbo e ácido acético. A 2ml do extrato, adicionou-se 10ml de ácido acético e 5ml de acetato de chumbo a 10%.

Reação com vanilina clorídrica. Foram adicionados a 5ml do extrato 0,5ml de solução de vanilina a 1% (m/V) e 1,0ml de ácido clorídrico 37% (V/V).

Teste de Procter - Paessler. A 5ml do extrato, adicionou-se alguns cristais de nitrito de sódio e cinco gotas de ácido sulfúrico 0,1N.

Reação com sais de ferro. A 1ml do extrato diluído com água a 50% juntou-se duas gotas de solução de cloreto férrico a 1% (m/V) em metanol.

Reação com ácido clorídrico. A 10ml do extrato, adicionou-se 5ml de ácido clorídrico 1N. Esta solução foi submetida a refluxo por 2h.

2.2.1.3 Tratamentos prévios da droga

As raízes após separadas das partes aéreas e lavadas com água, foram cortadas em pedaços de cerca de 1-2cm, dividindo-se em três partes. A primeira foi destinada à estabilização por destruição enzimática segundo o método de Perrot e Góris (HELMAN, 1984), através do tratamento com vapores de etanol, em autoclave a 80-90°C, durante 60min à uma pressão de 10 a 15kPa. A droga tratada foi conduzida a estufa de ar circulante a cerca de 40°C, para eliminar o álcool residual, até tornar-se quebradiça. A segunda parte foi mantida em estufa de ar circulante à 32°C ± 2°C durante 5dias, quando apresentou-se quebradiça. A última parte da droga rasurada foi mantida em estufa a vácuo por 120h entre 50 a 60°C. Após a secagem o material vegetal foi acondicionado e ar-

mazenado separadamente em sacos de papel ao abrigo da luz. A seguir foi reduzido em moinho de discos e classificada granulometricamente em tamisador vibratório a 50 vibrações por minuto por 30min.

2.2.1.4 Perda por dessecação (WOJAHN, 1951)

Em pesa-filtro, previamente tarado, foram pesados exatamente cerca de 2,0g da droga rasurada em pedaços de 1 a 2cm e colocados em estufa a 105°C por 2h, deixando-se esfriar em dessecador e pesando-se a seguir. Repetiu-se o procedimento em intervalos de 30min até peso constante.

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

2.2.1.5 Análise granulométrica por tamisação (VOIGT & BORNSCHEIN, 1979)

A droga após rasurada em moinho, pesando cerca de 100g, foi passada através de uma série de tamises. Após serem tamisadas por 30min, determinou-se gravimetricamente as frações retidas. Os valores obtidos serviram para traçar a curva característica de retenção e passagem.

Para esta análise utilizou-se uma bateria de tamises com abertura de malha de 2,000; 1,600; 1,250; 1,000; 0,800; 0,630; 0,500; 0,315; 0,200; 0,090mm, segundo DIN 12791 tarados individualmente.

2.2.1.6 Teor de extrativo (BUNDESVEREINIGUNG, 1979)

Cerca de 1,0g da droga moída (0,315-0,630) exatamente pesado, foi levado a fervura com 100g de água por 10min. Após resfriamento foi completado o volume de água e filtrado, desprezando-se os primeiros 20ml. O resíduo seco foi determinado a partir de 20g do filtrado, segundo o item 2.2.1.7.

O teor de extrativo foi calculado pela seguinte fórmula:

$$t = \frac{g \cdot 500}{p} (\% ; m/m) \quad (1)$$

onde:

g = resíduo seco (g)

p = massa da droga (g)

2.2.1.7 Resíduo seco (BOHME & HARTKE, 1981)

Em pesa-filtro previamente tarado foram pesados exatamente cerca de 20,0g do extrato e evaporado a secura em banho-maria. O resíduo foi colocado em estufa a $105 \pm 5^{\circ}\text{C}$ por 2h e deixado esfriar em dessecador, pesando-se a seguir.

O resultados foi expresso em porcentagem ponderal sobre 100g do extrato, através da média de 5 determinações.

2.2.1.8 Determinação de taninos precipitáveis por caseína (BUNDESVEREINIGUNG, 1979)

Solução teste: 0,300g da droga pulverizada (0,315-0,630), exatamente pesados foi aquecida a fervura sob refluxo por 15min, com 40,0ml de uma mistura de 18,0ml de metanol R e 42,0ml de água. Após resfriamento colocou-se a mistura, sem filtrar, em balão volumétrico e completou-se o volume, a 50,0ml com a mistura metanol-água.

Quantificação: cerca de 20,0ml da solução teste foram filtrados, desprezando-se os 10ml iniciais. Do restante, 5,0ml foram adicionados de 25,0ml do tampão acetato CI pH 5,1 e diluído a 50,0ml com água (solução 1). Adicionou-se 100,0mg de caseína R a 20,0ml da solução 1, agitou-se por 1h e filtrou-se (solução 2). Em balão volumétrico de 50ml foram colocados 5ml da solução 1 e da 2, adicionado de 2ml de reagente de Folin R e 20ml de água, completando-se o volume com solução de carbonato de sódio R (solução 1a e 2a).

Branco: em balão volumétrico de 50ml foram colocados 2,5ml de tampão acetato CI, pH 5,1; 2,0ml de reagente de Folin R e 22,5ml de água completando-se o volume com solução de carbonato de sódio R.

Solução comparativa: cerca de 50,0mg de ácido gálico R dessecado em estufa a 80°C por 2h, exatamente pesados, foram dissolvidos em 50,0ml de água e o volume completado a 100,0ml com tampão acetato CI pH 5,1. Desta solução, 0,5ml foi tratado com 2,0ml de água e o volume completado a 50,0ml com solução de carbonato de sódio R.

As absorvâncias das soluções 1a, 2a e comparativa foram lidas após 40min a 720nm em cubeta (d = 1,000cm) contra o branco. A concentração foi calculada pela seguinte equação

$$Q = \frac{(A_{1a} - A_{2a}) \cdot 5000 e_v}{e \cdot A_v (100-t)} \quad (2)$$

onde:

Q = % (m/m) taninos calculados como ácido gálico

A_{1a} = absorvância da solução 1a

A_{2a} = absorvância da solução 2a

A_v = absorvância da solução comparativa

e = massa da droga (mg)

e_v = massa do ácido gálico (mg)

t = perda por dessecação (%)

O resultado expressa a média de 4 experimentos.

2.2.1.9 Avaliação da estabilidade durante armazenamento

Para avaliar a estabilidade das raízes do *Limonium brasiliense*, após terem sido submetidas ao processo de secagem e moagem, quantidades suficientes da droga pulverizada foram colocadas em frascos de vidro incolor, fechados com tampas rosqueáveis e expostos a luz solar e à temperatura ambiente por 10 dias.

Passado o tempo supra-citado as amostras foram submetidas a análise qualitativa segundo item 2.2.1.2.

2.2.2 Análise cromatográfica

Com o intuito de caracterizar as raízes do *Limonium brasiliense*, preparou-se extratos a partir do decocto a 10% (m/V) da planta obtida pelo aquecimento sob refluxo durante 1 hora, do extrato turbolizado bruto e purificado, preparados segundo os itens 2.2.3 e 2.2.4.4 respectivamente. Cromatografaram-se os mesmos com substâncias autênticas de ácido gálico (AG), catequina (CA) e (-) epicatequina (EP).

Os cromatogramas foram desenvolvidos em placas de vidro (10 x 20cm e 20 x 20cm) em sistema saturado, até altura de 16cm aproximadamente com fases estacionárias descritas abaixo, com espessura de 0,25mm. As fases móveis utilizadas foram preparadas em proporções volumétricas (V/V).

Sistema 1

- Fase estacionária: celulose microcristalina para CCD (AVICEL).
- Fase móvel: I (1ª direção) água
II (2ª direção) B.A.W. (n-butanol):
ácido acético: água (4:1:5)
- Detecção: UV_{254nm}; vanilina clorídrica e cloreto férrico.

Sistema 2

- Fase estacionária - Silicagel 60 GF₂₅₄ (MERCK)
 - Fase móvel: diclorometano: etanol: ácido fórmico (40:4:10)
 - Detecção: UV_{254nm}; UV_{365nm}, vapores de amônia, solução metanólica de NaOH 1% e vanilina clorídrica.
- Obs.: Placas ativadas a 100°C por 10 minutos.

Sistema 3 (HASLAM, 1966)

- Fase estacionária: silicagel G60 (MERCK)
- Fase móvel: benzeno: metanol: ácido acético (45:8:4)
- Detecção: cloreto férrico/ferricianeto de potássio.

Sistema 4

- Fase estacionária: silicagel 60 GF₂₅₄ (MERCK)
- Fase móvel: acetato de etila: ácido fórmico: água (90:5:5)
(HASLAM, 1966; HARBORNE, 1967)
- Detecção: UV_{254nm}, cloreto férrico, vanilina clorídrica.

Sistema 5

- Fase estacionária: silicagel 60 GF₂₅₄ (MERCK)
- Fase móvel: acetato de etila: ácido fórmico: água (90:5:5)
HASLAM, 1966; HARBORNE, 1967)
- Detecção: UV₂₅₄, cloreto férrico, vanilina clorídrica.

Sistema 6 (MARINI-BETTOLO, 1981):

Para a realização do cromatograma, quantidade da droga seca, aproximadamente 1,0g foi tratada em banho de água quente a 50°C com 10ml de éter de petróleo e posteriormente com uma mistura de 10ml de clorofórmio: ácido acético (99:1) (V/V). Ambas as frações orgânicas foram descartadas. À droga após tratamento, foram adicionados 10ml de uma mistura de metanol: clorofórmio: ácido acético (49,5:49,5:1) (V/V/V), desta solução aplicou-se na placa aproximadamente 0,1ml (solução B)

- Fase estacionária: silicagel 60 GF₂₅₄ (MERCK)
- Fase móvel: acetato de etila: ácido fórmico: água (90:5:5)
- Detecção: UV, cloreto férrico 2% com metanol e ferricianeto de potássio 1% em água.

As placas com suporte de sílicagel foram ativadas a 110°C por 20min antes do uso.

Sistema 7 (MOURA, 1984):

- Fase estacionária: papel Watman nº 1
- Fase móvel: ácido acético 5%
- Detecção: UV₂₅₄, UV₃₆₆ e reagente natural A.

Sistema 8

- Fase estacionária - Silicagel 60 GF₂₅₄ (MERCK)
- Fase móvel: diclorometano: etanol: ácido fórmico (40:10:4)
- Detecção: UV_{254nm}; UV_{366nm}, vapores de amônia, solução metanólica de NaOH 1% e vanilina clorídrica.

2.2.3 Métodos de extração

Os extratos trabalhados durante as análises, foram obtidos por turbolização e maceração das raízes secas e moídas do *Limonium brasiliense*.

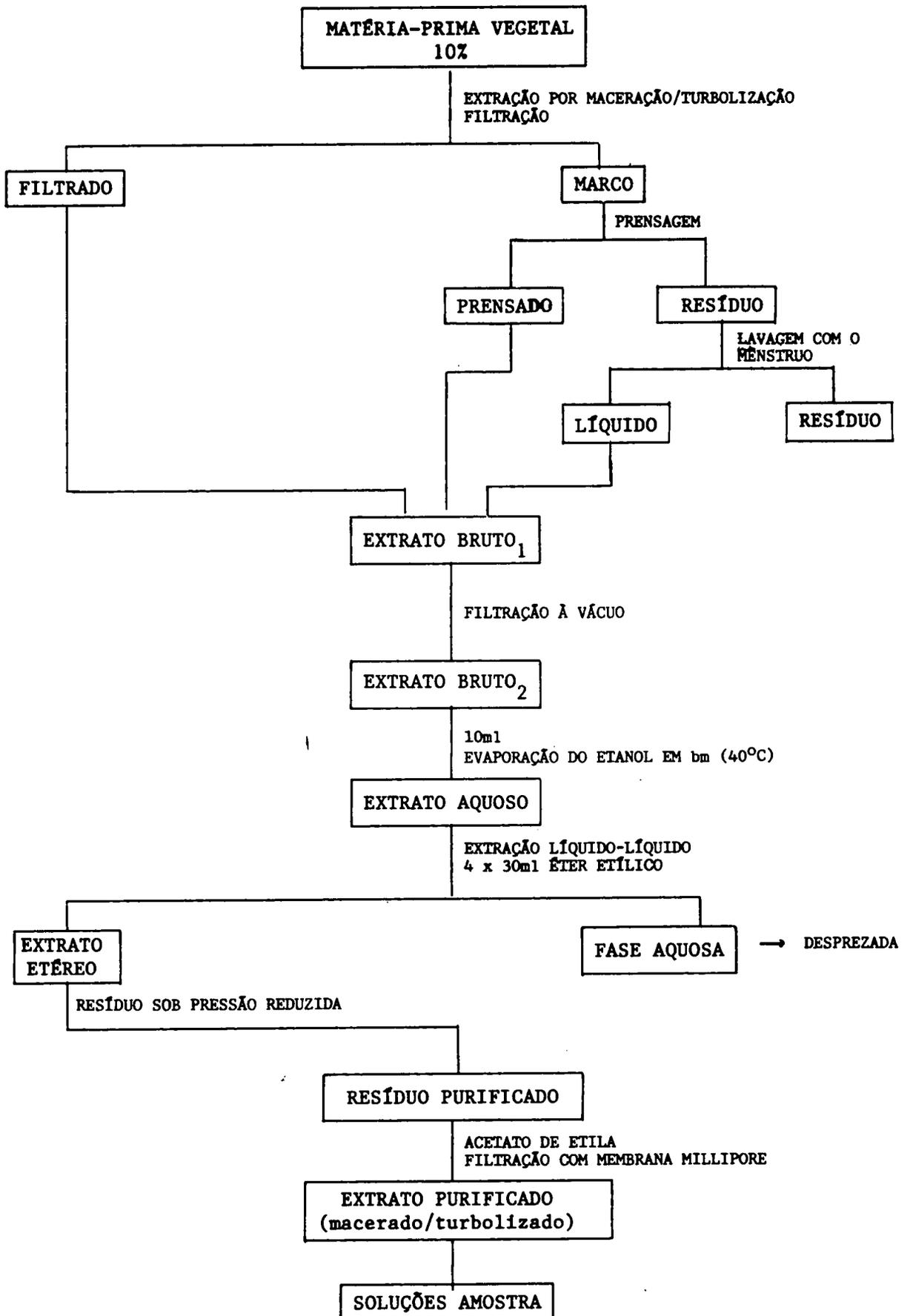
2.2.3.1 Turbolização (ETB)

Foram turbolizados 10,0g da droga tamisada (0,800) com 100,0ml de uma mistura hidroalcoólica 50% (V/V) por 30min, velocidade de 1400 rotações por minuto, com intervalos de repouso para evitar a elevação de temperatura acima de 40°C. Os turbolizados foram filtrados e o marco prensado em prensa hidráulica.

Este extrato foi empregado como extrato referência (ER).

2.2.3.2 Maceração (EMB)

Foram macerados 10,0g da droga de diferentes faixas granulométricas (0,315-0,630 e 0,630-0,800) com 100,0ml de misturas hidroalcoólicas de 50 e 70% (V/V), durante 5 e 10 dias, em frascos âmbar ao abrigo da luz e calor, com agitação ocasional.



ESQUEMA 1 - Processo de extração e purificação dos extratos.

Os macerados foram filtrados e o resíduo prensado através de papel filtro em prensa hidráulica.

2.2.4 Caracterização dos extratos

2.2.4.1 Determinação do pH

O pH dos extratos (ETB) foi determinado segundo a Farm. Bras. II (FARMACOPEIA, 1959) em pHmetro calibrado com soluções tampão fosfato e acetato, pH $7,0 \pm 0,02$ e $4,0 \pm 0,02$, respectivamente.

2.2.4.2 Determinação da densidade

Os extratos, após completado o volume, foram filtrados. A densidade foi determinada através de areômetro, a 25°C. O resultado expressa a média de 3 determinações.

2.2.4.3 Análise cromatográfica

Para o desenvolvimento das condições cromatográficas em camada delgada foram empregados extratos purificados (EMP e ETP) contra os padrões de ácido gálico (AG) e catequina (CA).

Para a cromatografia em camada delgada foram utilizadas placas de vidro (20 x 20cm) com suporte de silicagel GF₂₅₄ numa espessura da camada de 0,25mm, empregando como fase móvel mistura de diclorometano: etanol: ácido fórmico (40:10:4), em proporções volumétricas. As placas de silicagel foram previamente ativadas a 105°C por 2h.

Desenvolveram-se os cromatogramas em câmara saturada, até aproximadamente 16cm de altura. Após secagem dos cromatogramas, as manchas foram detectadas à luz ultravioleta (254 e 366nm) e após nebulização com solução de cloreto férrico/ferri-cianeto de potássio, vanilina clorídrica, vapores de amônia e hidróxido de sódio a 1%.

2.2.4.4 Purificação dos extratos

Para a análise cromatográfica das substâncias polifenólicas foi necessária a purificação prévia dos extratos.

Método A:

Alíquotas de 10,0ml dos EB foram evaporados até metade do volume em banho-maria entre 40-60°C, com posterior esgotamento com quatro frações de 30ml de éter etílico. As frações etéreas foram reunidas e levadas a resíduo sob pressão reduzida. O resíduo foi retomado com acetato de etila e filtrado por filtro de membrana de politetrafluroetileno de porosidade 0,25µm (FALP, MILLIPORE), sendo o volume completado a 5,0ml.

Método R:

Alíquotas de 10,0ml do extrato bruto foram previamente tratadas com 10ml de n-hexano. A fração n-hexânica foi desprezada. A fração aquosa foi levada a resíduo em banho-maria fervente e retomada com 10,0ml de acetato de etila. Esta solução foi filtrada em papel de filtro comum e levada novamente a re-

síduo em banho-maria. A seguir foi retomada com metanol e filtrada por filtro de membrana de politetrafluoretileno de porosidade 0,25 μ m (FALP, MILLIPORE). O volume foi completado à 5,0ml.

Os extratos purificados foram reservados para análise cromatográfica

2.2.4.5 Análise quantitativa

2.2.4.5.1 Curva de calibração: preparo da solução padrão de ácido gálico

Para o desenvolvimento da curva de calibração pelo método da cromatografia em camada delgada associada a espectroscopia no ultravioleta (CCD/UV) utilizou-se solução padrão de 1,0mg/ml de ácido gálico em metanol, aplicada na forma de linha com 2cm de comprimento com auxílio de microsseringa 100 μ l de capacidade, nos volumes de 50, 70, 90, 110, 130 e 150 μ l.

Após desenvolvimento, áreas de 6,0cm² correspondentes as manchas do padrão foram raspadas do cromatograma. A extração do padrão foi realizada com metanol à frio em agitador mecânico por 60min.

As soluções foram filtradas por filtros de membrana de politetrafluoroetileno de porosidade de 0,25 μ m (FALP, MILLIPORE), completando-se a 10,0ml com o mesmo solvente.

Paralelamente ao desenvolvimento cromatográfico, diluiu-se 50, 70, 90, 110, 130 e 150ml da solução padrão de ácido gálico à 10,0ml com metanol e determinaram-se as absorvâncias em espectrofotômetro UV a 273nm.

2.2.4.5.2 Doseamento do EMP e ETP

Soluções amostras obtidas dos turbolizados e macerados, preparadas segundo item 2.2.4.4, foram aplicadas seguindo-se a mesma metodologia utilizada para cromatografar e dosear a solução padrão, aplicando-se porém um volume de 400µl.

As concentrações de ácido gálico nos EMP e ETP foram calculadas a partir das equações da reta determinada pelas curvas padrão, através da equação

$$C_{AG} = \frac{(A - a)}{b} \quad (3)$$

onde:

C_{AG} = concentração de ácido gálico nas amostras (µg/ml)

A = absorvância do AG na amostra

a = intersecção da reta com o eixo Y

b = inclinação da reta.

Os resultados correspondem a média de 5 determinações.

O método CCD/UV foi validado pela análise estatística das absorvâncias do padrão.

2.2.5 Estandarização do extrato

2.2.5.1 Avaliação do comportamento do extrato em relação ao tempo de maceração

Os extratos obtidos a partir de 10g de raízes moídas (0,315-0,630) com etanol a 50% (V/V) foram macerados em temperatura ambiente, 22°C ± 4°C, nos seguintes tempos de maceração:

3, 5, 7, 9, 10, 14, 15, 19, 21 dias. A avaliação do comportamento dos extratos foi realizada através do doseamento do AG por CCD associada a espectroscopia do UV, utilizando-se o mesmo sistema empregado no item 2.2.4.3 e 2.2.4.5.

2.2.5.2 Análise fatorial

2.2.5.2.1 Projeto fatorial

A partir dos experimentos realizados procurou-se avaliar a influência de certos fatores sobre a qualidade de extratos de *Limonium brasiliense* (Boiss) Kuntze. Para tal, utilizou-se projeto fatorial do tipo 2^n , empregando-se 3 fatores, onde cada fator recebe dois níveis, denominados de nível superior (+) e nível inferior (-).

Para o procedimento deste projeto fatorial escolheram-se 3 fatores, como segue:

FATOR A: Teor etanólico do líquido extrativo (%; V/V);

FATOR B: Granulometria da matéria-prima vegetal (mm);

FATOR C: Tempo de maceração (dias).

Para cada um dos 3 fatores, estabeleceram-se 2 níveis, como sendo:

FATOR A: 50 (-) e 70% (+)

FATOR B: 0,630-0,315 (-) e 0,800-0,630mm (+)

FATOR C: 5 (-) e 10 dias (+).

Com os fatores e níveis pré-estabelecidos fez-se o planejamento para a realização dos experimentos como demonstra a Tabela 1.

A ordem de sucessão que se segue para a realização destes experimentos foi determinada ao acaso, para evitar uma possível aparição de erros sistemáticos (LIST & SCHMIDT, 1984).

Cada experimento foi realizado com $n = 5$.

TABELA 1 - Combinações dos fatores para realização dos experimentos.

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

2.2.5.2.2 Avaliação do projeto fatorial

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

- Determinação do pH: como descrito em 2.2.4.1.

Os resultados correspondem a média de cinco determinações.

- Densidade: como descrito em 2.2.4.2.

Sendo que os resultados correspondem a média de cinco determinações.

- Resíduo seco: como descrito em 2.2.1.7.

Os resultados foram calculados com relações a 100g do extrato, representados pela média de cinco determinações.

- Quantificação do AG por CCD/UV a partir dos macerados purificados como descrito nos itens 2.2.4.4 e 2.2.4.5.2.

Os valores obtidos na determinação quantitativa representam a média de cinco determinações por extrato.

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 2) 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 4, 5 e 6).

As interações (efeitos entre os 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 7, 8 e 9).

A interação tripla calcula-se como a metade da diferença entre a interação dos primeiros dois fatores com o terceiro fator nos níveis superior e inferior (equação 10) (LIST & SCHMIDT, 1984; MELLO, 1989).

1. Efeito de A (E_A):

$$E_A = 1/4(Y_2 + Y_4 + Y_6 + Y_8) - 1/4(Y_1 + Y_3 + Y_5 + Y_7) \quad (4)$$

2. Efeito de B (E_B):

$$E_B = 1/4(Y_3 + Y_4 + Y_7 + Y_8) - 1/4(Y_1 + Y_2 + Y_5 + Y_6) \quad (5)$$

3. Efeito de C (E_C):

$$E_C = 1/4(Y_5 + Y_6 + Y_7 + Y_8) - 1/4(Y_1 + Y_2 + Y_3 + Y_4) \quad (6)$$

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

$$I_{AB} = 1/8|(Y_1 + Y_4 + Y_5 + Y_8) - (Y_2 + Y_3 + Y_6 + Y_7)| \quad (7)$$

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

$$I_{AC} = 1/8|(Y_1 + Y_3 + Y_6 + Y_8) - (Y_2 + Y_4 + Y_5 + Y_7)| \quad (8)$$

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

$$I_{BC} = 1/8|(Y_1 + Y_2 + Y_7 + Y_8) - (Y_3 + Y_4 + Y_5 + Y_6)| \quad (9)$$

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

$$I_{ABC} = 1/8|(Y_2 + Y_3 + Y_5 + Y_8) - (Y_1 + Y_4 + Y_6 + Y_7)| \quad (10)$$

2.2.5.2.3 Análise de variância do projeto fatorial

Para a avaliação estatística, foram utilizados os valores de concentração de AG obtidos na quantificação por CCD/VV.

Foi empregado na análise de variância o teste F, seguido do método de TUKEY (GUPTA & MATHAI, 1980).

Para a confecção do quadro de análise de variância, efetuou-se os cálculos para os contrastes dos efeitos obtendo-se a soma dos quadrados (SQ) e o quadrado médio (QM), alcançando o valor de F, que então, foi comparado com o valor de F tabelar.

Os cálculos acima, foram baseados no projeto matriz apresentado na Tabela 2.

O programa STATITCF de análise de variância foi utilizado para obtenção do teste F, dos resíduos suspeitos (método

de GRUBBS) (THE UNITED STATES PHARMACOPOEIA, 1980). Este programa oferece ainda o teste de NEWMAN-KEULS cujo objetivo é mostrar a presença ou não de grupos homogêneos.

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

TRATAMENTOS	EFEITOS			INTERAÇÕES				RESULTADO DO 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

Para a realização do teste de TUKEY verificou-se inicialmente a diferença entre as médias obtidas nos tratamentos ou seja: $\bar{X}_1 - \bar{X}_a$; $\bar{X}_1 - \bar{X}_b$; ...; $\bar{X}_{bc} - \bar{X}_{abc}$. Determinada a diferença entre as referidas médias, observou-se quais as diferenças iguais ou superiores ao valor encontrado em relação a dms , cuja fórmula empregada encontra-se a seguir:

$$dms = q \cdot \frac{s}{\sqrt{r}} \quad (\text{diferença mínima significativa}) \quad (11)$$

onde:

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

r = número de níveis empregados

n = número de macerados, e

α = nível de significância (0,05);

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

r = número de repetições em cada tratamento.

2.2.5.3 Cálculos estatísticos

Para análise estatística dos pares de variáveis entre os quais presumiu-se haver dependência linear, calculou-se os coeficientes de regressão linear e a correlação linear de Pearson (r). Sobre esta foram testadas as hipóteses através da distribuição t de Student.

Utilizou-se ainda a distribuição t para comparar as médias de amostras independentes.

Todos os cálculos citados acima, foram elaborados utilizando-se os programas, escritos em linguagem **BASIC**, compatíveis com o microcomputador PC-1211 - RP da Sharp (MELLO, 1989).

2.2.6 Ensaios preliminares para o estudo da estabilidade do extrato standardizado

Amostras contendo 10ml do extrato standardizado, obtido a partir de 10g (m/V) de raízes moidas (0,315-0,630) e maceradas com etanol 50% (V/V), durante 10 dias, foram acondicionadas em frascos âmbar com tampa de plástico rosqueável e submetidas às temperaturas de 40° e 60°C em estufas termostatizadas, mantendo um grupo controle em geladeira a 4°C.

A avaliação da estabilidade do extrato foi realizada, em períodos estabelecidos de 0, 1, 6, 8, 10, 14, 20, 21 dias de ar-

mazenamento, através da quantificação de ácido gálico por CCD/UV.

Soluções de ácido gálico a 1,0mg/ml em etanol a 50% (V/V) armazenadas a 4°C foram analisadas em paralelo aos zero, 10 e 22 dias de armazenamento.

Para cada extrato bem como solução padrão foram observadas variações de pH e coloração, sendo que para a coloração foram designadas quatro faixas de coloração:

- castanho avermelhado
- castanho claro
- castanho escuro
- vermelho acastanhado.

3. RESULTADOS

3.1 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA

3.1.1 Caracterização botânica

A raiz do *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze é cilindro-cônica, tortuosa, de 5 a 10mm de diâmetro, sua superfície externa, de cor pardo-chocolate, é enrugada no sentido longitudinal, mais ou menos profundamente estriada e apresenta numerosas cicatrizes verrugosas deixadas pela queda das radículas. Sua secção transversal apresenta quatro camadas bem distintas: uma fina camada suberosa pardo-negra; uma zona cortical, de cor pardo avermelhada, bastante espessa, salpicada de pequenos pontos pardos; uma zona lenhosa, separada da casca por um linha escura e dotada de estrias radiais muito aparentes, que vão da medula, geralmente um pouco excêntrica, volumosa e da mesma cor que a zona cortical.

Esta raiz possui sabor salgado e fortemente adstringente. A superfície interna após coleta apresentou coloração esbranquiçada, tomando em seguida (minutos) coloração rosada, que vai intensificando até rosa-escuro. Esta observação já havia sido feita por MOURA (1984).

Através da análise microscópica da raiz (Figura 1) foi possível definir as camadas supra-citadas, onde se verifica uma

fina camada suberosa pardo-negra formada de células tabulares e regularmente superpostas em filas radiais. O parenquima cortical é de cor pardo avermelhada de paredes espessas e caniculadas, isoladas ou reunidas em pequenos grupos, salpicada de pequenos pontos pardos e constituído por células irregulares apresentando raras células esclerosas. O líber é dividido em feixes cuneiformes compostos de vasos disseminados, ora em tecido fibroso ora em parênquima lenhoso; esses feixes são separados por largos raios medulares, que se separam da medula e vão se perder no parênquima cortical. A medula apresenta a mesma estrutura que o parênquima cortical e encerra também algumas células esclerosas (PHARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1926; DIAS DA SILVA, 1920 e REITZ, 1965).

3.1.2 Caracterização química preliminar

Reação com acetato de chumbo e ácido acético: precipitado branco gelatinoso quando adicionado o ácido acético, indicando a presença de taninos hidrolisáveis.

Teste de Procter-Paessler: a solução corou-se de rosa comprovando a presença de ácido elágico ligado.

Reação com vanilina clorídrica: a coloração róseo-avermelhada formada imediatamente após adição do ácido clorídrico é característica para taninos condensados.

Reação com sais de ferro: com a adição de cloreto férrico à solução, inicialmente houve o aparecimento de coloração azul. Deixando em repouso esta solução, observou-se a formação de um precipitado azul com solução sobrenadante verde amarelada.

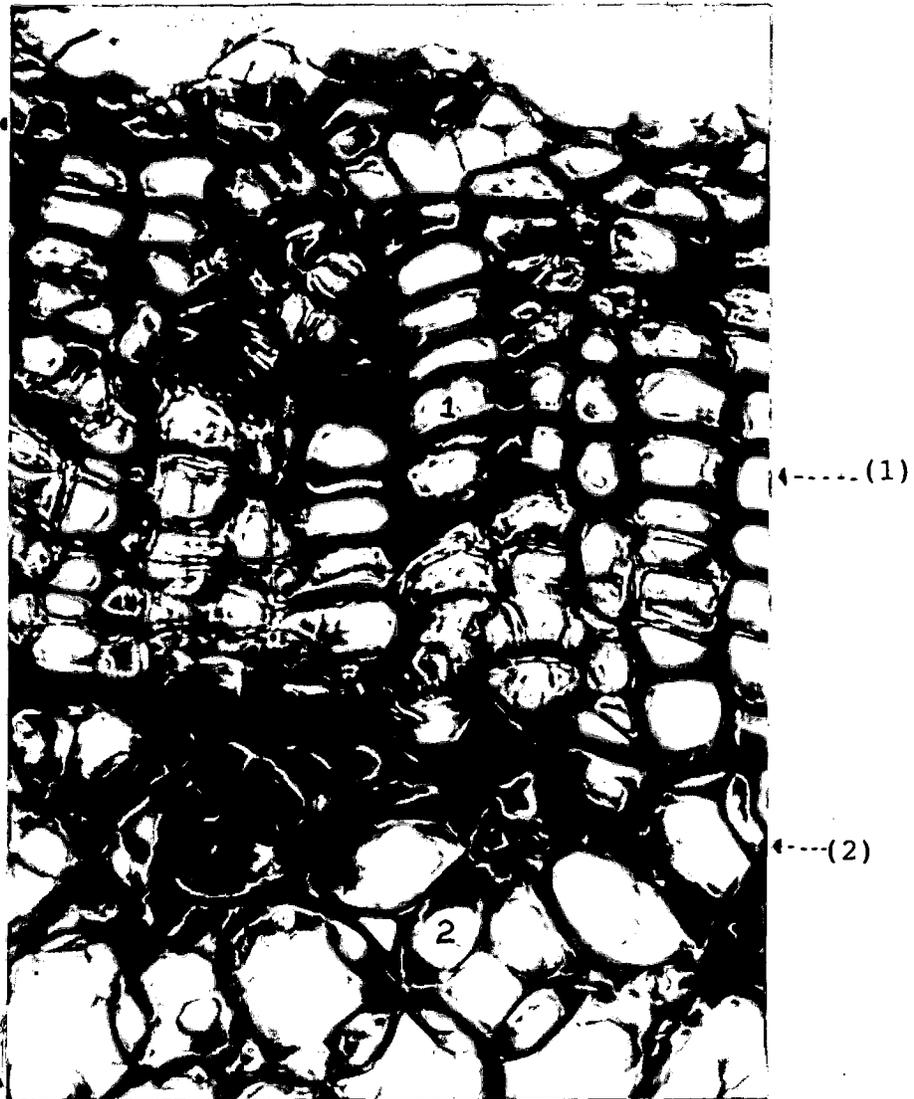


FIGURA 1 - Corte transversal da raiz do *Limonium brasiliense*.
(1) Suber; (2) parênquima cortical.

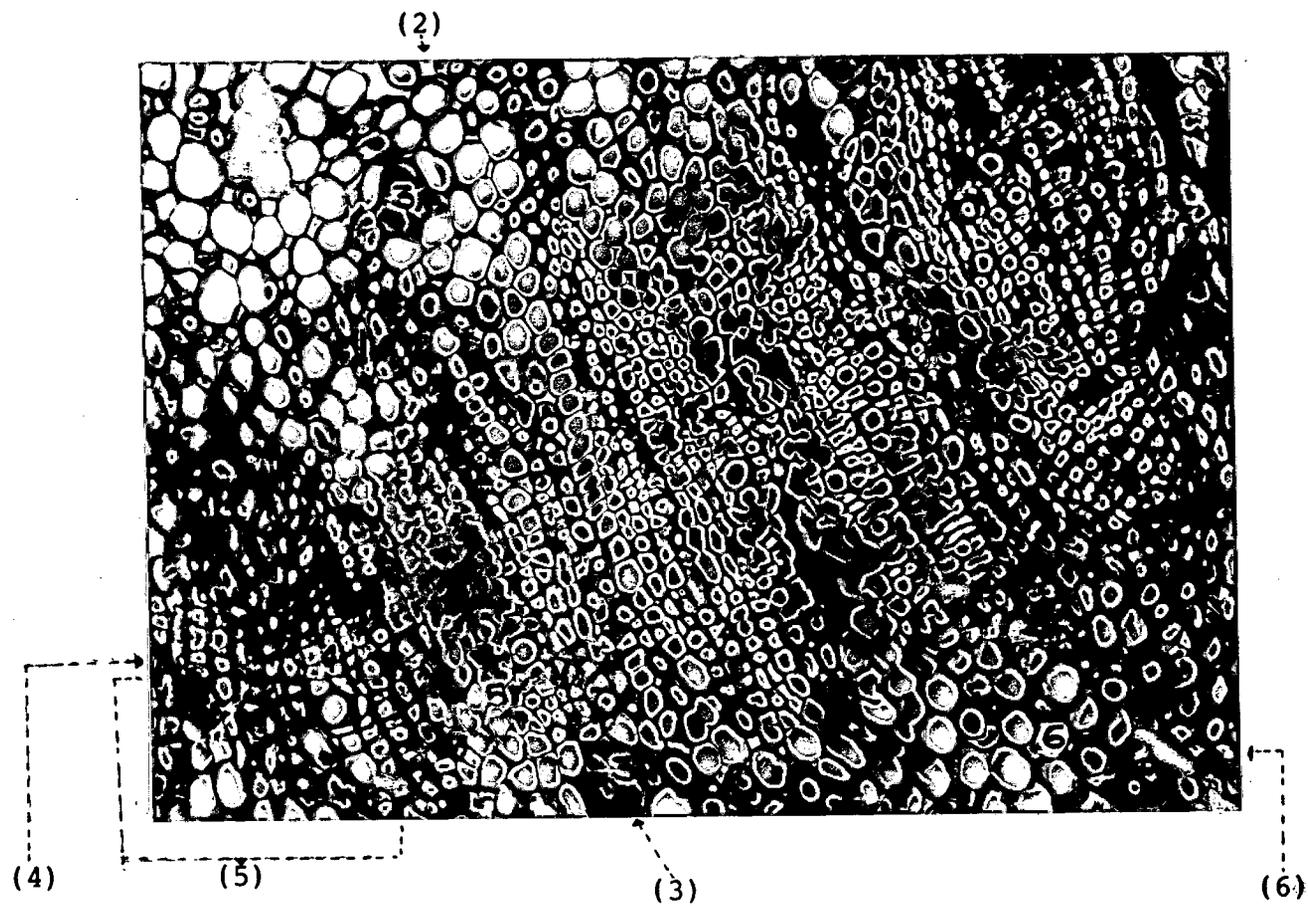
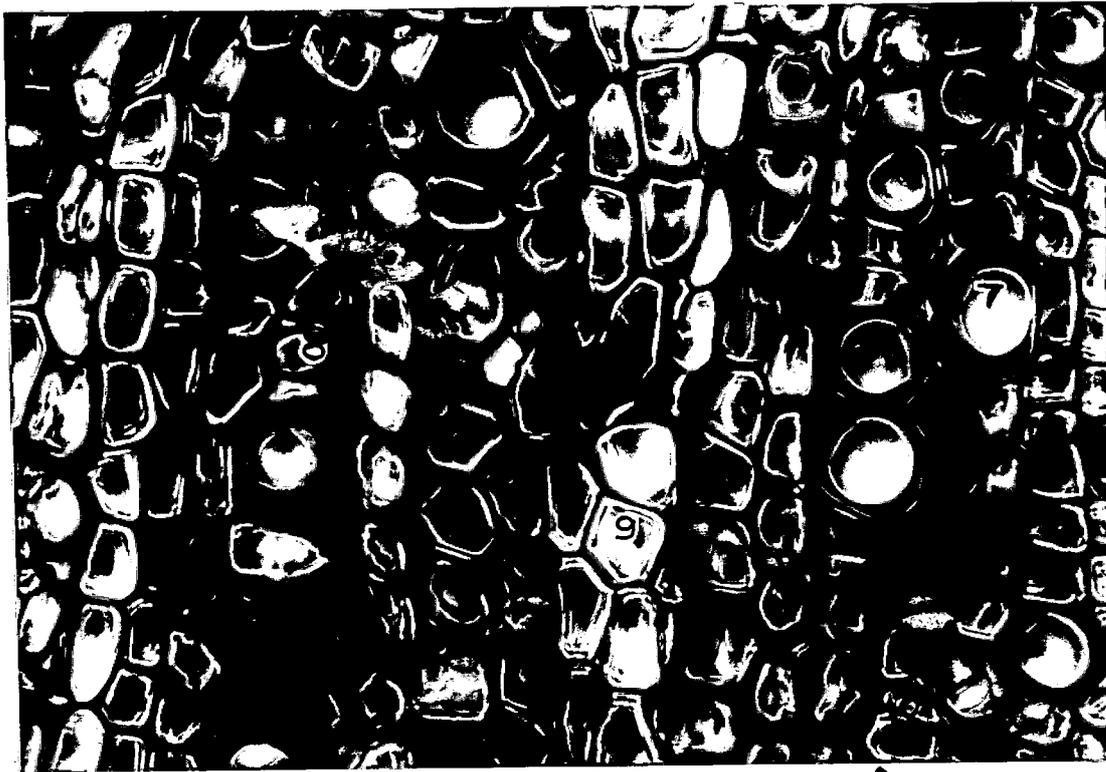


FIGURA 2 - Corte transversal da raiz do *Limonium brasiliense*. (2) Parênquima cortical; (3) células esclerosas; (4) câmbio vascular; (5) lenho; (6) medula.



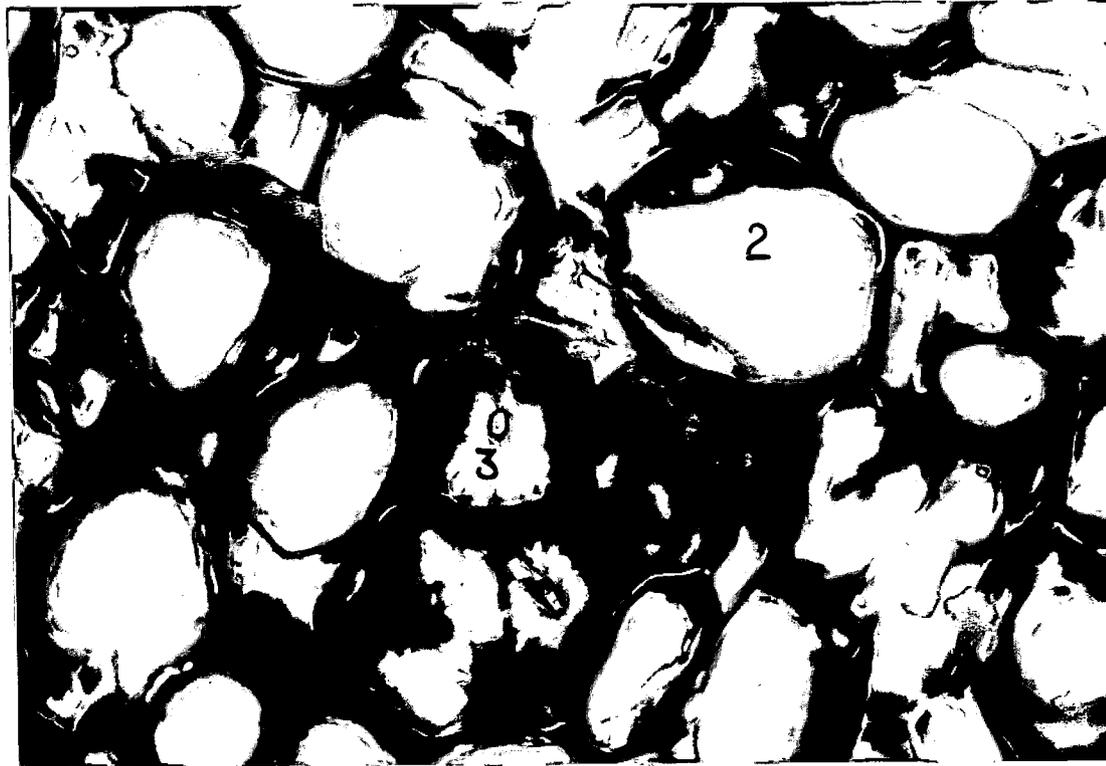
(7)

(8)

(9)

(10)

FIGURA 3- Corte transversal da raiz do *Limonium brasiliense*. Lenho mostrando um feixe cuneiforme, com vasos disseminados entre tecido fibroso e parênquima lenhoso, separados por raios medulares. (7) vasos; (8) feixes; (9) raios medulares e (10) parênquima lenhoso.



(2) e (3)

FIGURA 4; - Corte transversal da raiz do *Limonium brasiliense*. (2) parênquima cortical; (3) células esclerosas.

A coloração azul é própria de taninos hidrolisáveis e a verde de taninos condensados.

Reação com ácido clorídrico: formação de precipitado róseo-avermelhado indicativo da presença de taninos condensados.

As reações acima citadas, foram utilizadas para caracterizar a presença de taninos no extrato. Observou-se a presença tanto de taninos hidrolisáveis como taninos condensados.

3.1.3 Tratamentos prévios da droga

As raízes cortadas foram submetidas a três diferentes ensaios com a finalidade de determinar qual é o melhor procedimento para inativação enzimática e secagem.

A porção inicial submetida a vapores etanólicos, em autoclave, apresentou-se no final dos 60min com coloração vermelho-violáceo escurecida, mantendo esta coloração após secagem em estufa de ar circulante.

Foi possível ainda observar a presença de fungos neste material, decorridos dois dias do término da secagem.

A segunda parte submetida a secagem em estufa de ar circulante não apresentou nenhuma alteração na cor e cheiro, mostrando-se inalterada, sem ser visível ataque de fungos, no passar dos dias.

A terceira parte submetida a estufa a vácuo apresentou grande dificuldade de secagem com formação de fungos e leve alteração na coloração, passando a róseo-violáceo.

3.1.4 Perda por dessecação (WOJAHN, 1951)

TABELA 3 - Perda por dessecação do material fresco.

MATERIAL VEGETAL	n	PERDA POR DESSECAÇÃO	
		(%; m/m)	CV (%)
Raízes	3	70,45 ± 0,54	0,77

3.1.5 Teor de extrativos

O teor de extrativos obtido aplicando a fórmula dada no item 2.2.1.6, a partir de 1,010g da droga, resultante de um resíduo seco de 0,0715g foi de 35,4% (m/m), $\pm s=0,2500$ e $CV\% = 0,71$.

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

O resultado expressa a média de 5 determinações de resíduo seco.

3.1.6 Análise granulométrica

TABELA 4 - Análise granulométrica por tamisação das raízes de *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze, rasuradas.

ABERTURA DE MALHA m (mm)	CLASSE GRANULOMÉTRICA m min - m max (mm)	ABERTURA MÉDIA m (mm)	FRAÇÃO RESÍDUO FR (%)	FRAÇÃO RETIDA R (%)	FRAÇÃO DE PASSAGEM P (%)
2,000	2,000 — 2,500	2,2500	2,30	2,30	97,70
1,600	1,600 — 2,000	1,8000	11,00	13,30	86,70
1,250	1,250 — 1,600	1,4250	19,10	32,40	67,60
1,000	1,000 — 1,250	1,1250	15,50	47,90	52,10
0,800	0,800 — 1,000	0,9000	9,40	57,30	42,70
0,630	0,630 — 0,800	0,7150	9,70	67,00	33,00
0,500	0,500 — 0,630	0,5650	5,00	72,00	28,00
0,315	0,315 — 0,500	0,4080	8,00	80,00	20,00
Coletor	0 — 0,315	0,1580	20,00	100,00	0

3.1.7 Determinação de taninos precipitáveis por caseína

A concentração de taninos calculada como ácido gálico, $Q = 11,78\%$ (m/m), $\pm s = 0,1202$ e $CV\% = 1,02$ foi obtida empregando-se a equação (2), a partir dos seguintes dados obtidos:

- $A_{1a720nm} = 0,326$

- $A_{2a720nm} = 0,029$

- $A_{v720nm} = 0,711$

- $e = 300\text{mg}$

- $e_v = 50\text{mg}$

- $t = 70,45\%$.

3.1.8 Avaliação da estabilidade durante armazenamento

Após sete dias de acondicionamento, as amostras tornaram-se escurecidas (castanho avermelhada). As mesmas quando avaliadas qualitativamente em paralelo com a droga acondicionada em sacos de papel pardo ao abrigo da luz, apresentaram redução na formação de precipitados e uma menor intensidade na coloração das soluções quando comparada a segunda.

3.2 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

A caracterização da droga através da cromatografia em camada delgada está representada nas Figuras 5 e 6.

3.2.1 Análise cromatográfica da matéria-prima

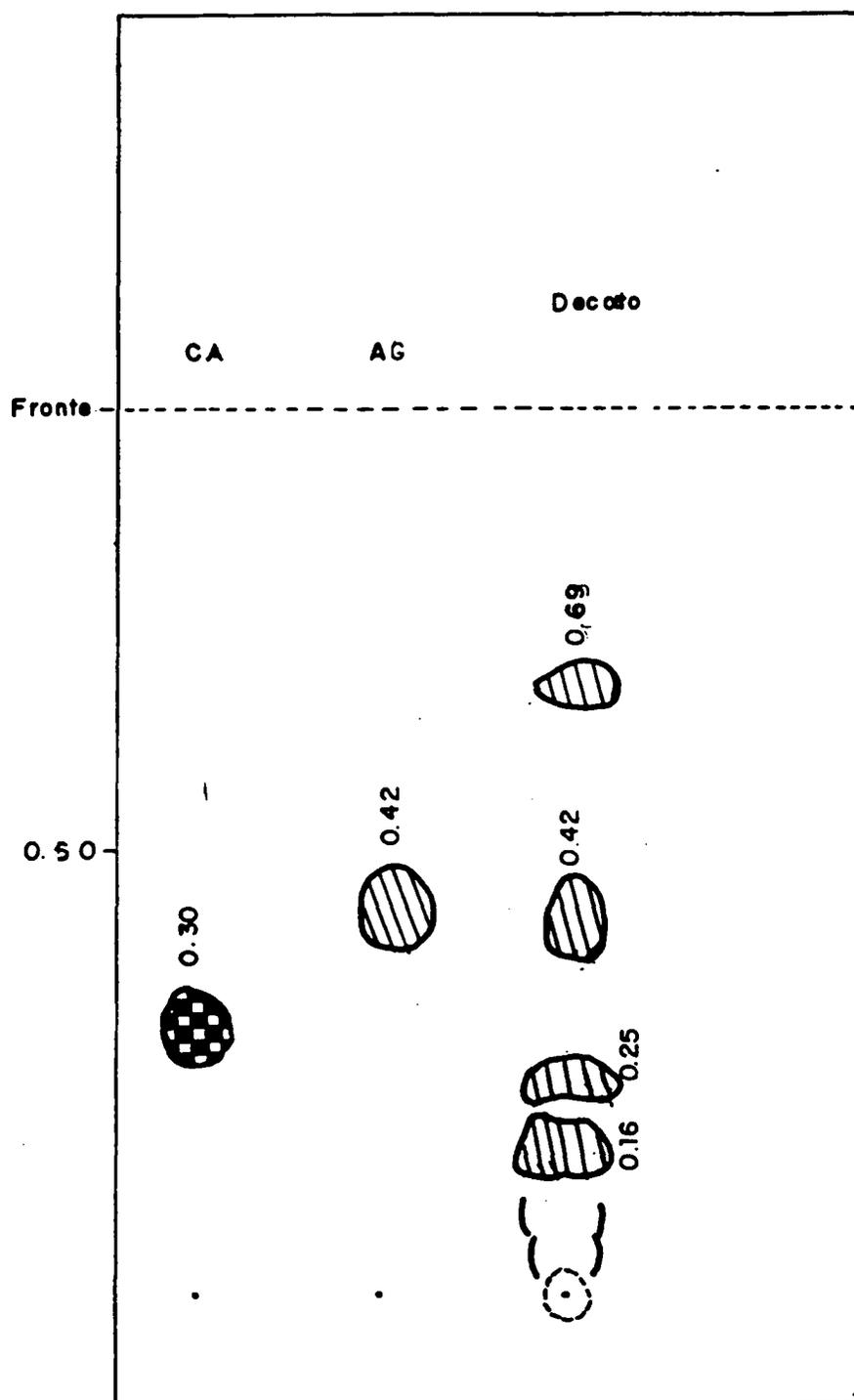


FIGURA 5 - Análise cromatográfica, no sistema 3, do decocto 10% e das substâncias referência, ácido gálico (AG) e catequina (CA);  Azul e  Verde quando revelados com cloreto férrico/ferricianeto de potássio.

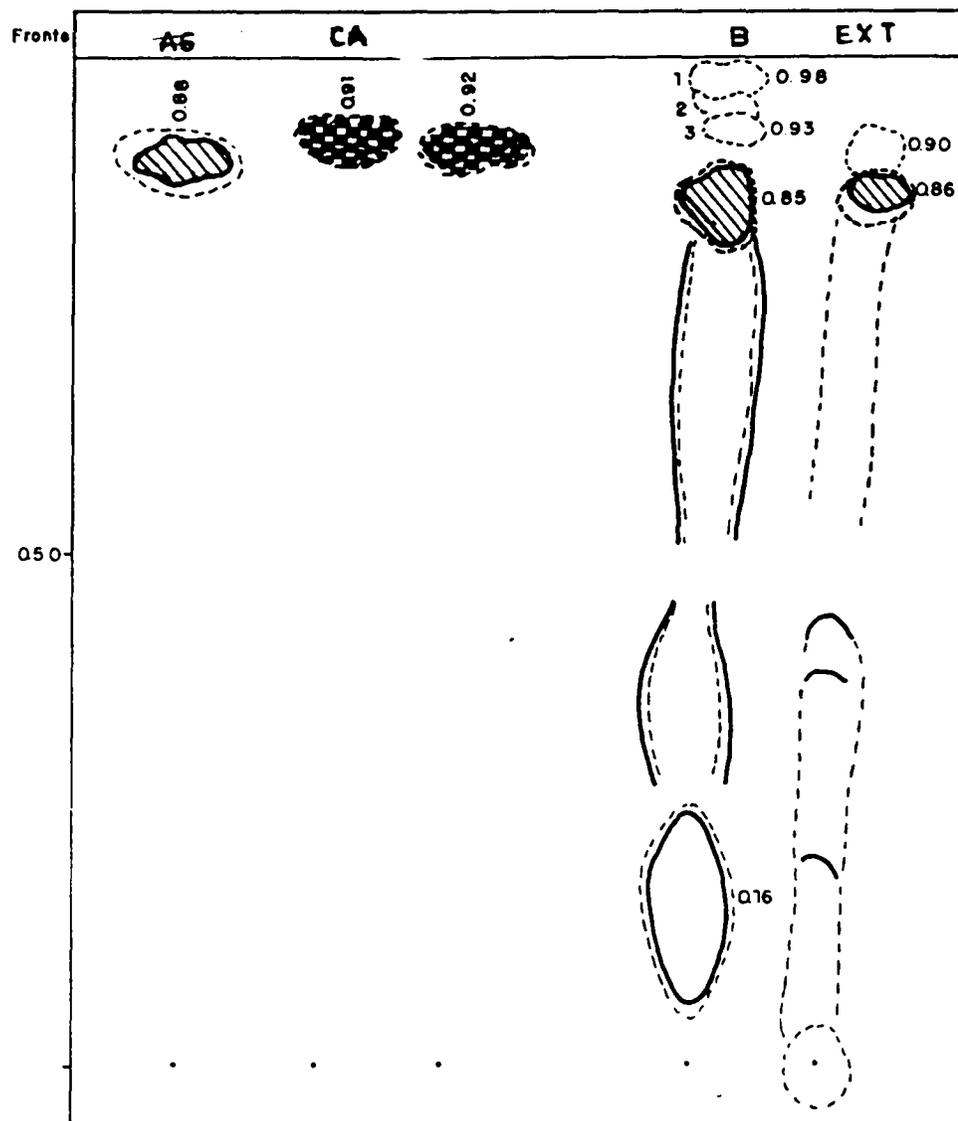


FIGURA 6 - Análise cromatográfica, no sistema 6 da solução B e das substâncias referência ácido gálico (AG), catequina (CA), epicatequina (EP) e extrato bruto (EXT); \bigcirc Visível no UV₃₆₆, \square Visível no UV₂₅₄, ▨ Azul com cloreto férrico/ferricianeto de potássio, \blacksquare Verde com cloreto férrico/ferricianeto de potássio, 1 - amarela, 2 - branco, 3 - azulado.

3.2.2 Análise cromatográfica do turbolizado, segundo o método de purificação

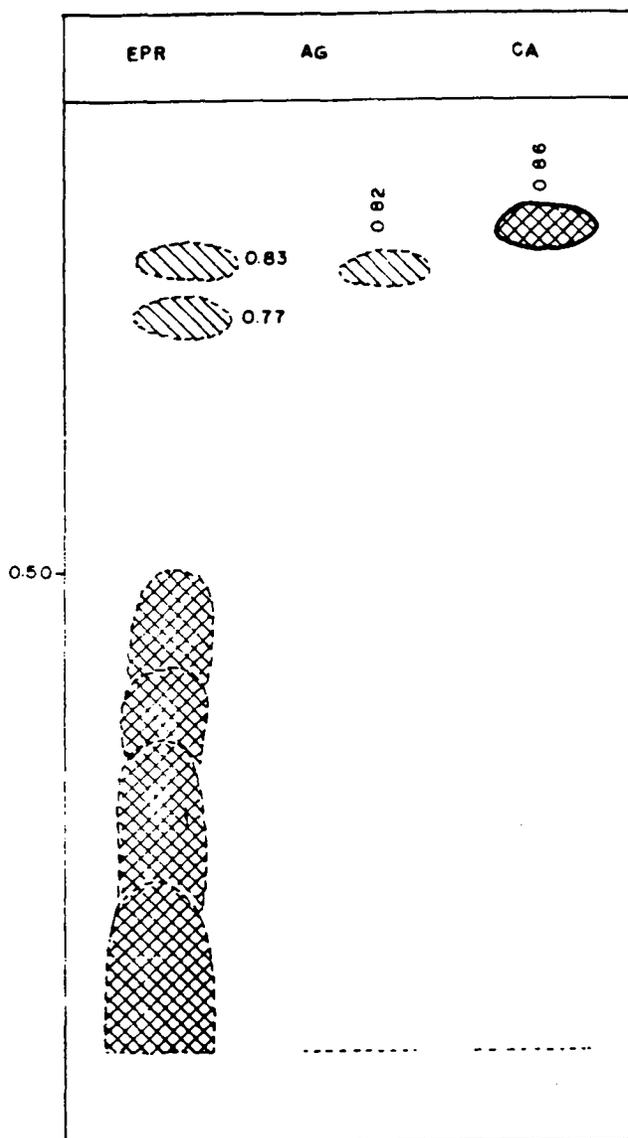


FIGURA 7 - Análise cromatográfica no sistema 4, do turbolizado purificado pelo método R (EPR) e das substâncias referência ácido gálico (AG) e catequina (CA),  Visível no UV;  Azul com cloreto férrico;  Rósea com vanilina clorídrica.

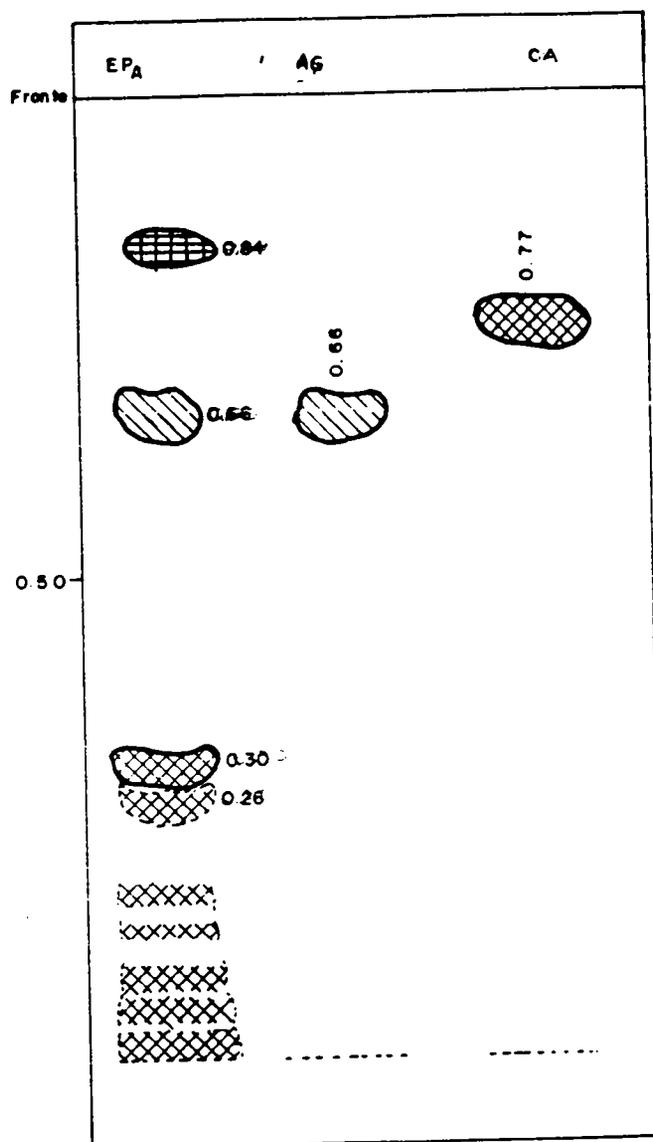


FIGURA 8 - Análise cromatográfica no sistema 5 do turbolizado purificado pelo método A (ETP_A) e das substâncias referência ácido gálico (AG) e catequina (CA);  Rósea com vanilina clorídrica;  Azul com cloreto fêrrico e escura no UV₂₅₄;  Azul claro após ativação da placa nebulizada com vanilina clorídrica UV₃₆₆.

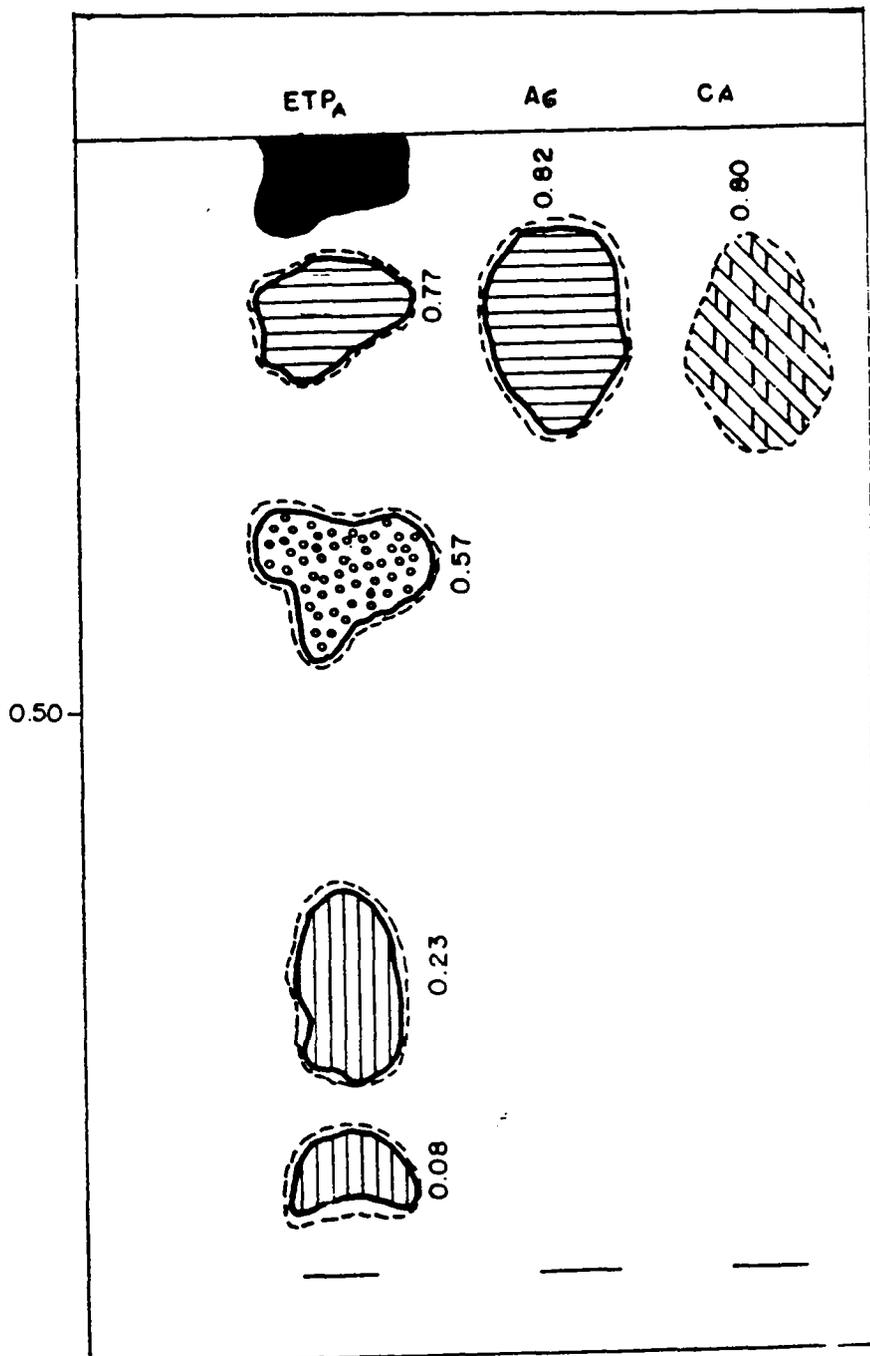


FIGURA 9 - Análise cromatográfica, no sistema 2, do turbolizado purificado pelo método A (ETPA) e das substâncias referência ácido gálico (AG) catequina (CA); \odot Visível UV₂₅₄; \bigcirc Azul UV₃₆₆; e com NH₃/NaOH 0,1 N obtiveram-se os seguintes resultados: ▬ Azul esverdeado; ⦿ Vermelho tijolo; ▮ Castanho; ■ Laranja; ▨ Salmão.

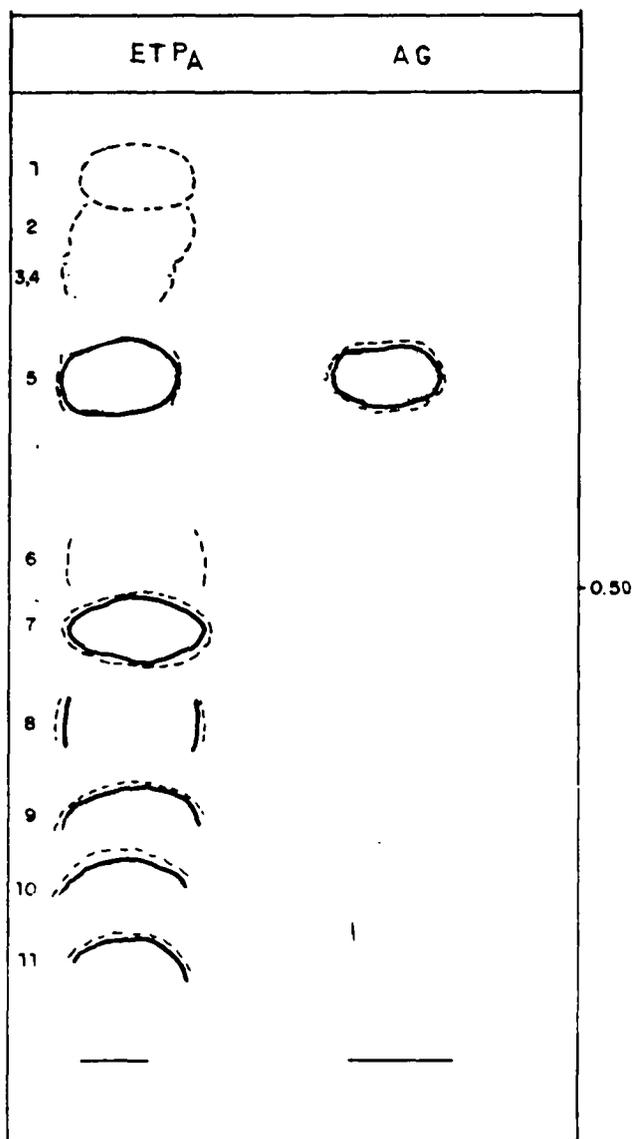


FIGURA 10- Análise cromatográfica, no sistema 8, do turbolizado pelo método A (ETPA) e substância referência ácido gálico (AG). Condições cromatográficas segundo Tabela 5.

3.2.3 Espectros no ultravioleta de ácido gálico obtido por dois métodos de purificação do ETB

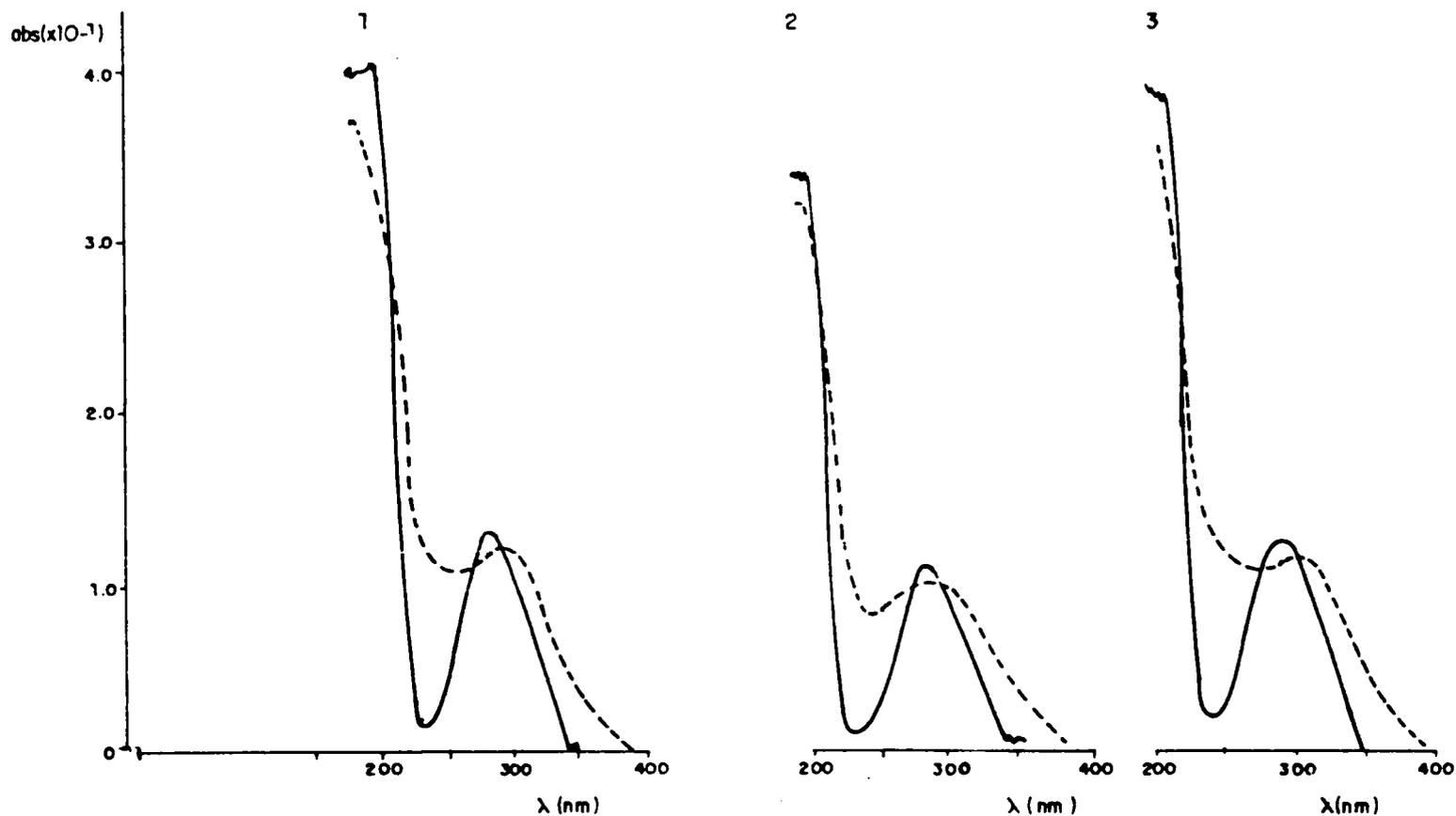


FIGURA 11 - Espectros no ultravioleta de ácido gálico após separação por CCD e extração com metanol. 1. Ácido gálico padrão, 2. ácido gálico isolado do extrato purificado pelo método R, 3. ácido gálico isolado do turbolizado purificado pelo método A; antes (—) e após (---) adição de NaOH.

3.2.4 Espectro no ultravioleta da substância R nos ET purificados pelo método R

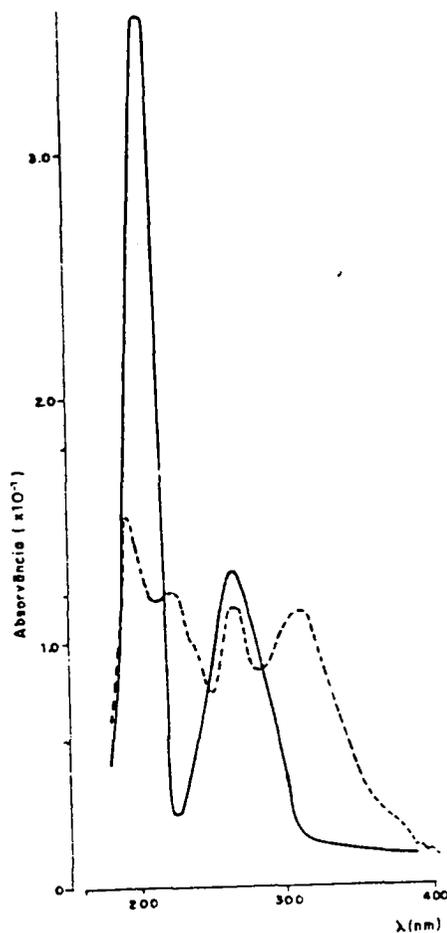


FIGURA 12- Espectro no ultravioleta da substância R, isolada do turbolizado purificado pelo método R após separação por CCD e extração com metanol; antes (---) e após adição de NaOH (—).

O espectro ultravioleta da substância R mostra $\lambda_{\text{Max}}^{\text{MeOH}}$; 273nm, com deslocamento típico para compostos fenólicos em meio alcalino, apresentando $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH} + \text{NaOH}}$; 320, 274, 235 e 218sh nm.

3.2.5 Cromatografia em camada delgada em celulose microcristalina, do ETP

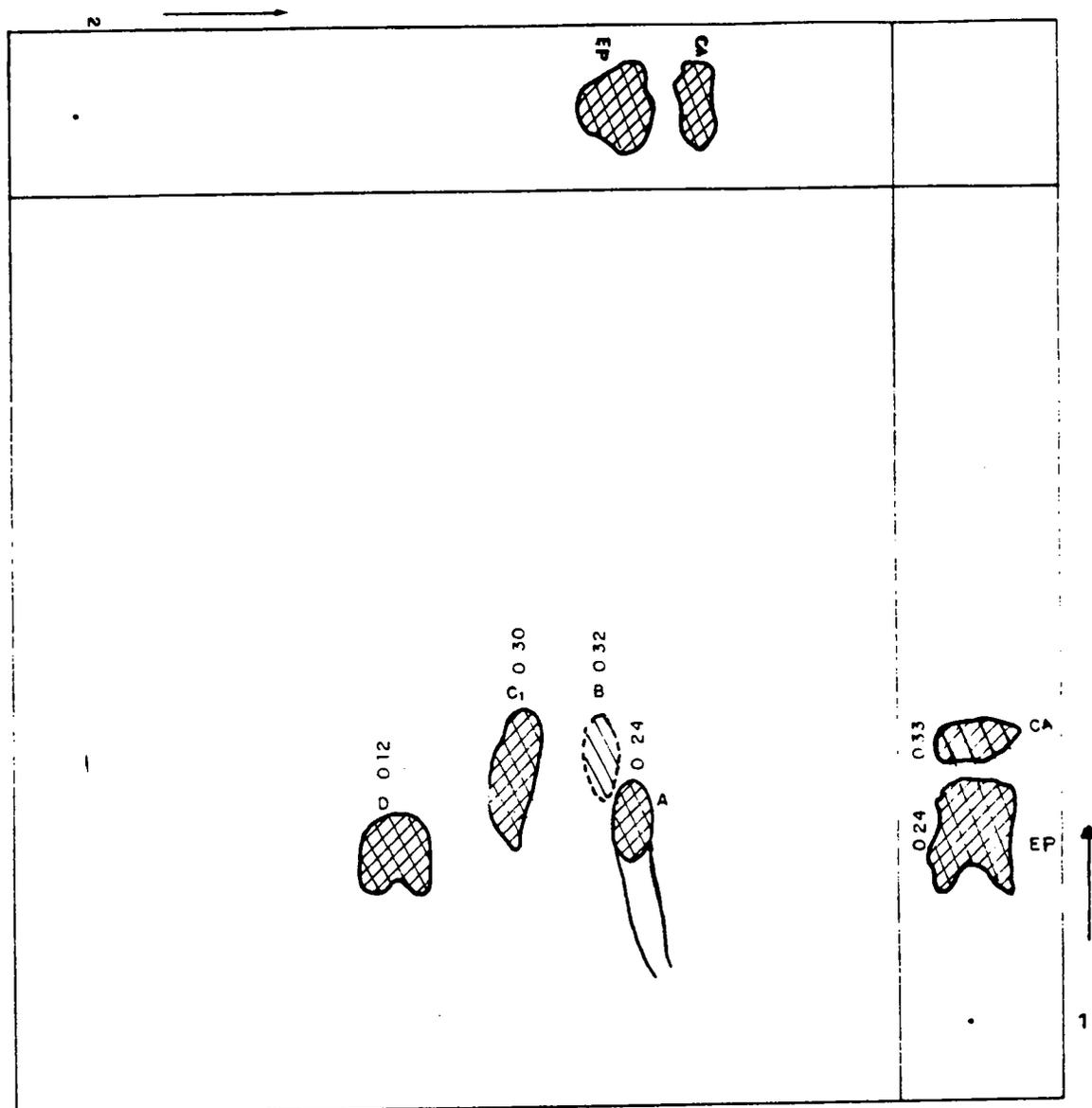


FIGURA 13 - Cromatografia bidimensional, sistema 1, do ETP, das substâncias referência catequina (CA), epicatequina (EP); ○ Azul no UV₂₅₄; ⊗ = Rosa com vanilina clorídrica; ▨ = Azul com cloreto férrico.

3.2.6 Cromatografia em papel do ETP

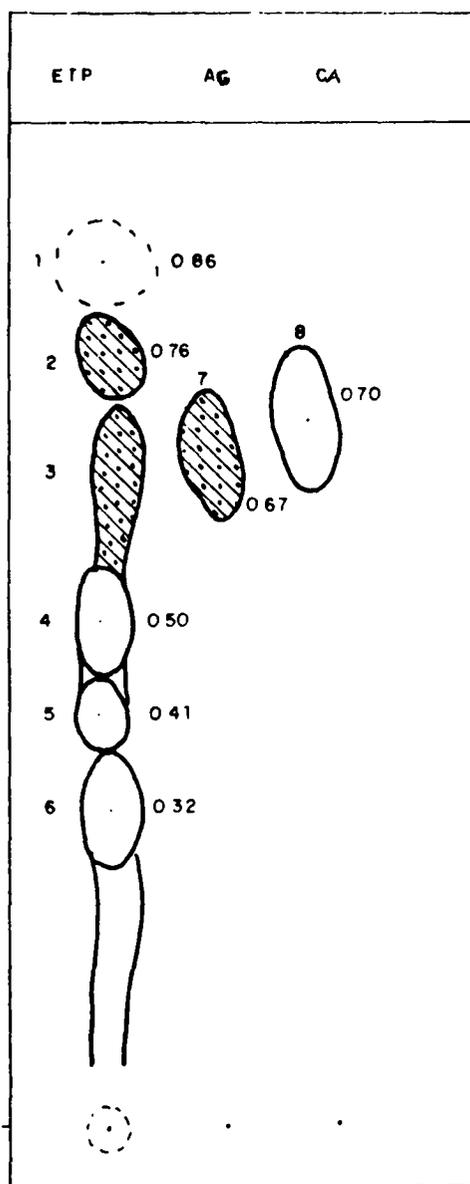


FIGURA 14 - Análise cromatográfica, no sistema 7, do turbolizado purificado (ETP) e das substâncias referência ácido gálico (AG), catequina (CA); ○ azul no UV₃₆₆; □ Visível em UV₂₅₄; ▨ Azul brilhante com reagente natural A e lilás no UV₂₅₄.

3.2.7 Análise cromatográfica dos macerados

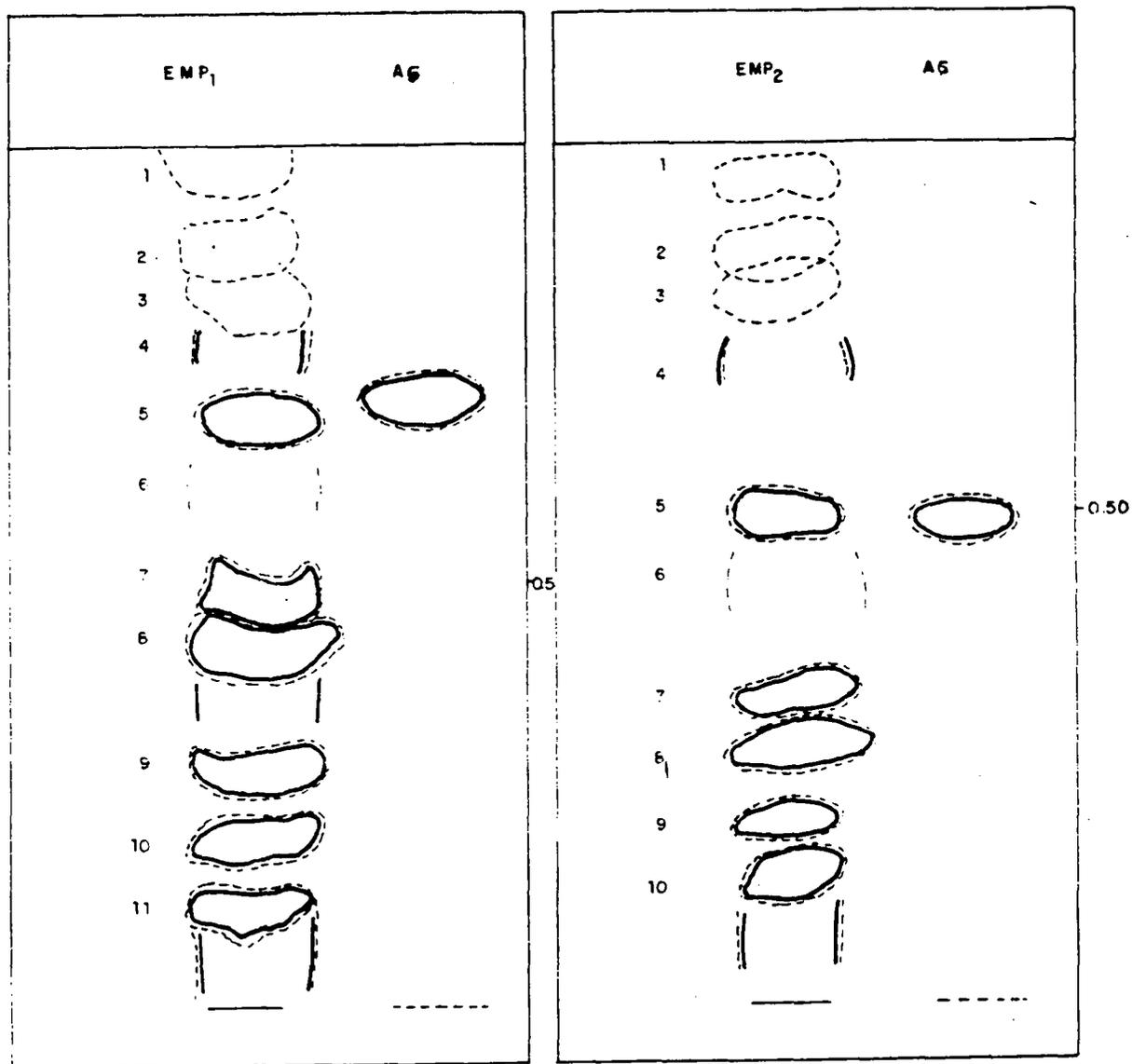


FIGURA 15 - Análise cromatográfica dos macerados 70% (EMP₁) e 50% (EMP₂) e substância referência ácido gálico (AG), em Silicagel GF₂₅₄, eluente: diclorometano: ácido fórmico: etanol (40:4:10). Veja explicações na Tabela 5.

TABELA 5 - Comportamento das zonas cromatográficas dos EMP₁, EMP₂ (veja Figura 12) e ETP (Figura 7) frente a diversos sistemas de detecção.

Sistema cromatográfico: Diclorometano: ácido fórmico: etanol (40:4:10), CCD em silicagel GF₂₅₄.

SPOTS	NH ₃ /UV	UV ₃₆₆	UV ₂₅₄	SOLUÇÃO METANÓLICA DE NaOH/UV	NaOH/FeCl ₃	AlCl ₃ UV	VANILINA	VISÍVEL
1	Verde	Verde	-	Amarelo limão	-	-	-	-
2	Amarelo	Amarelo fosco	-	Amarelo fosco	-	Salmão	-	Salmão
3	Azul claro	Azul claro	-	Azul claro	-	Verde	-	-
4	Azul esverdeado	Azul claro	Escura	Azul esverdeado	Amarelo pálido	-	-	-
5	Azul	Azul intenso	Escura	Amarelo fosco	Azul amarelado	Azul esverdeado	-	levemente amarelado após 1h
6	-	Branco amarelado	-	-	-	-	-	-
7	Violeta	Escura	Verde azulado	Azul claro	-	-	Róseo avermelhado	-
8	Violeta	Violeta	Escura	Verde azulado	Azul escuro	-	Rosa forte	-
9	Violeta	Violeta	Escura	Verde azulado	Azul	-	Rosa claro	-
10	Violeta	Violeta	Escura	Verde azulado	Azul violeta	-	Rosa claro	-
11	Violeta	Violeta	Escura	Verde azulado	Azul acinzentado	-	Rosa claro	-
Ácido gálico	Azul	Azul	Escura	Amarelo fosco	Azul amarelado	Azul esverdeado	-	-

3.3 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

TABELA 6 - Coloração dos extratos em função do método extrativo, concentração etanólica e tempo de extração.

EXTRATO	Concentração etanólica (% , V/V)				
	50		70		
	Tempo de extração (d)				
	0	5	10	5	10
EMB	-	castanho claro	castanho escuro	vermelho acastanhado	castanho avermelhado
ETB	castanho escuro	-	-	-	-

Passados os 5 e 10 dias de maceração, os extratos foram acondicionados em vidros com tampa de borracha hermeticamente fechados. Não foram observados turvação e sedimentação até 4 meses de armazenamento em geladeira. A partir deste tempo o sedimento formado não ultrapassou 2mm de altura.

Para o turbolizado (ETB) o sedimento formado foi isolado e submetido a uma análise qualitativa com os reagentes já citados no item 2.2.1.2 apresentando reação positiva para vanilina clorídrica dada pela coloração "pink" intensa passando à vermelha.

3.4 CARACTERIZAÇÃO DO TURBOLIZADO (ET)

3.4.1 Determinação do pH

TABELA 7 - Valores do pH para o turbolizado (ETB) e para os solventes, n = 5.

ÁGUA $\bar{X} \pm s$ (CV%)	ETANOL $\bar{X} \pm s$ (CV%)	ÁGUA: ÁLCOOL (50%) $\bar{X} \pm s$ (CV%)	ETB $\bar{X} \pm s$ (CV%)
5,55±0,0707 (1,27)	6,2±0,1414 (2,28)	5,30±0,0000	5,43±0,01607 (0,31)

3.4.2 Determinação do resíduo seco

TABELA 8 - Resíduo seco para o turbolizado (ETB), n = 5.

EXTRATO	PESO DO EXTRATO (g)	RESÍDUO (g) $\bar{X} \pm s$ (CV%)	RESÍDUO SECO (%;m/m)
ETB	20,0g	0,746±0,0010 (0,134)	37,30

3.4.3 Determinação da densidade do turbolizado (ETB) através de areômetro - F. Bras. III (FARMACOPÉIA, 1977)

Para o ETB obteve-se uma densidade de 0,920 (0,01%), n=3.

3.5 DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA (CCD/UV)

3.5.1 Curva padrão de absorção de ácido gálico

TABELA 9 - Valores de absorção da solução padrão de ácido gálico determinados diretamente por UV, a 273nm, (n = 5).

Concentração de ácido gálico (µg/ml)	$\bar{A} \pm s$	UV	CV(%)
5,0	0,246 ± 0,0002		0,08
7,0	0,362 ± 0,0011		0,31
9,0	0,455 ± 0,0010		0,21
11,0	0,563 ± 0,0026		0,46
13,0	0,685 ± 0,0009		0,13
15,0	0,790 ± 0,0020		0,25

TABELA 10 - Valores de absorção da solução padrão de ácido gálico determinados por CCD/UV, a 273nm, n = 5.

Concentração de ácido gálico (µg/ml)	$\bar{A} \pm s$	UV	CV(%)
5,0	0,218 ± 0,0013		0,60
7,0	0,319 ± 0,0014		0,45
9,0	0,404 ± 0,0053		1,32
10,0	0,445 ± 0,0021		0,47
11,0	0,507 ± 0,0080		1,58
13,0	0,594 ± 0,008		1,35

3.5.2 Determinação quantitativa do ETP

TABELA 11 - Concentração de ácido gálico no turbolizado purificado (ETP) pelo método CCD/UV, (n = 5).

EXTRATO	VOLUME APLICADO (µl)	λ (mm)	ÁCIDO GÁLICO	
			$\bar{A} \pm s$ (CV%)	µg/ml $\pm s$ (CV%)
ETP	400	273	0,340 \pm 0,010 (2,94)	6,74 \pm 0,010 (0,15)

3.6 ESTANDARDIZAÇÃO DO TEMPO DE MACERAÇÃO

TABELA 12 - Concentração de ácido gálico nos macerados obtidos com etanol a 50% (V/V), após purificação em função do tempo de maceração, pelo método CCD/UV, (n=3).

Tempo de Maceração (dias)	$\bar{A} \pm s$	CV(%)	ÁCIDO GÁLICO µg/ml $\pm s$
3	0,210 \pm 0,001	0,48	4,81
5	0,246 \pm 0,004	1,63	5,57
7	0,350 \pm 0,180	2,31	7,79
8	0,414 \pm 0,001	0,24	9,16
9	0,453 \pm 0,003	0,66	10,00
10	0,481 \pm 0,123	1,18	10,60
14	0,534 \pm 0,002	0,32	11,73
15	0,525 \pm 0,200	1,90	11,55
19	0,528 \pm 0,330	2,84	11,60
21	0,523 \pm 0,190	1,72	11,50

3.7 ANÁLISE FATORIAL DOS MACERADOS (EM)

TABELA 13 - Valor do pH dos líquidos extratores e dos macerados (EM) à temperatura ambiente pela média de 5 determinações.

EM Nº	ÁGUA	ETANOL	ÁGUA:ETANOL	$\bar{X} \pm s$ (CV%)
1	5,35	4,60	4,25 ^a	5,23 \pm 0,027 (0,52)
2	5,35	5,20	5,15 ^b	5,33 \pm 0,064 (1,21)
3	5,20	4,75	4,90 ^a	5,10 \pm 0,000
4	5,35	5,20	5,15 ^b	5,17 \pm 0,058 (1,12)
5	5,42	4,72	4,30 ^a	5,18 \pm 0,000
6	6,15	5,20	5,05 ^b	5,62 \pm 0,029 (0,51)
7	6,00	4,80	5,00 ^a	5,22 \pm 0,029 (0,55)
8	5,65	5,20	5,50 ^b	5,71 \pm 0,010 (0,18)

a = concentração etanólica de 50%
 b = concentração etanólica de 70%.

TABELA 14 - Densidade dos extratos em função do método extrativo e das variáveis tempo de extração, granulometria e concentração etanólica, (n = 5).

EM Nº	DENSIDADE	
	$\bar{X} \pm s$	CV(%)
1	0,943 \pm 0,0024	0,25
2	0,901 \pm 0,0010	0,11
3	0,940 \pm 0,0006	0,06
4	0,903 \pm 0,0015	0,17
5	0,940 \pm 0,0011	0,12
6	0,902 \pm 0,0000	
7	0,943 \pm 0,0006	0,06
8	0,904 \pm 0,0005	0,06

TABELA 15 - Resíduo seco dos macerados brutos (E M B) em função da concentração etanólica do líquido extrator, da granulometria e do tempo de maceração, (n = 5).

EMB Nº	MASSA DO EXTRATO (g) $\bar{X} \pm s$ (CV%)	RESÍDUO SECO (g) $\bar{X} \pm s$ (CV%)
1	20,0015 ± 0,0048 (0,024)	0,832 ± 0,0128 (1,54)
2	20,0210 ± 0,0122 (0,061)	0,797 ± 0,0116 (1,45)
3	20,0067 ± 0,0070 (0,035)	0,864 ± 0,0346 (4,01)
4	19,2214 ± 0,1229 (0,639)	0,857 ± 0,0131 (1,53)
5	19,9987 ± 0,0072 (0,036)	0,818 ± 0,0260 (3,18)
6	20,0009 ± 0,0126 (0,063)	0,810 ± 0,0268 (3,31)
7	20,0041 ± 0,0050 (0,025)	0,880 ± 0,0376 (4,27)
8	19,4935 ± 0,1100 (0,564)	0,776 ± 0,0164 (2,11)

TABELA 16 - Concentração de ácido gálico nos macerados purificados, (EMP) em função dos fatores de extração pelo método CCD/UV (n = 5).

EMP Nº	Abs (\bar{X})	$\mu\text{g/ml} \pm s$		CV(%)
1	0,288	6,46	0,243	3,76
2	0,198	4,54	0,176	3,87
3	0,277	6,21	0,142	2,29
4	0,140	3,31	0,106	3,20
5	0,487	10,67	0,195	1,82
6	0,290	6,51	0,137	2,10
7	0,378	8,38	0,082	0,98
8	0,258	5,82	0,189	3,25

TABELA 17 - Efeitos e interações principais (E/I) calculados a partir da forma padrão sobre o pH, densidade (d), resíduo seco (RS) e concentração de ácido gálico (AG), nos macerados.

E/I	pH ($\cdot 10^3$)	d ($\cdot 10^3$)	RS ($\cdot 10^3$)	AG ($\cdot 10$)
E_A	+275	-39	-38,5	-28,85
E_B	- 40	+1	+30	-11,15
E_C	+225	+0,5	-16,5	+27,15
I_{AB}	+2,5	+0,5	-8,5	+0,775
I_{AC}	+95	+0,25	-8,75	-2,375
I_{BC}	+52,5	+0,75	-8	-1,875
I_{ABC}	+10	-0,75	-15,5	+3,225

3.7.1 Análise de Variância

TABELA 18 - Concentração de ácido gálico (AG) nos macerados purificados (EMP), por CCD/UV para análise de variância.

EMP Nº	AG (µg/ml)	EMP Nº	AG (µg/ml)
1 a	6,27	5 a	4,54
1 b	6,17	5 b	4,54
1 c	6,72	5 c	4,39
1 d	6,47	5 d	4,82
1 e	6,66	5 e	4,39
2 a	10,47	6 a	6,70
2 b	10,71	6 b	6,44
2 c	10,68	6 c	6,59
2 d	10,96	6 d	6,36
2 e	10,51	6 e	6,44
3 a	6,12	7 a	3,15
3 b	6,12	7 b	3,37
3 c	6,12	7 c	3,28
3 d	6,27	7 d	3,30
3 e	6,44	7 e	3,43
4 a	8,37	8 a	5,72
4 b	8,24	8 b	6,12
4 c	8,39	8 c	5,65
4 d	8,44	8 d	5,74
4 e	8,44	8 e	5,85

3.7.2 Testes Fisher (Teste F)

Empregou-se o programa STATITCF, obtendo-se dados apresentados na Tabela 19.

TABELA 19 - Dados do Teste F para o ácido gálico nos macerados purificados, pelo método CCD/UV.

EFEITOS	SOMA DOS QUADRADOS	GRAUS DE LIBERDADE	QUADRADO MÉDIO	TESTE F
A	83,43	1	83,43	3055,10
B	12,42	1	12,42	454,82
C	73,52	1	73,52	2692,15
AB	0,24	1	0,24	8,74
AC	2,22	1	2,22	81,40
BC	1,41	1	1,41	51,63
ABC	4,17	1	4,17	152,57
RESÍDUO	0,87	32	0,03	
TOTAL	178,29	39	4,57	

$$F_{\text{tab } 0,05; 1,32} = 4,17$$

Todas as diferenças são significativas.

3.7.3 Método de Tukey

A partir dos valores de desvio padrão de todo o conjunto e do número de repetições de cada tratamento, aplicou-se a equação 11 para obter o valor dms .

$$dms = q \cdot \frac{s}{\sqrt{r}} \quad (11)$$

sendo:

$$q = 2,86$$

$$s = \sqrt{QM \text{ resíduos}} = 0,173205$$

$$r = 5$$

$$dms \text{ (diferença mínima significativa)} = 0,2216$$

As médias obtidas no tratamento foram:

- $X_1 = 6,46$
- $X_a = 4,54$
- $X_b = 6,21$
- $X_c = 10,67$
- $X_{ab} = 3,31$
- $X_{ac} = 6,51$
- $X_{bc} = 8,38$
- $X_{abc} = 5,82$

TABELA 20 - Diferença entre as médias obtidas nos tratamentos para o teste de Tukey referentes a concentração de ácido gálico no EMP pelo método CCD/UV.

Nº	IDENTIFICAÇÃO	DIFERENÇA ENTRE AS MÉDIAS	Nº	IDENTIFICAÇÃO	DIFERENÇA ENTRE AS MÉDIAS
1	$\bar{X}_1 - \bar{X}_a$	1,92	15	$X_b - X_{ab}$	2,9
2	$X_1 - X_b$	0,25	16	$X_b - X_{ac}$	-0,3
3	$X_1 - X_c$	-4,21	17	$X_b - X_{bc}$	-2,17
4	$X_1 - X_{ab}$	3,15	18	$X_b - X_{abc}$	0,39
5	$X_1 - X_{ac}$	-0,05 ^{n.s}	19	$X_c - X_{ab}$	7,36
6	$X_1 - X_{bc}$	-1,92	20	$X_c - X_{ac}$	4,16
7	$X_1 - X_{abc}$	0,64	21	$X_c - X_{bc}$	2,29
8	$X_a - X_b$	-1,67	22	$X_c - X_{abc}$	4,85
9	$X_a - X_c$	-6,13	23	$X_{ab} - X_{ac}$	-3,2
10	$X_a - X_{ab}$	1,23	24	$X_{ab} - X_{bc}$	-5,07
11	$X_a - X_{ac}$	-1,97	25	$X_{ab} - X_{abc}$	-2,51
12	$X_a - X_{bc}$	-3,84	26	$X_{ac} - X_{bc}$	-1,87
13	$X_a - X_{abc}$	-1,28	27	$X_{ac} - X_{abc}$	0,69
14	$X_b - X_c$	-4,46	28	$X_{bc} - X_{abc}$	2,56

3.8 ESTUDO DA ESTABILIDADE

TABELA 21 - Comportamento do pH do extrato estandardizado (EE) e da solução de ácido gálico a 1,0mg/ml em etanol a 50% (V/V), (SP) em função do tempo e da temperatura de armazenamento.

AMOSTRA	°C	TEMPO DE ARMAZENAMENTO (dias)						
		0	3	6	9	14	21	26
EE	4°C	-	5,27	-	5,30	-	-	5,14
EE	40°C	-	5,22	5,17	5,22	5,09	5,05	4,80
EE	60°C	-	5,16	5,07	5,22	5,01	5,16	5,10
SP	4°C	-	4,71*	-	-	-	-	4,83
	60°C	-	-	-	4,00**	-	4,43**	-
Mênstruo	60°C	-	-	-	6,60**	-	6,89**	-
	ambiente	7,76	-	-	-	-	-	-

* SP a 4°C foi analisado no dia seguinte a sua preparação.

** SP a 60°C e mênstruo foram analisados nos dias 10, 22 após preparação.

TABELA 22 - Concentração de ácido gálico no extrato estandardizado em função do tempo e temperatura de armazenamento, (n = 3).

TEMPO (dias)	TEMPERATURA (°C)	Abs (\bar{X})	ÁCIDO GÁLICO $\mu\text{g/ml} \pm s$	CV(%)
0	amb.	0,515	11,33 \pm 0,044	0,39
6	4	0,521	11,46 \pm 0,332	2,9
	40	0,273	8,21 \pm 0,122	1,48
	60	1,438	29,72 \pm 0,588	1,98
8	4	-	-	-
	40	0,738	16,09 \pm 0,245	1,52
	60	1,454	31,43 \pm 1,389	4,42
9	4	0,528	11,61 \pm 0,347	2,99
	40	0,756	16,49 \pm 0,322	1,95
	60	1,528	33,73 \pm 1,643	4,87
14	4	-	-	-
	40	0,897	19,51 \pm 0,064	0,33
	60	1,681	36,29 \pm 1,372	3,78
21	4	0,530	11,65 \pm 0,026	0,22
	40	1,109	24,05 \pm 0,142	0,62
	60	1,620	34,53 \pm 0,881	2,55

TABELA 23 - Concentração de ácido gálico na solução hidroalcoólica a 50% (V/V) de ácido gálico a 1,0mg/ml em função do tempo e temperatura de armazenamento, (n = 3).

TEMPO (dias)	TEMPERATURA (°C)	Abs (\bar{X})	ÁCIDO GÁLICO $\mu\text{g/ml} \pm s$	CV(%)
0	amb. 25±5°C	0,440	9,11 ± 0,160	1,24
10	60°C	0,310	6,33 ± 0,089	1,40
21	4°C	0,437	9,05 ± 0,272	3,00
	60°C	0,235	4,73 ± 0,132	2,80

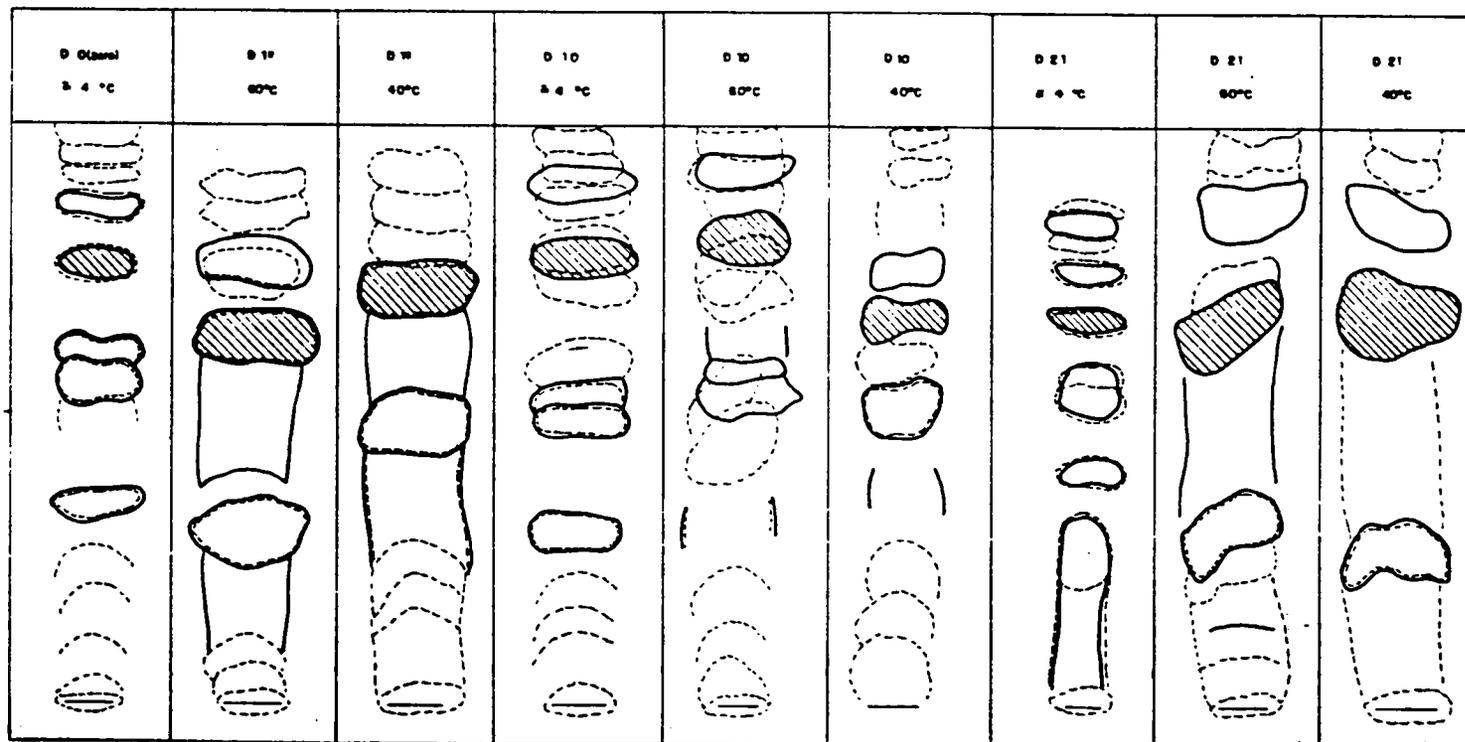


FIGURA 16 - Análise cromatográfica, no sistema 8, do extrato estandardizado submetido à degradação térmica nos tempos 1, 10 e 21 dias (D) às temperaturas de 40°C e 60°C acompanhadas de um extrato controle a 4°C nos tempos: zero, 10 e 21 dias. □ Visível no UV₂₅₄; ○ Visível no UV₃₆₆; ▨ ácido gálico do extrato obtido por comparação da substância referência de ácido gálico.

4. DISCUSSÃO

O emprego de preparados galênicos de origem vegetal objetiva levar à população medicamentos que possuam eficácia e segurança na terapêutica. Para isto torna-se necessário, empregar técnicas que garantam a qualidade da matéria-prima, de extratos derivados e do produto acabado.

Para comprovar a autenticidade da matéria-prima utilizada neste trabalho, foi realizada inicialmente a caracterização botânica através de comparação morfológica das raízes, com as exsicatas depositadas no Herbário ICN da UFRGS sob nº 53433.

MOURA (1984) já havia verificado a existência de outro vegetal comercializado pelos ervateiros com a denominação de baicurú branco, atribuindo as mesmas propriedades da espécie em estudo. A diferenciação entre os dois vegetais é feita macroscopicamente após um corte transversal realizado na raiz. A raiz fresca do *Limonium brasiliense* quando cortada apresenta coloração rósea, que logo intensifica-se devido a oxidação de seus componentes polifenólicos, enquanto que o baicuru branco mantém uma coloração esbranquiçada.

A impossibilidade de efetuar a identificação botânica do baicuru branco, bem como a obtenção deste vegetal fresco para a realização da análise microscópica de suas raízes, inviabilizou uma comparação mais detalhada entre as duas espécies.

As propriedades terapêuticas descritas nos trabalhos de COIMBRA (1958), REITZ (1965), LIFCHITZ (1968), CRUZ (1979) e

MOURA (1984) referem-se a espécie *Limonium brasiliense* constante na PHARMACOPÉIA brasileira (1929).

A caracterização anatômica da raiz, foi realizada através de cortes transversais, mostrando quatro camadas bem distintas como descritas nas Figuras 1, 2, 3 e 4. Estas camadas conjuntamente caracterizam a droga *Limonium brasiliense* da PHARMACOPÉIA brasileira (1929).

Avaliação qualitativa realizada com reativos gerais de precipitação e coloração para substâncias tânicas, demonstrou que o vegetal analisado apresenta na sua composição química taninos hidrolisáveis e taninos condensados. Estes ensaios não são seguros o suficiente para a identificação única do *Limonium brasiliense* já que outras espécies também podem apresentar estes constituintes químicos.

Para se trabalhar com drogas vegetais, faz-se necessário levar em consideração as possíveis alterações que as mesmas sofrem no processo de secagem. Desde o momento da coleta inicia-se no interior celular um lento processo de deterioração promovido por uma paulatina evaporação de água. Com a destruição das estruturas celulares ocorre a desorganização dos sistemas, favorecendo reações de oxidação, redução, hidrólise, etc., alterando muitas vezes a estrutura química de seus constituintes, explicada por trocas em suas características organolépticas, como cor, odor e também o sabor (HELMAN, 1981).

Face as características do vegetal, que se desenvolve em terrenos alagados, já havia sido constatado o crescimento de fungos nas raízes que não tinham sido submetidas rapidamente a uma secagem. Também há alteração da coloração quase que imediata do farmacógeno.

Estes fatos indicam que a droga deve ser classificada

como material altamente perecível, cuja consequência pode ser a da sua inutilização como insumo farmacêutico. Com o intuito de conservar íntegros na matéria-prima os constituintes químicos que caracterizam a planta fresca partiu-se para estabilização desta, através de processos de inibição e/ou destruição enzimática. Dos métodos utilizados, apenas aquele em que os fragmentos das raízes foram levados diretamente à estufa de ar circulante à $32^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante cinco dias, mostrou-se eficaz, sem prejuízo às características organolépticas bem como dos constituintes químicos, avaliados por caracterização química preliminar e análise cromatográfica.

O método de Perrot e Góris da exposição a vapores de etanol embora sendo um bom método de inativação enzimática, não se mostrou adequado para a matéria-prima utilizada.

A raiz do *Limonium brasiliense*, rica em constituintes polifenólicos (taninos) responsáveis pela ação farmacológica, quando submetida ao método de Perrot e Góris tornou-se escurecida (violácea) devida a formação de polímeros conhecidos por flobafenos, ocorrendo também esterificação do ácido gálico, substância majoritária da matéria-prima e escolhida como referência na padronização do baicuru. Estas alterações são devidas particularmente a elevada temperatura, favorecida pelo meio etanólico (HASLAM, 1966).

A secagem em estufa à vácuo, empregada na tentativa de estabilização em condições estabelecidas em 2.2.1.3, não impediu o crescimento de fungos, indicando não ser adequada. Além disto devido as características do material, para uma secagem mais eficaz, haveria necessidade de elevação considerável de temperatura, o que tornaria o método não apropriado aos objetivos estabelecidos.

Um fator relevante a considerar é a forma de armazenamento da droga após a secagem. Já foram encontradas no mercado drogas como *Ratania* (raízes), *Geranium* e *Rizoma tormentillae* com redução e até mesmo isentas de taninos hidrolisáveis. Para evitar esta ocorrência, drogas contendo taninos devem ser armazenadas em quantidades mínimas necessárias ao uso imediato, especialmente aquelas que se encontram sob a forma de pó (GSTIRNER, F.; BOPP, A.; HORMANN, H., 1956).

Para testar a estabilidade das raízes do *Limonium brasiliense*, após secagem e moagem, colocou-se pequena quantidade da droga pulverizada em frascos de vidro incolor com tampa rosqueável, expostos a luz solar e à temperatura ambiente. As amostras, no tempo de 7 dias tornaram-se escurecidas. Realizou-se um teste qualitativo comparando-se estas amostras com a droga acondicionada ao abrigo da luz, calor e umidade e moída por ocasião do uso. Os métodos de análise qualitativa empregados na realização deste teste são os descritos em 2.2.1.2, cujo resultado foi uma diminuição na formação de precipitados e uma menor intensidade na coloração da amostra devido provavelmente ao acondicionamento de maneira inadequada.

O valor de perda por dessecação encontrado para vegetal fresco (Tabela 3), se deve em grande parte a fatores climáticos; períodos de muita chuva e local de coleta em terreno alagado.

A distribuição granulométrica é um fator importante na obtenção de um extrato, já que uma maior ou menor extração está intimamente relacionada com a área da superfície e espessura das partículas em contato com o líquido extrator.

A Figura 17, representada pelo histograma e curva de

distribuição da droga rasurada, mostra que a maior porcentagem de particulados encontra-se numa faixa granulométrica entre 0,900-2,0mm. Embora o maior percentual encontra-se nesta faixa preferiu-se trabalhar com as faixas granulométricas compreendidas entre 0,315-0,630mm e 0,630-0,800mm, por fornecerem maior rendimento de substâncias extraíveis e serem estas recomendadas pelas farmacopéias. Foi possível, ainda, um aproveitamento dos particulados com granulometria superior a 1,0mm, passando-os novamente no moinho, obtendo-se uma porcentagem de aproximadamente 25% em torno de 0,315mm.

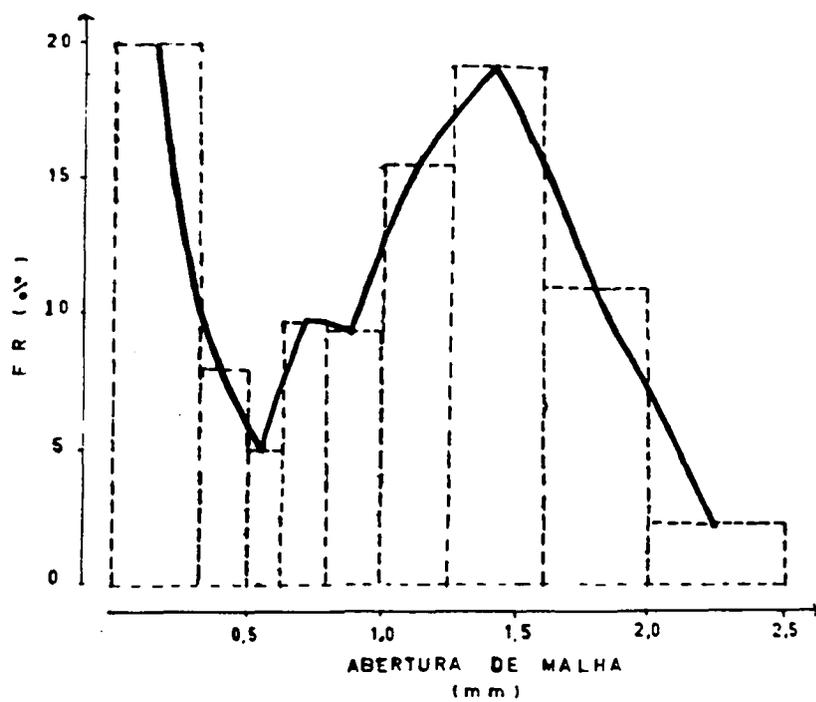


FIGURA 17 - Histograma e curva de distribuição granulométrica da droga rasurada.

A Figura 18 representa graficamente as frações de retenção e passagem da droga rasurada obtida por tamisação a partir dos dados fornecidos pela Tabela 4. O diâmetro médio das partículas calculado graficamente a partir do ponto de interseção das

retas, foi de 0,955mm.

Ainda é possível caracterizar materiais particulados calculando-se o ângulo de inclinação destas retas, que neste caso foi de aproximadamente 26°.

A determinação do teor de extrativos oferece um dado importante no controle da matéria-prima, embora não avalie individualmente os princípios ativos da droga e sim todas as substâncias solúveis no líquido extrator empregado. A legitimidade do teste consiste, em manter-se inalteradas as condições do ensaio o que poderia levar a alteração dos resultados (ZHI-CEN, 1980).

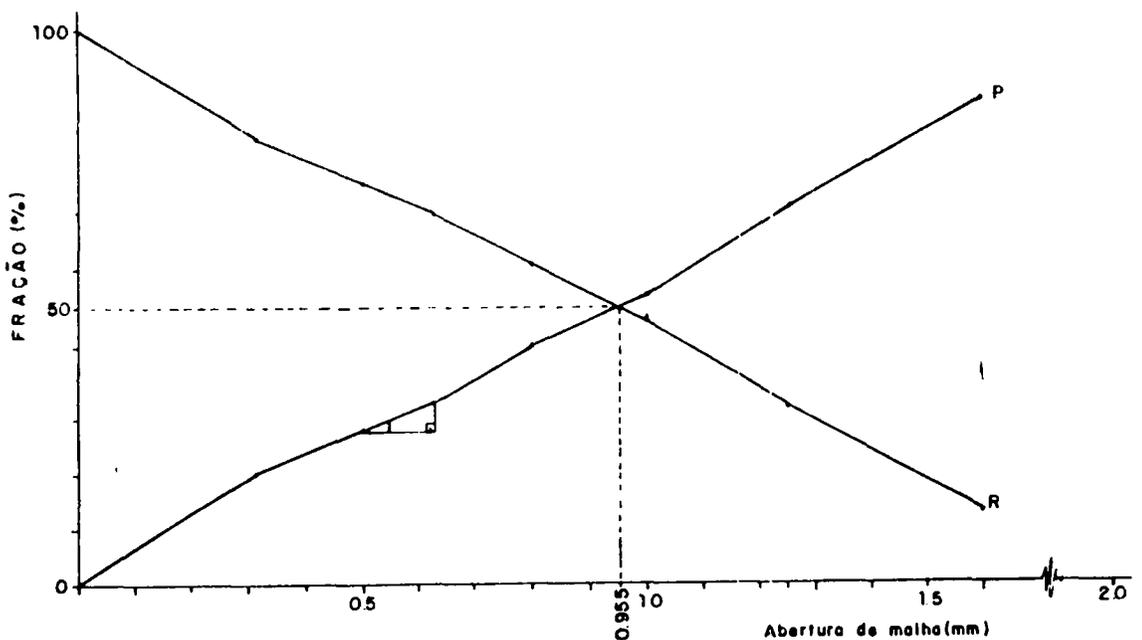


FIGURA 18 - Curvas características de retenção e passagem de uma análise por tamisação da matéria-prima vegetal.

Considerando os taninos como substâncias responsáveis pela ação terapêutica do baicurú e sendo o ácido gálico o composto majoritário (MOURA, 1984), procurou-se utilizá-lo como substância referência na standardização dos extratos das raízes. Determinou-se ainda, o teor de taninos totais da droga através do mé-

todo colorimétrico (item 2.2.1.8) por ser este o método preconizado pelas farmacopéias.

GSTIRNER, BOPP & HOPMANN (1956) ao analisar diferentes métodos de dosagem para taninos em sete drogas vegetais e tinturas, observaram valores marcadamente maiores na *Gallae* e tintura *Gallarum* para o método colorimétrico. O ácido gálico presente em ambas, reage com o ácido fosfotúngstico de coloração azul fornecendo um produto que é determinado juntamente com os taninos. Já que o ácido gálico química e fisiologicamente está relacionado com os galotaninos, pode ser considerado também na avaliação de taninos, quando apresenta a mesma coloração que os mesmos) desde que qualitativamente. Segundo os autores supracitados, as curvas de ácido gálico apresentam diferentes percursos do que as de taninos, de tal modo que na determinação conjunta de taninos e ácido gálico uma determinada quantidade de ácido gálico simula quase o dobro da quantidade de taninos. Portanto o método colorimétrico seria impróprio na determinação de taninos no *Limonium brasiliense*.

Face a estas dificuldades, o método colorimétrico torna-se inviável na standardização dos extratos limitando-se a avaliação da matéria-prima associada a outras técnicas de caracterização, para garantir a qualidade final.

No intuito de assegurar a constituição química da matéria-prima vegetal, torna-se indispensável a análise cromatográfica, tanto na caracterização da matéria-prima quanto na quantificação dos extratos **ET** e **EM**. O método cromatográfico escolhido foi a cromatografia em camada delgada (CCD), visando o aproveitamento pelas indústrias farmacêuticas de pequeno porte dotadas de laboratórios de controle com equipamentos menos sofisticados, com a utilização de sistemas empregados por MOURA

(1984) na elucidação e controle dos constituintes químicos do baicuru.

Para avaliação química da droga e extratos pelos métodos cromatográficos, utilizou-se padrões autênticos de ácido gálico, catequina e epicatequina.

Dos polifenóis identificados no vegetal em estudo verificou-se a presença do ácido gálico e derivados catéquicos, sendo o ácido gálico encontrado em maior quantidade (MOURA, 1984).

Para melhor resolução dos sistemas cromatográficos empregados tornou-se necessário a purificação dos extratos, como descrito em 2.2.4.4.

HASLAM (1966) obteve a separação de polifenóis utilizando a silicagel G60 com o sistema eluente benzeno: metanol: ácido acético (45; 8; 4; V/V/V).

Empregando-se este sistema (Figura 5) para o decocto das raízes do *Limonium brasiliense* observou-se nítida separação entre as manchas cromatográficas com valores de Rf inferiores a 0,50.

Os sistemas 2, 4 e 6, citados como clássicos na separação desta classe de compostos, não se mostraram apropriados para ácido gálico e catequina, pois como pode-se observar nas Figuras 6, 7 e 9 as manchas correspondentes, encontram-se em zona de baixa resolução (Rf superior a 0,7).

MOURA (1984) empregando a CCD com celulose microcristalina em sistema alcoólico (BAW), com técnica bidimensional detectou a presença da epicatequina e ácido gálico em extratos acetato de etila. Na tentativa de reproduzir este sistema para o ETP foi possível sugerir a existência da epicatequina (mancha A) e ácido gálico (mancha B) traçando um espectro no UV e comparando com a literatura, além de três manchas com reação positiva

ao reagente vanilina (Figura 13), tratando-se provavelmente de proantocianidinas condensadas (HASLAM, 1981; MOURA, 1984).

A cromatografia em papel foi empregada sem sucesso na caracterização do ET (sistema 7 da Figura 14), dificultada pela formação de cauda e sobreposição das manchas, inviabilizando a utilização deste método na quantificação dos extratos, além de não ter ocorrido diferenças significativas nos valores de Rf entre as substâncias referências AG e CA (0,67 e 0,70) respectivamente.

Para melhor separação dos extratos testaram-se dois métodos de purificação com o ETB. O método A, que apenas reduziu a 50% o volume do extrato em bm, em temperatura igual ou inferior a 40°C obtendo-se boa resolução entre as manchas, com concordância nos valores de Rf entre mancha do ET com o padrão ácido gálico admitindo ser um bom sistema na caracterização do ET (Figura 8).

O mesmo não foi observado com o ET purificado pelo método R. O aquecimento em temperatura superior a 40°C propiciou a formação de uma mancha de Rf aproximadamente 0,77 chamada de substância R (Figura 7) inexistente nos extratos purificados pelo método A.

A comparação direta do comportamento no UV da substância R com o éster etílico do ácido gálico isolado por MOURA (1984) do extrato acetato de etila hidrolisado em meio etanol: água, mostrou grande coincidência (Figura 12).

HASLAM (1966) e BALANSARD (1976) já haviam relatado a formação de ésteres do ácido gálico durante o processo de extração a quente em meio etanólico, comprovando que o éster obtido deva ser um artefato formado durante o processo de purificação pelo método R.

Para o método R de purificação os valores de Rf obtidos para AG e CA encontram-se em zona de baixa resolução ($R_f > 0,7$), impossibilitando assim, seu emprego como método de caracterização e de quantificação do extrato.

Ainda é possível observar na Figura 7 a formação de uma cauda entre as substâncias com características de taninos condensados com valores de Rf inferior a 0,50.

Outros sistemas eluentes, em proporções volumétricas como: acetato de etila: tolueno; água (10: 40: 50); acetato de etila: isopropanol: água (44: 45: 11); clorofórmio: acetato de etila: ácido fórmico (50: 40: 10); n-butanol: ácido acético: água (40: 10: 50); ácido fórmico: água (2: 98); ácido acético 10%; metanol: clorofórmio: ácido acético (49,5: 49,5: 1) citados como sistemas clássicos para esta classe de composto, foram testados neste trabalho sem resultados satisfatórios.

A impossibilidade de trabalhar com condições estáveis de temperatura, pressão, luminosidade da sala, grau de saturação da câmara cromatográfica, uniformidade da camada de fase estacionária, igual grau de ativação das placas cromatográficas inviabiliza a comparação direta dos valores de Rf obtidos experimentalmente com os valores da literatura (RIBÉREAU-GAYON, 1968). Face a instabilidade dos fatores acima listados utilizou-se sempre substâncias de referência nos cromatogramas.

Para visualização dos taninos e substâncias precursoras, foram utilizados solução de cloreto férrico, ferricianeto de potássio e vanilina clorídrica. Os taninos por apresentarem características polifenólicas coram-se de azul ao reagir com cloreto férrico. Para diferenciar taninos hidrolisáveis de taninos condensados utilizou-se uma mistura de solução de cloreto

férrico/ferricianeto de potássio preparada por ocasião do uso. Os taninos condensados coram-se de verde diferenciando-se dos hidrolisáveis que apresentam a coloração azul.

Outro revelador utilizado na caracterização de taninos condensados é a vanilina clorídrica formando um complexo, que passa da coloração rósea ao "pink".

A Tabela 5 e Figura 15 apresentam um perfil cromogênico do EMP através de diferentes reveladores utilizados. É importante salientar que as manchas 1, 2, 3 e 4 apresentam uma forte fluorescência sob luz ultravioleta de longo comprimento de onda (UV_{366nm}) intensificada quando expostas a vapores de amônia, reversível em poucos minutos. O comportamento destas manchas é característico de substância com grupos hidroxila livres, que na presença de amônia formam ânions fenólicos (RIBÉREAU-GAYON, 1968).

As manchas 2 e 3 formaram complexos coloridos quando revelados com cloreto de alumínio sob luz UV, sendo que a mancha 2 corou-se de salmão também na luz ordinária.

A mancha 8 presente no EMP₁ desaparece no EMP₂ (Figura 15).

Outros métodos podem ser empregados para avaliar os extratos produzidos. Dentre estes, destaca-se a determinação do pH que pode auxiliar na qualidade do produto final.

A Tabela 7 mostra os valores de pH para o turbolizado (ETB) e líquidos extratores. Apesar da característica ácida das substâncias extraíveis não houve um abaixamento do pH do extrato. Já era esperado que o pH do extrato fosse superior aos dos líquidos extratores, explicado pela tendência das substâncias extraídas atuarem como tamponantes da solução extrativa.

Sabe-se entretanto, que, além do tipo do solvente, o pH dos extratos pode sofrer alteração devido ao contato prolongado com o vidro e/ou à concentração das substâncias extraídas (PAL & NANDY, 1983). A primeira suposição pode ser descartada, já que a determinação do pH do **ETB** ocorreu logo após sua preparação. Sugere-se que a concentração e/ou tipo de substâncias extraídas sejam fatores determinantes do pH.

Para os macerados (Tabela 13) também foi observada elevação do pH dos mesmos em relação as misturas hidroalcoólicas; porém estas diferenças tornaram-se mais acentuadas para os extratos preparados com 50% de mistura hidroalcoólica, com 5 e 10 dias de maceração, respectivamente, ambos com baixa granulometria. A elevação do pH é menos acentuada para o extrato preparado com 70% de teor alcoólico; 10 dias de maceração e baixa granulometria.

Aliando-se ao fato que o **ET** foi preparado com o mesmo teor alcoólico, ou seja 50%, poder-se-ia presumir que o método extrativo também influi no valor de pH.

Ainda que a literatura aponte a turboextração como sendo o método eletivo na produção de extratos de melhor rendimento, não se pode confirmar no presente trabalho tal afirmação.

Na determinação do resíduo seco e densidade os valores obtidos para o **ET** (Tabela 8 e item 3.4.3 respectivamente), mostraram-se inferiores aos conseguidos para os **EMB** preparados a partir de misturas hidroalcoólicas à 50% (V/V), chegando-se a uma diferença de aproximadamente 12% a favor dos macerados na determinação do resíduo seco (Tabela 15).

Uma característica dos extratos a ser considerada é a coloração que estes apresentam logo após sua preparação.

Os extratos apresentaram diferença de cor quando modificado o método de extração. Observa-se na Tabela 7 que o **ETB** apresentou coloração castanha escura. Da mesma forma, o **EMB** obtido a partir de 50% da concentração etanólica com 10 dias de maceração. Comparando os **EMB** preparados com o teor alcoólico de 50% e 70% constata-se que a intensidade de cor aumenta a medida que se diminui a concentração etanólica das misturas extratoras, e se eleva o tempo de contato da droga com os referidos solventes.

Os **EMB** e **ETB** seguindo-se seu preparo, foram filtrados através do papel filtro comum, acondicionados em vidros de cor âmbar hermeticamente fechados e armazenados em geladeira. No decorrer do tempo de armazenamento, verificou-se intensificação da cor inicial em todos os extratos, com aparecimento de pequenos sedimentos, não chegando a ultrapassar 2mm de altura. Os sedimentos isolados foram submetidos a uma análise qualitativa com reagentes de precipitação e coloração. Uma forte coloração rósea foi notada quando adicionou-se vanilina clorídrica, levando a crer que este sedimento seja de origem catéuica, devido a reação ter sido positiva para taninos condensados.

Os testes organolépticos, embora sirvam como caracterização de extratos mostram-se insuficientes para o controle das substâncias extraídas, acontecendo o mesmo com os testes físicos (pH, densidade, resíduo seco, etc.).

Para avaliação quantitativa utilizou-se da cromatografia em camada delgada associada a espectrofotometria no ultravioleta empregando como eluente a mistura diclorometano: ácido fórmico: etanol (40: 4: 10; V/V/V) por ter sido o sistema eluente que melhor separou a mancha de ácido gálico, escolhida como substância

referência na padronização dos extratos.

Determinou-se uma curva padrão a 273nm em espectrofotômetro (FRANIAU, 1972) apresentando linearidade entre absorvância e concentração de ácido gálico na faixa de concentração que vai de 5 a 13µg/ml (Figura 19).

Para a realização das curvas padrão utilizou-se as médias das absorvâncias e das concentrações de ácido gálico obtidas experimentalmente por UV direto e CCD/UV (Tabelas 9 e 10).

A linearidade das curvas padrão de ácido gálico, foi comprovada através da correlação significativa ($\alpha < 0,001$) para as faixas de 5µg/ml a 13µg/ml.

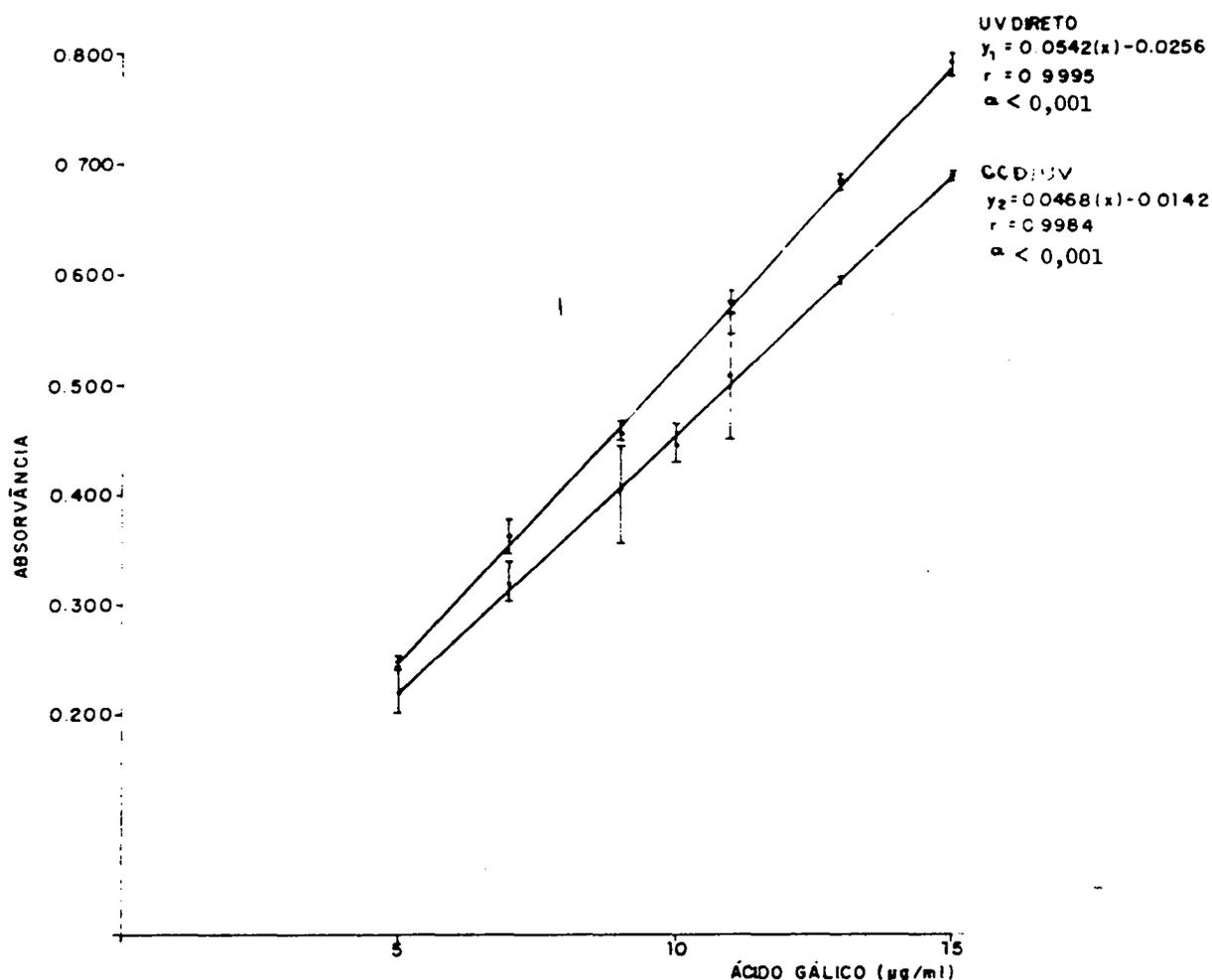


FIGURA 19 - Curvas padrão de absorção de ácido gálico a 273nm pelos métodos direto e CCD/UV, respectivamente.

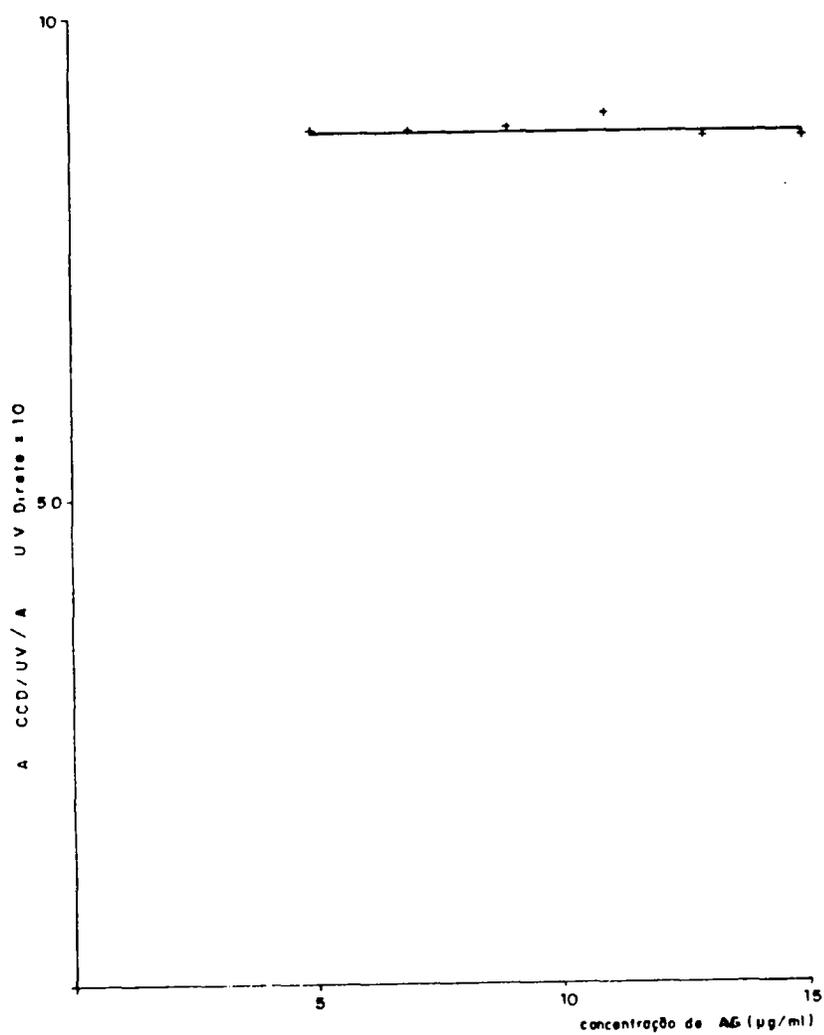


FIGURA 20 - Relação entre absorvância do padrão e absorvância do padrão após eluição da silicagel.

Para avaliar a perda do método, fez-se uma comparação entre os valores médios obtidos pelo UV e CCD/UV, demonstrando haver uma perda de aproximadamente 13% de ácido gálico quando doseado por CCD/UV. Esta perda pode ser atribuída principalmente à retenção da substância na sílica, possíveis perdas na aplicação, eluição, detecção e ainda retirada incompleta da mancha face a delimitação da área raspada. (Figura 20).

Embora exista uma perda de ácido gálico, o método empregado não fica invalidado (TYMAN, 1978; SRYVASTAVA & KISHORE, 1985). A viabilidade do método indireto pode ser comprovada pela correspondência linear altamente significativa entre as duas curvas ($\alpha \leq 0,001$, $t_c = 36,3371$).

Para análise quantitativa fez-se necessário a purificação prévia dos extratos, com o intuito de retirar substâncias lastro que poderiam interferir na análise cromatográfica.

Produziu-se um extrato turbolizado hidroalcoólico a 50% para servir como extrato referência frente as análises e testes desenvolvidos. Com os macerados, entretanto, procurou-se avaliar o comportamento quanto a variação no tempo de extração, da concentração etanólica do líquido extrator e da granulometria da matéria-prima vegetal.

Para a determinação do tempo ótimo de extração do AG, os extratos foram analisados nas seguintes condições: teor alcoólico de 50% (V/V), baixa granulometria (0,315-0,630mm) num período de 21 dias.

Os resultados referentes as concentrações de ácido gálico obtidas por CCD/UV (Figura 21) mostram uma rápida elevação nos 9 primeiros dias tendendo a estabilizar-se em torno do 10º dia. A partir do 14º dia de maceração ocorre leve declínio nos

valores de concentração. O tempo que apresenta o melhor rendimento é o de 10 dias. Após este período a manutenção da extração torna-se desvantajosa dado ao pequeno acréscimo no valor da concentração.

Empregou-se a análise fatorial do tipo 2^n para avaliar a influência das variáveis tempo de maceração, concentração etanólica do líquido extrator e granulometria sobre o rendimento de extração.

A partir da forma padrão foi possível fazer uma análise inicial do tipo dos efeitos e de suas interações (Tabela 17), levando em consideração as características dos extratos, tais como: densidade, resíduo seco, pH e concentração de ácido gálico nos macerados preparados a partir de 10% (m/V) de raízes do *Limonium brasiliense*.

O pH dos extratos é influenciado pelos fatores analisados. O efeito calculado para concentração etanólica (E_A) e tempo de maceração (E_C) influenciam positivamente o valor de pH quando se eleva a concentração etanólica e aumenta o tempo de contato, respectivamente, comprovando o que PAL & NANDY (1983) já haviam observado quando estudavam o efeito do álcool diluído, duração da maceração e sólidos totais em tintura de *Eugenia jambolana* Lam. sobre o pH dos extratos. O E_B (granulometria) não influencia significativamente o valor de pH. Portanto o pH pode servir como método indicativo no controle da qualidade do extrato final.

O efeito do etanol (E_A) sobre a densidade do extrato é explicado pela própria diferença de densidade do mênstruo. Os demais efeitos e interações não influenciam significativamente a densidade do extrato.

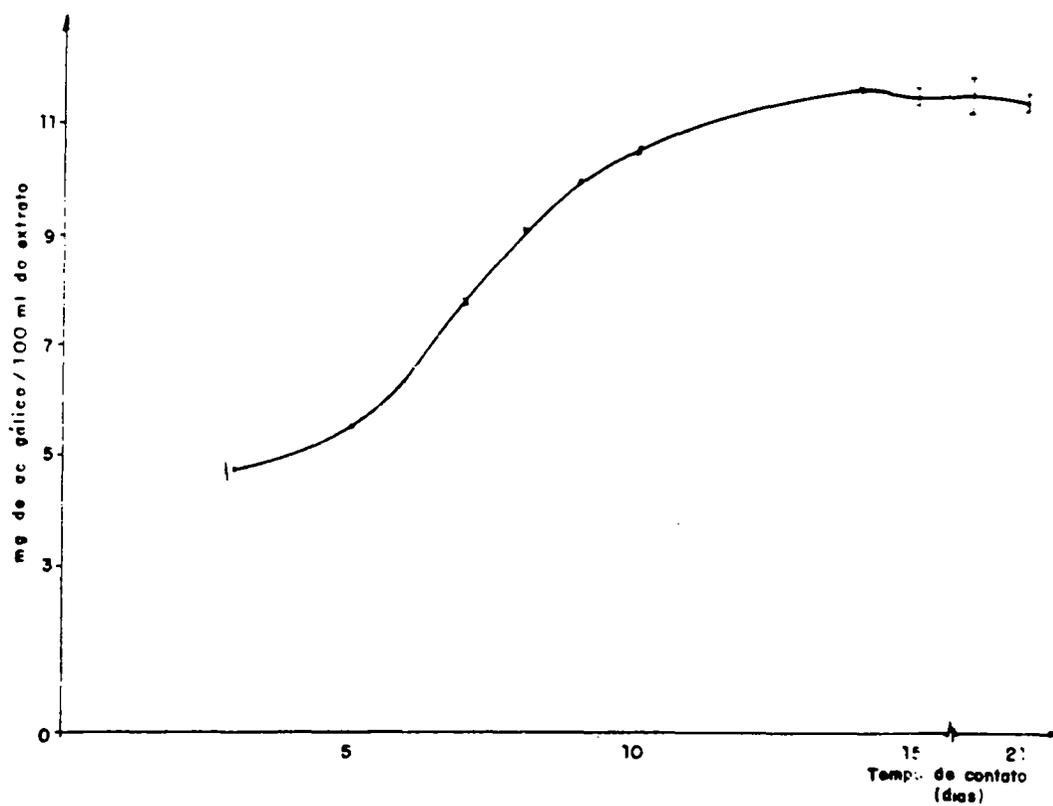


FIGURA 21 - Concentração de ácido gálico nos extratos macerados com etanol a 50% (V/V), em relação ao tempo de extração.

O resíduo seco (RS) é caracterizado pelo poder de extração do líquido extrator empregado, permitindo avaliar o rendimento do método de extração utilizado (VOIGT, 1982).

OS E_A e E_B são fatores determinantes para o rendimento do RS. O E_A demonstra pela magnitude do valor obtido que a extração mais eficiente é conseguida com a diminuição do teor etanólico, ou seja, concentração etanólica de 50%. Embora as características das substâncias presentes nas raízes do *Limonium brasiliense* demonstrem alta solubilidade em meio aquoso, uma diminuição da concentração etanólica abaixo de 50% não é aconselhável e tão pouco utilizada, dada as soluções aquosas sofrerem com facilidade contaminação microbiana, além do fato da farmacopéia brasileira não apresentar nenhum extrato preparado com concentração etanólica inferior a 50%. Por outro lado, uma elevação excessiva do teor etanólico provoca um abaixamento no valor do pH do líquido extrator em virtude de ocorrer um aumento da concentração hidrogeniônica do mênstruo, dando lugar a processo de degradação dos taninos hidrolisáveis (HASLAM, 1966).

O efeito granulometria influencia positivamente o rendimento do RS.

Sabe-se que para a elaboração de um extrato requer uma adequada redução da matéria-prima, não sendo possível a utilização da droga intacta devido ao seu volume excessivo e escassa superfície (VOIGT, 1982). Com a trituração progressiva se incrementa a superfície, e com ela a área de influência do líquido extrator. No entanto, o emprego da droga com baixa granulometria (0,315-0,630mm), diminui o rendimento do resíduo seco se comparado com a granulometria superior (0,630-0,800mm). Isto poderia ser explicado pela interferência das substâncias lastro

(resinas, mucilagens, gomas, etc.) que dificultam o processo de filtração ficando retidas no filtro.

Em menor proporção, o tempo de maceração (E_C) interfere na determinação do RS, provavelmente isto ocorre por um equilíbrio de concentração no interior e exterior das células.

O rendimento em ácido gálico depende dos três fatores analisados sendo que os E_A e E_C são os que apresentam maior significado. As interações de primeira e segunda ordem não interferem significativamente no rendimento de ácido gálico.

A solubilidade de ácido gálico é aumentada quando se eleva a polaridade do líquido extrator. Como era esperado, a maior concentração foi conseguida a partir da mistura hidroalcoólica a 50%, comprovada pelo sinal negativo.

Ainda foi possível avaliar a concentração de ácido gálico pelo método de Tukey, representado pelo cálculo da diferença mínima significativa (\bar{dms}). Analisando os dados oferecidos na Tabela 20 pode-se observar a diferença significativa entre todas as médias com exceção da diferença entre as médias X_1 e X_{ac} (-0,05), cujo valor mostrou-se inferior ao da \bar{dms} calculada. Observa-se ainda que a maior diferença significativa está entre as médias X_C e X_{ab} , apresentando um valor de 7,361. A diferença entre a maior média e a segunda maior média resulta num valor superior ao da \bar{dms} calculada, permitindo afirmar que o tratamento X_C é o mais vantajoso, ou seja, o tratamento que apresenta maior rendimento em ácido gálico quando os fatores tecnológicos, teor etanólico, granulometria da droga e tempo de maceração são respectivamente 50%, faixa granulométrica entre 0,315-0,630 e 10 dias de maceração.

pode-se considerar como ao acaso, isto é, não significantes. Aliado aos resultados obtidos no método de Tukey pode-se confirmar a aplicabilidade da forma padrão como sendo o método mais recomendado na análise dos efeitos e/ou interações (MONTGOMERY, 1984).

Foi realizado o teste de correlação entre os parâmetros pH, densidade, RS e a concentração de ácido gálico chegando-se aos seguintes resultados: a correlação entre pH/AG (Tabela 13 e 16) demonstrou ser significativa ($t_{\text{calc}} = 5,3014$) para um valor de $t_{0,001;7} = 4,785$.

Observou-se correlação significativa entre densidade e concentração de ácido gálico (Tabela 14 e 16) obtendo-se um valor de 1,985 para t_{calc} comparado ao $t_{0,05;7} = 1,895$.

Apresentando correlação significativa entre RS/AG obteve-se um valor de $t_{\text{calc}} = 2,2630$, para um $t_{0,05;7} = 1,985$, permitindo o emprego da determinação do resíduo seco como método de avaliação prévio ou indicativo da concentração de ácido gálico (Tabelas 15 e 16).

Embora exista uma correlação entre pH e densidade com o teor de ácido gálico, não é adequado empregar estes ensaios isoladamente na substituição da determinação da concentração de ácido gálico, face as dificuldades encontradas na manutenção das condições de ensaio (temperatura ambiente, umidade relativa, precisão do operador, estabilidade da balança empregada bem como do pHmetro). Outrossim, estes ensaios avaliados juntamente com o valor de RS oferecem um conjunto de dados importantes na manutenção da qualidade final do extrato.

Através da análise da Tabela 19, observa-se a partir do programa STATITCF, aplicando-se o método de GRUBBS, a ausência

de resíduo suspeito ou fora da normalidade para a concentração de ácido gálico, ressaltando a validade das análises estatísticas realizadas por este método, referente aos dados tabelados pela análise de variância.

Desenvolvidas estas análises e considerando o teor de ácido gálico no extrato, o melhor resultado é o que corresponde a maceração em 10 dias, com uma faixa granulométrica 0,630-0,315mm e etanol 50%.

No intuito de prever a estabilidade deste extrato realizou-se ensaios preliminares de envelhecimento acelerado mediante degradação térmica.

Dada a grande quantidade de extrato necessário à realização destes ensaios, a agitação mecânica foi imprescindível para uma boa extração. Manteve-se o extrato sob agitação por uma hora diariamente.

Passado os dez dias de maceração o extrato foi filtrado completando-se o volume. Nesse tempo, determinou-se a concentração de ácido gálico no extrato estandardizado purificado.

Obteve-se valores de aproximadamente 7% superior aos extratos submetidos a agitação manual, levando-nos a crer que o modo de agitação também influi no rendimento final do extrato.

O EE foi submetido às temperaturas de 40 e 60°C, mantendo-se um grupo controle a 4°C e avaliado em função da concentração de ácido gálico pelo método CCD/UV no sexto, oitavo, nono, décimo quarto e vigésimo primeiro dias de armazenamento.

Dos resultados apresentados na Tabela 22 verifica-se aumento na concentração de ácido gálico, passado de 11,33µg/µl (m/V) no tempo zero chegando a máximos de 24,05µg/µl (m/V) na temperatura de 40°C em 21 dias e de 36,29µg/µl na temperatura

de 60°C após 14 dias de armazenamento. Exceto valores encontrados para o extrato armazenado à 40°C em 6 dias, os demais valores foram significativamente superiores ao encontrado no tempo zero ($\alpha < 0,025$).

O grupo controle mantido em geladeira a 4°C não apresentou variação estatística significativa.

Na tentativa de explicar o que aconteceu com o extrato, submeteu-se uma solução hidroalcoólica (50:50; V/V) de ácido gálico padrão as temperaturas de 4°C e 60°C fazendo-se uma determinação no tempo zero à temperatura ambiente, no décimo dia na temperatura de 60°C e após 21 dias nas temperaturas de 4 e 60°C (Tabela 23).

As soluções mantidas a 60°C apresentaram redução de mais de 50% até o vigésimo primeiro dia quando comparados ao valor encontrado no tempo zero.

Juntamente com a redução do teor de ácido gálico, quando submetido a elevação da temperatura e tempo de armazenamento, observou-se um progressivo escurecimento da solução, fato este já evidenciado para o extrato. Esta substância apresenta-se altamente hidroxilada, favorecendo reações de oxidação com alteração química, levando assim, ao escurecimento da solução.

Em paralelo com a determinação do teor de ácido gálico, foi verificado o comportamento do pH do EE e SP a medida que se eleva a temperatura e tempo de armazenamento. Para as temperaturas de 40 e 60°C houve um declínio nos valores de pH do extrato até o sexto dia elevando-se no nono dia. Para a temperatura de 40°C, o pH retornou ao declínio do nono dia até o vigésimo sexto dia, entretanto o extrato mantido a 60°C apresentou uma elevação no valor de pH no vigésimo primeiro dia e a partir de

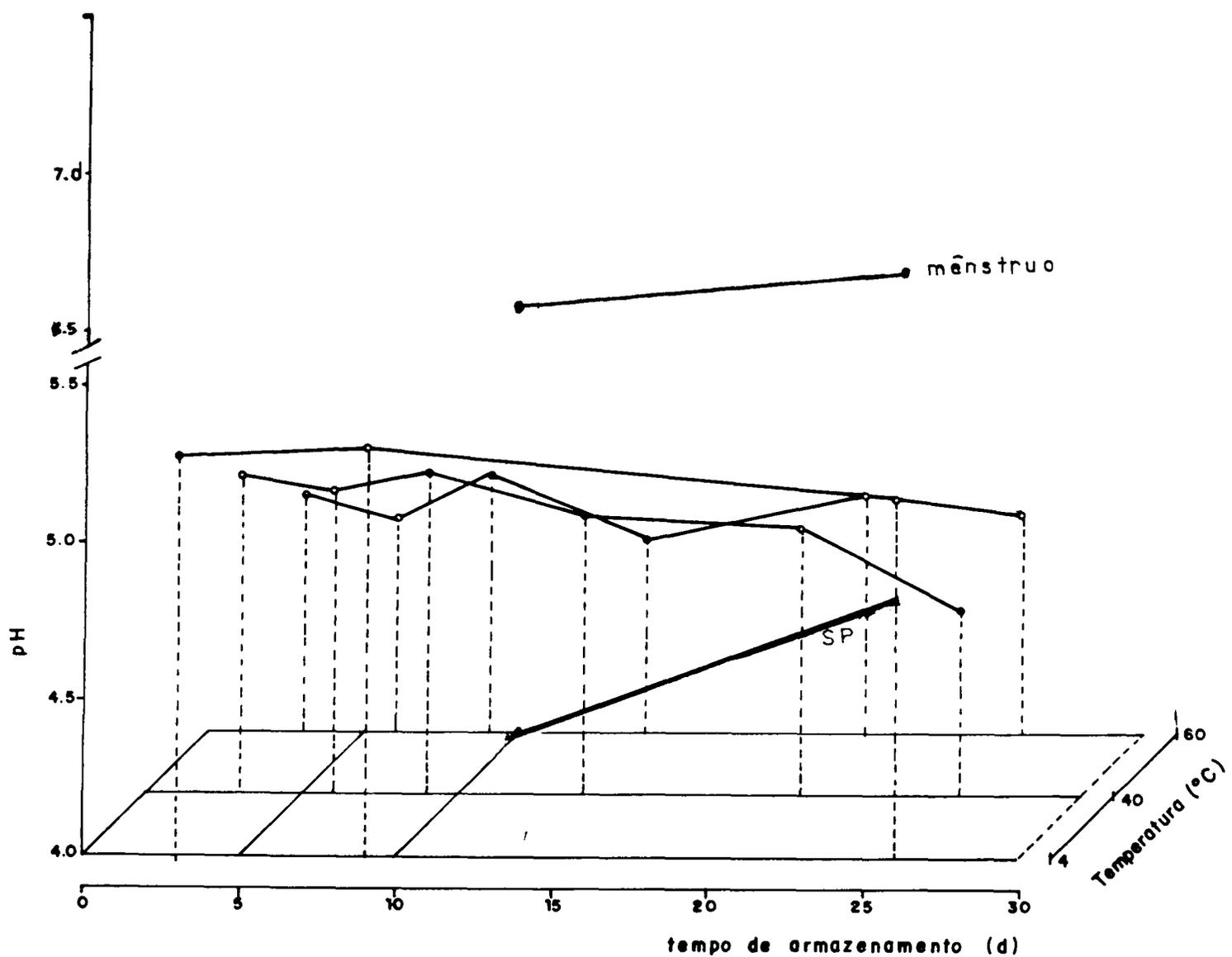


FIGURA 22 - Avaliação do pH do extrato hidroalcoólico otimizado, submetido ao ensaio de envelhecimento em função das temperaturas 4, 40 e 60°C e tempo de armazenamento (dias).

então voltou a decrescer (Figura 22).

O mesmo não foi observado para a solução hidroalcoólica de ácido gálico, que apresentou um decréscimo até o nono dia quando comparado com a solução controle, elevando-se progressivamente a partir do décimo dia. Para efeito de observação submeteu-se o mênstruo as mesmas condições que SP, constatando-se igual comportamento para ambos.

Os taninos hidrolisáveis são formados de ésteres de glicídios de ácidos fenólicos facilmente hidrolisados, liberando moléculas de ácido gálico e/ou ácido elágico (RIBÉREAU-GAYON, 1968).

Partindo deste conceito, sugere-se que o aumento da concentração de ácido gálico nos extratos submetidos às condições extremas de armazenamento, deve-se a sucessivas hidrólises dos galotaninos liberando moléculas de ácido gálico (Tabela 22).

Com bases nesses resultados, poder-se-ia explicar, que um aumento da concentração de ácido gálico provocaria um abaixamento do pH do extrato, devido às características ácida desta substância.

O gradual desaparecimento das manchas com valores de R_f inferiores a 0,5 (Figura 16) no decorrer do período de armazenamento provavelmente esteja relacionado com o aumento da concentração de ácido gálico. Para comprovação deste fato seria necessário uma identificação destas substâncias.

Embora, fosse esperado este comportamento para o extrato (EE) faz-se necessário um estudo mais detalhado requerendo um período de armazenamento maior. Só assim poder-se-ia confirmar as suposições feitas para o referido extrato e determinar um prazo de validade para os extratos do baicuru.

Sugere-se ainda o desenvolvimento de extratos com adição de agentes antioxidantes e comparação dos resultados com os obtidos no presente trabalho e também o desenvolvimento de extrato seco na tentativa de aumentar a estabilidade dos constituintes químicos do *Limonium brasiliense*.

Vale ressaltar, que só foi possível o desenvolvimento deste trabalho graças as pesquisas realizadas anteriormente com as raízes do *Limonium brasiliense*, com parte da composição química elucidada e características botânicas definidas.

5. CONCLUSÕES

- As raízes do *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze, conservam melhores as características organolépticas e químicas quando estabilizadas em estufa de ar circulante à 32°C durante 5 dias armazenadas ao abrigo da luz e moídas na ocasião do uso.
- Os extratos das raízes do *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze podem ser caracterizados pela cromatografia em camada delgada, através dos constituintes polifenólicos especialmente o ácido gálico.
- A substância precursora dos galotaninos - ácido gálico - é adequada como substância marcadora na quantificação dos extratos hidroalcoólicos das raízes do *Limonium brasiliense*.
- A cromatografia em camada delgada associada à espectrometria no ultravioleta, empregada como método de quantificação, demonstrou-se viável, apresentando exatidão e reprodutibilidade.
- O resíduo seco mostrou correlação significativa com a concentração de ácido gálico, viabilizando-o como método de quantificação para ácido gálico.
- A análise fatorial demonstrou que o teor etanólico do menstruo e o tempo de maceração da droga são os fatores com maior

influência sobre o rendimento de ácido gálico.

- As condições estandardizadas para a obtenção de macerados preparados com 10% (m/V) das raízes do baicuru foram: 50% de etanol, 10 dias de maceração e 0,315-0,630mm de granulometria.
- O estudo da degradação térmica acelerada, nas condições utilizadas, permite sugerir que a reação de hidrólise resultando em ácido gálico é uma das alterações mais características do macerado hidroalcoólico das raízes de baicuru.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASSOCIATION of Official Agricultural Chemists (A.O.A.C.).
Official and Tentative Methods of Analysis. 8th. ed.,
Washington, 1955. p.144.
- BALANSARD, G.; BERNARD, P.; BOUKEF, K.; SUSPLUS, P.; HANNAN, A.
Plantes Medicinales et Phytotherapie, 10(4):243-7, 1976.
- BAUER, R. & WAGNER, H. Cucurbitacinhaltige Drogen. Deutsche
Apotheker Zeitung, 123(27):1313-21, 1983.
- BEASLEY, H.T.; ZIEGLER, H.W.; BELL, A.D. Determination and
characterization of Gallotannin by High Performance Liquid
Chromatography. Analytical Chemistry, 49(2):
238-43, 1977.
- BERNHARD, H. Neuere Aspekte der Arzneipflanzenextraktion.
Schweizerische Apotheker Zeitung, 118(22):555-7, 1980.
- BOMTEMPI JR., Néelson. Técnicas de Anatomia Vegetal. São Paulo
(mimeo), 1988. 29p.
- BLUMENTHAL-BARBY, K. & BALCK, K. Die Stellung der
Arzneipflanzen im Gesundheitsverhalten der Bevoelkerung der
DDR. Pharmazie, 41(8):594-5, 1986.
- BÖHME, H. & KARTKE, K. Deutsches Arzneibuch - 8. Ausgabe 1978
- Kommentar. Stuttgart, Wissenschaftliche, 1981. p.15-6.
- BUNDESVEREINIGUNG Deutscher Apothekerverbände ed. Deutscher
Arzneimittel - Codex. 1979. Frankfurt, GOVI - Deutscher
Apotheker, 1979. Codex - Probe 12. V.1, t.1, p.14.
- BUNDESVEREINIGUNG Deutscher Apothekerverbände ed. Deutscher
Arzneimittel - Codex. 1979. Frankfurt, GOVI - Deutscher

- Apotheker, 1979a. Holunderbluten. v.2. *Erganzung*, 81. pag. irreg.
- BONATI, A. Medicinal plants and industry. Journal of Ethnopharmacology, 2:167-71, 1980.
- CLAUS, E.P. & TYLER, V.E. General introduction. In: _____. Pharmacognosy. 5. ed. Philadelphia, Lea & Febiger, 1965. Cap. 1.
- COIMBRA, R. Notas de Fitoterapia. 2. ed. Rio de Janeiro, Silva Araújo, 1958. p.63.
- CRUZ, G.L. Dicionário das plantas úteis do Brasil. 2. ed. Rio de Janeiro, DIFEL, 1982. p.94.
- DALPE, F.A. American Journal of Pharmacy and the Sciences, 361-5, 1884.
- DÄRR, A. Elementos de Tecnologia Farmaceutica. Zaragoza, Acribia, 1979.
- DIAS DA SILVA, R.A. Plantas Medicinaes do Brasil. Boletim da Associação Brasileira de Farmacêuticos, (1):5-14, 1920.
- EUROPEAN Pharmacopoeia. Saint-Ruffine, Maisonneuve, 1969. V.3.
- FARMACOPÉIA Brasileira. 3.ed. São Paulo, Andrei, 1977. p.934-5.
- FARMACOPÉIA dos Estados Unidos do Brasil. 2.ed. São Paulo, Siqueira, 1959. p.331-2.
- FRANIAU, R.; MUSSCHE, R. Quantitative determination of gallic acid in tannic acid by thin layer chromatography. Journal of the Institute of Brewing, 78:450-453, 1972.

- FROHNE, D. Qualitative und quantitative analytische Bestimmungsmethoden der Monodrogen. In: HANKE, G. Qualitaet pflanzlicher Arzneimittel. Stuttgart, Wissenschaftliche, 1984. p.101-14.
- GALENSA, R. & HERRMANN, K. Analysis of flavonoids by high-performance liquid chromatography. Journal of Chromatography, 189(2):217-24, 1980.
- GOULD, P.L. Optimisation methods for the development of dosage forms. International Journal of Pharmaceutical Technology and Product Manufacture, 5(1):19-24, 1984.
- GSTIRNER, F.; BOPP, A.; HOPMANN, H. Ueber die Haltbarkeit von Gerbstoffdrogen und Gerbstofftinkturen. Archiv der Pharmazie, 289/61(5):233-9, 1956.
- 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.
- HAGER, J. & SEIDEL, J. Verarbeitung von Arzneipflanzen - Von der Arzneidroge zur Tee-Arznei. Erfahrungsheilkunde, 28:26, 1979.
- HAGERMAN, A.E. & BUTLER, L.G. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 26(4), 809, 1978.
- HALBACH, G. Grenzen der Analytik pflanzlicher Arzneibereitung. Deutsche Apotheker Zeitung, 123(14):668-71, 1983.
- HARBORNE, J.B. Comparative biochemistry of the flavonoids - IV. Correlations between chemistry, pollen morphology and systematics in the family Plumbaginaceae. Phytochemistry, 6:1415-28, 1967.
- HASLAM, E. Chemistry of vegetable tannins. New York, Academic, 1966.

- HASLAM, E. Vegetable tannins. In: CONN, E.E. ed. The biochemistry of plants. V.7. Secondary plant products. New York, Academic, 1981.
- HELMAN, J. Farmacotecnia teorica y practica. 3. ed. México, Continental, 1982. V.1.
- JAHNS, R.T. & CRESCENTE, A.S. Ensaio farmacológico e clínicos com a associação de extrato fluido de *Limonium* (Statice) *brasiliense* Boiss. e N-acetil-p-aminofenol em musculatura lisa. Tribuna Farmacêutica, Curitiba, 44(1-2):105-11, 1976.
- LIFCHITZ, A. Plantas Medicinales; Guia Practico de Botanica Medicinal. Buenos Aires, Kier, 1981.
- LIST, P.H. & SCHMIDT, P.C. Technologie pflanzlicher Arzneibereitung. Stuttgart, Wissenschaftliche, 1984.
- MARINI-BETTOLO, G.B.; NICOLETTI, M.; PATAMIA, M. Plant screening by chemical and chromatographic procedures under field conditions. Journal of Chromatography, 243:113-127, 1984.
- MEIER-BRATSCHI, B. und A. Wo Arzneipflanzen geerntet werden. Schweizerische Apotheker-Zeitung, 117:529, 1979.
- MELLO, J.C.P. de. Desenvolvimento galênico de macerados de *Baccharis trimera* (Less.) DC. - Compositae - (carqueja). Porto Alegre, Curso de Pós-Graduação em Farmácia da UFRGS, 1989. 136p. Dissertação de Mestrado em Farmácia.
- MENßEN, H.G. Standardisierung und Zubereitungsformen von Phytopharmaka. Pharmazeutische Zeitung, 124(6):233-6, 1979.
- MENßEN, H.G. Arzneipflanzenstandardisierung am Beispiel der Sennespflanzen *Cassia angustifolia* und *Cassia acutifolia*. Deutsche Apotheker Zeitung, 122(45):2317-20, 1982.

- MONTGOMERY, D.C. Design and analysis of experiments. 2. ed. New York, J. Wiley, 1984. p.274-9.
- MOTA, T.M.B. Substâncias antibióticas em vegetais superiores. Santa Maria, Faculdade de Farmácia, 1963. 60f. Tese, Livre-Docência.
- MOURA, T.F. A. de L. Sobre o *Limonium brasiliense* (Boiss.), Kuntze, *Plumbaginaceae* o Baicurú da Farm. bras. I. Porto Alegre, Curso de Pós-Graduação em Farmácia da UFRGS, 1984. 146f. Dissertação de Mestrado em Farmácia.
- 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.
- PHARMACOPÉIA Brasileira. 1. ed. São Paulo, Cia. Ed. Nacional, 1929. p.499-500.
- PLAIZIER-VERCAMMEN, J.A. & DE NÈVE, R.E. Interaction of povidone with aromatic compounds. I. Evaluation of complex formation by factorial analysis. Journal of Pharmaceutical Sciences, 69(12):1403-8, 1980.
- REITZ, P.R. Plumbaginaceas. Flora Ilustrada Catarinense. Itajai, 1965. p.2-7.
- 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.
- RIBÉREAU-GAYON, P. Les Composés phénoliques des végétaux. Paris, Dunod, 1968.
- RODRIGUES, P.C. Bioestatística. Niterói, EDUFF, 1986.
- ROSITO, J.F. Contribuição à análise das raízes de *Limonium*

- brasiliense (Boiss.). Porto Alegre, Curso de Pós-Graduação em Farmácia da UFRGS, 1975. 37p. Dissertação de Mestrado em Farmácia.
- ROSS, M.S.F. & BRAIN, K.R. From plant to isolate. In: _____. An Introduction to Phytopharmacy. California, Pitman Medical, 1977. Cap. 3, p.51-73.
- SCHMIDT, O.T. Naturliche Gerbstoffe. In: PAECH, K. & TRACEY, M.V. eds. Moderne Methoden der Pflanzenanalyse. Berlin, Springer, 1955a. v.3, p.524-6.
- SCHMIDT, O. Th. Naturliche Gerbstoffe. In: PAECH, K. & TRACEY, M.V. Modern Methods of Plant Analysis. Berlin, Springer-Verlag, VIII, p.517-48, 1955.
- SIEGFRIED, B. Die Extrakte und Tinkturen der Pharmacopoea Helvetica VI. Zofingen, Siegfried, 1971.
- 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.
- SPAICH, W. & GRACZA, L. Standardisierte Phytopharmaka-eine Voraussetzung fur erfolgreiche Phytotherapie. Pharmazeutische Zeitung, 125(36):1706-7, 1980.
- SRIVASTAVA, V.K. & KISHORE, K. Introduction to Chromatography - theory and practice. New Delhi, S. Chand, 1985. p.21-2.
- STELLMACH, B. Herstellung und Standardisierung von Pflanzenextrakten. Chemische Industrie, 32:154-70, 1980.
- THE UNITED States Pharmacopeia. 20. ed. Easton, Mack, 1980. p.891-3.
- 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.

VAN OS, F.H.L. Standaardisatie van plantaardige geneesmiddelen. Farmaceutisch Tijdschrift voor België, 57:5-24, 1980.

VOIGT, H.R. & BORNSCHEIN, M. Medicamentos obtenidos por extracción de drogas. In: _____. Tratado de Tecnología Farmacéutica. Zaragoza, Acribia, 1982. Cap. 22, p.485-513.

YATES, F. The design and analysis of factorial experiments. Harpenden, Imperial Bureau of Soil Science, 1937.

WOJAHN, H. Galenische Pharmazie. 2.ed. Dresden-Leipzig, Theodor Steinkopff, 1951. p.171-2.

WULP, W. & NAGEL, C.W. Analysis of phenolicacids and flavonoids by high-pressure liquid chromatography. Journal of Chromatography, 166:271-9, 1976.

ZHI-CEN, L. General control methods for vegetable drugs. Geneva, WHO, 1980. p.31-3.

ZIEGLER, W.H.; BEASLEY, H.T.; SMITH, W.D. Journal of the Association of Official Analytical Chemists, 58:888, 1975.

- brasiliense (Boiss.). Porto Alegre, Curso de Pós-Graduação em Farmácia da UFRGS, 1975. 37p. Dissertação de Mestrado em Farmácia.
- ROSS, M.S.F. & BRAIN, K.R. From plant to isolate. In: _____. An Introduction to Phytopharmacy. California, Pitman Medical, 1977. Cap. 3, p.51-73.
- SCHMIDT, O.T. Naturliche Gerbstoffe. In: PAECH, K. & TRACEY, M.V. eds. Moderne Methoden der Pflanzenanalyse. Berlin, Springer, 1955a. v.3, p.524-6.
- SCHMIDT, O. Th. Naturliche Gerbstoffe. In: PAECH, K. & TRACEY, M.V. Modern Methods of Plant Analysis. Berlin, Springer-Verlag, VIII, p.517-48, 1955.
- SIEGFRIED, B. Die Extrakte und Tinkturen der Pharmacopoea Helvetica VI. Zofingen, Siegfried, 1971.
- 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.
- SPAICH, W. & GRACZA, L. Standardisierte Phytopharmaka-eine Voraussetzung fur erfolgreiche Phytotherapie. Pharmazeutische Zeitung, 125(36):1706-7, 1980.
- SRIVASTAVA, V.K. & KISHORE, K. Introduction to Chromatography - theory and practice. New Delhi, S. Chand, 1985. p.21-2.
- STELLMACH, B. Herstellung und Standardisierung von Pflanzenextrakten. Chemische Industrie, 32:154-70, 1980.
- THE UNITED States Pharmacopeia. 20. ed. Easton, Mack, 1980. p.891-3.
- 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.
- VAN OS, F.H.L. Standaardisatie van plantaardige geneesmiddelen. Farmaceutisch Tijdschrift voor België, 57:5-24, 1980.
- VOIGT, H.R. & BORNSCHEIN, M. Medicamentos obtenidos por extracción de drogas. In: _____. Tratado de Tecnología Farmacéutica. Zaragoza, Acribia, 1982. Cap. 22, p.485-513.
- YATES, F. The design and analysis of factorial experiments. Harpenden, Imperial Bureau of Soil Science, 1937.
- WOJAHN, H. Galenische Pharmazie. 2.ed. Dresden-Leipzig, Theodor Steinkopff, 1951. p.171-2.
- WULP, W. & NAGEL, C.W. Analysis of phenolicacids and flavonoids by high-pressure liquid chromatography. Journal of Chromatography, 166:271-9, 1976.
- ZHI-CEN, L. General control methods for vegetable drugs. Geneva, WHO, 1980. p.31-3.
- ZIEGLER, W.H.; BEASLEY, H.T.; SMITH, W.D. Journal of the Association of Official Analytical Chemists, 58:888, 1975.