

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

PADRONIZAÇÃO DE EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS SUMIDADES FLORIDAS  
DE *Achyrocline satureioides* (LAM.) DC. - COMPOSITAE (MARCELA)

Dissertação apresentada por

DIVA SONAGLIO

para obtenção do Grau Acadê

mico de Mestre em Farmácia

Orientador: Prof. Dr. PEDRO ROS PETROVICK

PORTO ALEGRE - 1987

Dissertação apresentada e aprovada em 09 de julho de 1987, perante a Comissão Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Nikolai Sharapin  
Universidade Estadual de Campinas

Prof. Dr. Eloir Paulo Schenkel  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Pedro Ros Petrovick  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

S698p Sonaglio, Diva

Padronização de extrato hidroalcoólico das sumidades floridas de *Achyrocline satureioides* (Lam.)DC., Compositae (marcela). - Porto Alegre: 1987.

163p.

Dissertação (Mestrado). UFRGS. Faculdade de Farmácia.

CDU: 615.453

Índices para catálogo sistemático:

615.453 Tecnologia farmacêutica.

582.398 Botânica sistemática: compositae

À  
Flora e Severino,  
meus pais.

## AGRADECIMENTOS

Uma produção científica é o resultado de um trabalho coletivo onde, com maior ou menor grau, várias pessoas participam: o pesquisador, que elabora, passo a passo, o caminho de seus objetivos; os cientistas de outrora, cuja herança científica facilita e subsidia novas pesquisas; os professores, colegas e amigos que apóiam o pesquisador em seu trabalho.

Aos cientistas, espero ter agradecido, ao menos implicitamente, nas referências bibliográficas.

Aos professores, colegas e amigos agradeço, relembrando-os:

Profa. Dra. Amélia Teresinha Henriques

Antônio Nunes Dias Neto

Cláudia Maria Oliveira Simões

Eda Rita Luvison

Profa. Dra. Elfrides Eva Scherman Schapoval

Prof. Dr. Eloir Paulo Schenkel

Gerson Antonio Pianetti

Prof. Dr. Gilberto A. de Assis Brasil e Silva

Gilsane Lino von Poser

Girley V. Simões

Helenara H. da Silva Fão

Ivone Iob Antunes

Jairo Z. Rodrigues Dias Neto

João Carlos Palazzo de Mello

Prof. José Carlos Germani

Judite da Silva Fão

Profa. Lilian Auler Mentz

Luiz Alberto Brettas

Mareni Rocha Farias

Margarida M. Cordeiro Fonseca Ferreira

Maria Candida Mendes

Ronal Costa

Selma Lucy Franco

Sônia Reichel Pereira

Stela Maris Kuze Rates

Paulo Cezar Sander

Tereza Cristina Dalla Costa

Profa. Valquiria Linck Bassani

Vilma Sonaglio

e todos que, seja pela colaboração técnica, seja pelo incentivo, compreensão e amizade demonstrados, canalizaram esforços objetivando a conclusão desse trabalho.

De modo especial, agradeço ao Prof. Dr. Pedro Ros Petrovick pela orientação, estímulo, dedicação e presença amigável durante a elaboração do presente trabalho.

## SINOPSE

O controle de qualidade de fitoterápicos abrange a padronização durante as diversas etapas que envolvem a sua preparação.

Partindo desse pressuposto, foi desenvolvida uma preparação farmacêutica na forma de extrato, sendo utilizada como matéria-prima, sumidades floridas de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC., Compositae (marcela), um dos vegetais mais utilizados na medicina popular da região sul do País.

A sua padronização foi efetuada a partir da obtenção da matéria-prima, identificação e caracterização botânica e avaliação de sua estabilidade; ensaios de comportamento dos extratos analisados mediante testes organolépticos e físico-químicos; avaliação da composição química por métodos cromatográficos (CP, CCD, CLAE e CG); doseamento pela quantificação de um dos constituintes majoritários - quercetina - através dos métodos da cromatografia em papel associada à espectrometria no ultravioleta (CP/UV) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), constituindo-se na padronização química. Os fatores tecnológicos abordados foram: concentração de sumidades floridas, concentração alcoólica do líquido extrator e tempo de maceração.

Foram comparados os dois métodos de quantificação, sen-

do estabelecida a viabilidade do método CP/UV, mais acessível que o da CLAE.

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

Foi verificada, ainda, a atividade antiinflamatória do mesmo extrato, cujos resultados serviram para a determinação do índice de atividade antiinflamatória (iAa), constituindo-se na padronização biológica, e ensaiada a sua toxicidade.

## ABSTRACT

The quality of phytotherapics involves the standardization of various steps in their preparation.

One of the most widely used plants in the folk medicine of Southern Brasil is *Achyrocline satureioides* (Lam.)DC., Compositae (marcela). Floral summits were obtained from this plant and macerated under controled conditions to produce a standardized extract.

The standardization began with the botanical identification of the raw plant material and analysis of the plant during the storage. Tests were also performed in order to evaluate the organoleptic and physico-chemical characteristics of the plant extracts: PC, TLC, HPLC and CG methods were used.

The quantitation of one of the major phenolic components - quercetin - was performed by paper chromatography/ultraviolet spectrometry (PC/UV) and HPLC to establish the chemical standardization.

Comparison between the results of these two quantitative methods showed that the PC/UV method was reliable, which is simpler and easier to use than the HPLC method.

The technological aspects involved the determination of the optimal conditions as: concentration of the floral summits



in the menstruum, alcoholic concentration of the extractive medium and maceration time.

The hydroalcoholic extract was submitted to accelerated stability studies under stressed thermic conditions.

The optimized macerate was evaluated for toxic effects, as well as for its antiinflammatory action. From these results, an antiinflammatory index was calculated and this is suggested as a method for the biological standardization of this plant extract.

## SUMÁRIO

	Página
SINOPSE .....	vi
ABSTRACT .....	viii
LISTA DE TABELAS .....	xiii
LISTA DE FIGURAS .....	xvii
LISTA DE ABREVIATURAS .....	xxi
1 - INTRODUÇÃO .....	1
2 - PARTE EXPERIMENTAL .....	16
2.1 - MATERIAL .....	16
2.1.1 - Material Vegetal .....	16
2.1.2 - Material Biológico .....	16
2.1.3 - Aparelhos e Equipamentos .....	17
2.1.4 - Reagentes, Soluções e Substancias Reagentes .....	18
2.2 - METODOLOGIA .....	19
2.2.1 - Caracterização Botânica .....	19
2.2.2 - Determinação do pH .....	20
2.2.3 - Determinação da Perda por Dessecação .....	20
2.2.4 - Determinação do Resíduo Seco .....	20
2.2.5 - Determinação do Teor Alcoólico .....	21
2.2.6 - Determinação do Teor de Óleo Essencial .....	21
2.2.7 - Determinação do Teor de Extrato .....	22
2.2.8 - Determinação do Teor de Flavonóides Totais .....	22
2.2.9 - Determinação do Ponto de Fusão .....	24
2.2.10 - Análise Cromatográfica .....	24
2.2.10.1 - Cromatografia em Papel (CP) .....	24
2.2.10.2 - Cromatografia em Camada Delgada (CCD) .....	26
2.2.10.3 - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) .....	28
2.2.10.4 - Cromatografia Gasosa (CG) .....	29

	Página
2.2.11 - Métodos de Extração (Preparação dos Extratos)...	29
2.2.11.1 - Turbolização .....	30
2.2.11.2 - Maceração .....	30
2.2.12 - Purificação dos Extratos .....	31
2.2.13 - Caracterização Preliminar dos Extratos .....	33
2.2.13.1 - Preparação dos Tampões .....	33
2.2.13.2 - Procedimento .....	33
2.2.14 - Determinação Quantitativa .....	35
2.2.14.1 - Preparação da Solução Padrão .....	35
2.2.14.2 - Cromatografia em Papel/Espectrometria no Ultra violeta (Método CP/UV) .....	35
2.2.14.3 - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (Método do CLAE) .....	37
2.2.15 - Verificação da Pureza da Substância Referência .	37
2.2.16 - Desenvolvimento do Método de Extração .....	38
2.2.17 - Estudo da Estabilidade do Extrato Otimizado ....	38
2.2.18 - Avaliação da Atividade Antiinflamatória .....	39
2.2.19 - Determinação do Índice de Atividade Antiinflama- tória (iAa) .....	42
2.2.20 - Ensaio da Toxicidade .....	42
2.2.21 - Cálculos Estatísticos .....	43
3 - RESULTADOS .....	46
3.1 - CARACTERIZAÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO .....	46
3.1.1 - Descrição Botânica .....	46
3.1.2 - Perda por Dessecação .....	47
3.1.3 - Determinação do Teor de Extrato .....	47
3.1.4 - Determinação do Teor de Flavonóides Totais .....	48
3.1.5 - Determinação do Teor de Óleo Essencial .....	48
3.2 - ANÁLISE CROMATOGRÁFICA .....	48
3.2.1 - Cromatografia em Papel (CP) .....	49
3.2.2 - Cromatografia em Camada Delgada (CCD) .....	53
3.2.3 - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) .	57
3.2.4 - Cromatografia Gasosa (CG) .....	60
3.3 - DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA (MÉTODO CP/UV) .....	63
3.4 - CARACTERIZAÇÃO PRELIMINAR .....	66

	Página
3.4.1 - Variação da Cor, Turvação e Sedimentação e pH dos Turbolizados, com ou sem Aditivos .....	66
3.4.2 - Análise Cromatográfica .....	78
3.5 - DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO .....	79
3.5.1 - Turbolização .....	79
3.5.1.1 - Otimização da Concentração de Sumidades Floridas .....	79
3.5.1.2 - Otimização da Concentração Etanólica do Líquido do Extrator .....	80
3.5.2 - Maceração .....	82
3.5.2.1 - Otimização do Tempo de Maceração e da Concentração de Sumidades Floridas .....	82
3.5.2.2 - Otimização da Concentração Alcoólica do Líquido do Extrator .....	86
3.6 - DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE AVALIAÇÃO BIOLÓGICA ..	87
3.7 - CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO OTIMIZADO .....	91
3.7.1 - Determinação Qualitativa por Cromatografia .....	91
3.7.2 - Determinações Organolépticas e Físico-Químicas ..	91
3.7.3 - Determinação Quantitativa .....	94
3.7.4 - Estudo da Estabilidade .....	94
3.7.5 - Determinação do Índice de Atividade Antiinflamatória (iAa) .....	101
3.8 - ENSAIO DA TOXICIDADE .....	101
4 - DISCUSSÃO .....	102
5 - CONCLUSÕES .....	150
6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	152

## LISTA DE TABELAS

	Página
1 - Preparação dos tampões segundo Sørensen .....	33
2 - Caracterização botânica das partes aéreas de <i>Achyrocline satureioides</i> (Lam.) DC. compilação obtida de dados bibliográficos e material depositado no Herbário da UFRGS .....	46
3 - Perda por dessecação do material botânico em função do tempo de armazenamento .....	47
4 - Porcentagem de óleo essencial das flores de <i>A. satureioides</i> em função do tempo de armazenamento do vegetal seco .....	48
5 - Comportamento cromatográfico das substâncias padrão e substâncias com Rf correspondente observado no extrato, no sistema I <sub>2</sub> .....	52
6 - Comportamento cromatográfico das substâncias padrão e substâncias com Rf correspondente observado no extrato, no sistema V <sub>1</sub> .....	56
7 - Tempo de retenção (TR), largura da base do pico (W) e fator de resolução relativo à quercetina (RQ) das substâncias padrão analisadas por CLAE .....	57
8 - Área dos picos de quercetina determinada por CLAE ..	59
9 - Cromatografia gasosa do óleo essencial extraído das flores secas de <i>Achyrocline satureioides</i> (Lam.) DC. no tempo zero de armazenamento do vegetal seco. Tempo de retenção (TR) e percentual da área total do cromatograma (exceto a área do solvente) dos principais picos (acima de 1%) .....	60
10 - Cromatografia gasosa do óleo essencial extraído das flores secas de <i>Achyrocline satureioides</i> (Lam.) DC. após 4 meses de armazenamento do vegetal seco. Tempo de retenção (TR) e percentual da área total do cromatograma (exceto a área do solvente) dos principais picos (acima de 1%) .....	61

11 - Cromatografia gasosa do óleo essencial extraído das flores secas de <i>Achyrocline satureioides</i> (Lam.) DC. após 8 meses de armazenamento do vegetal seco. Tempo de retenção (TR) e percentual da área total do cromatograma (exceto a área do solvente) dos principais picos (acima de 1%) .....	62
12 - Valores de absorção da solução padrão determinados por CP/UV e, diretamente, por UV, a 255 nm .....	63
13 - Valores de R <sub>f</sub> da co-cromatografia e cromatografia bi dimensional de quercetina padrão (QP) e quercetina extraída dos extratos (QE) .....	64
14 - Valores máximos de absorção, no ultravioleta, de quercetina padrão (QP) e quercetina isolada do extrato purificado (QE), em metanol .....	65
15 - Coloração dos turbolizados etanólicos adicionados, logo após a preparação (tempo zero) e após um e quatorze dias de armazenamento, em função da temperatura de armazenamento .....	67
16 - Coloração do turbolizado e turbolizados adicionados obtidos com etanol a 80% (v/v), logo após a preparação (tempo zero) e após um e quatorze dias de armazenamento, em função da temperatura de armazenamento .....	68
17 - Coloração do turbolizado e turbolizados adicionados obtidos com etanol a 60% (v/v), logo após a preparação (tempo zero) e após um e quatorze dias de armazenamento, em função da temperatura de armazenamento .....	69
18 - Coloração do turbolizado e turbolizados adicionados obtidos com etanol a 40% (v/v), logo após a preparação (tempo zero) e após um e quatorze dias de armazenamento, em função da temperatura de armazenamento .....	70
19 - Comportamento do pH dos turbolizados etanólicos adicionados em função da temperatura e tempo de armazenamento .....	74
20 - Comportamento do pH do turbolizado e turbolizados adicionados obtidos com etanol a 80% (v/v) em função da temperatura e tempo de armazenamento .....	75
21 - Comportamento do pH do turbolizado e turbolizados adicionados obtidos com etanol a 60% (v/v) em função da temperatura e tempo de armazenamento .....	76

22 - Comportamento do pH do turbolizado e turbolizados adicionados obtidos com etanol a 40% (v/v) em função da temperatura e tempo de armazenamento .....	77
23 - Resíduo seco bruto (RSB) dos turbolizados obtidos com etanol a 60% (v/v) em função da concentração de sumidades floridas .....	79
24 - Resíduo seco purificado (RSP) dos turbolizados obtidos com etanol a 60% (v/v) em função da concentração de sumidades floridas .....	79
25 - Concentração de quercetina nos turbolizados obtidos com etanol a 60% (v/v), após purificação, em função da concentração de sumidades floridas .....	80
26 - Resíduo seco bruto (RSB) dos turbolizados obtidos a partir de 5,0 % (m/v) de sumidades floridas em função da concentração etanólica do líquido extrator ..	80
27 - Resíduo seco purificado (RSP) dos turbolizados obtidos a partir de 5,0 % (m/v) de sumidades floridas em função da concentração etanólica do líquido extrator .....	81
28 - Concentração de quercetina nos turbolizados obtidos a partir de 5,0 % (m/v) de sumidades floridas, após purificação, em função da concentração etanólica do líquido extrator .....	81
29 - Resíduo seco bruto (RSB) e purificado (RSP) dos macerados obtidos com etanol a 60% (v/v) em função da concentração de sumidades floridas e do tempo de maceração .....	82
30 - Concentração de quercetina nos macerados obtidos com etanol a 60% (v/v), após purificação, em função da concentração de sumidades floridas e do tempo de maceração, pelo método de doseamento CP/UV .....	83
31 - Tempo de retenção da quercetina extraída dos macerados obtidos com etanol a 60% (v/v), após purificação, em função do tempo de maceração e da concentração de sumidades floridas, por CLAE .....	84
32 - Concentração de quercetina nos macerados obtidos com etanol a 60% (v/v), após purificação, em função do tempo de maceração e da concentração de sumidades floridas, pelo método de doseamento CLAE .....	85
33 - Resíduo seco bruto (RSB) dos extratos obtidos a partir de 7,5 % (m/v) de sumidades floridas após 8 dias de maceração em função da concentração alcoólica do líquido extrator .....	86

	Página
34 - Resíduo seco purificado (RSP) dos extratos obtidos a partir de 7,5 % (m/v) de sumidades floridas após 8 dias de maceração em função da concentração alcoólica do líquido extrator .....	86
35 - Concentração de quercetina nos extratos purificados obtidos a partir de 7,5 % (m/v) de sumidades floridas após 8 dias de maceração em função da concentração alcoólica do líquido extrator .....	87
36 - Aumento percentual do volume das patas, em relação às patas controle, após injeção local de 0,1 ml de carragenina (0,5 mg/ml) nos grupos tratados, intraperitonealmente, com o extrato hidroalcoólico otimizado das sumidades floridas de <i>Achyrocline satureioides</i> (Lam.) DC., substâncias referência indometacina e seus respectivos veículos de dissolução (grupos controle) .....	88
37 - Atividade antiinflamatória do extrato hidroalcoólico otimizado e da substância referência indometacina, em relação aos grupos controle (solução salina de tris-(hidroximetil)aminometano a 1% (m/v) para o extrato e água estéril para o grupo referência) .....	90
38 - Atividade percentual antiinflamatória do extrato hidroalcoólico otimizado em relação ao grupo referência indometacina .....	90
39 - RSB, RSP e concentração de quercetina determinada pelo método CP/UV, no extrato otimizado .....	94
40 - Comportamento do pH do extrato otimizado e da solução de quercetina a 1,0 mg/ml em etanol a 80% (v/v) em função do tempo e da temperatura de armazenamento .....	94
41 - Concentração de quercetina no extrato otimizado em função do tempo e temperatura de armazenamento .....	95
42 - Concentração de quercetina na solução hidroalcoólica (etanol a 80%; v/v) de quercetina a 1,0 mg/ml em função do tempo e temperatura de armazenamento .....	96
43 - Relação entre a concentração de quercetina (mg%; m/v) e RSB (%; m/m) nos macerados e turbolizados obtidos a partir de 7,5 % (m/v) de sumidades floridas em função da concentração etanólica .....	132
44 - Variação percentual da concentração de quercetina nos macerados obtidos com etanol a 60% (v/v) em função do tempo de maceração .....	139



## LISTA DE FIGURAS

	Página
1 - Pletismógrafo de Winder, Wax e Been, ligeiramente modificado (WINDER et al., 1957) .....	41
2 - Programa para cálculo dos coeficientes de regressão linear simples, correlação linear de PEARSON (r) e teste "t" para r (PROGRAMA A) e cálculo do valor de "t" referente ao teste de diferença entre as médias de duas amostras independentes (PROGRAMA B) .....	44
3 - Análise cromatográfica, nos sistemas Ia, Ib, Ic, Id e Ie, do extrato (E) e das substâncias padrão .....	49
4 - Análise cromatográfica, nos sistemas If, Ig, Ih, Ii e Ij, do extrato (E) e das substâncias padrão .....	50
5 - Análise cromatográfica nos sistemas Ik, Il <sub>1</sub> , Il <sub>2</sub> , Il <sub>3</sub> e Im, do extrato (E) e das substâncias padrão .....	51
6 - Análise cromatográfica, nos sistemas I <sub>1</sub> , I <sub>2</sub> , I <sub>3</sub> , I <sub>4</sub> e I <sub>5</sub> , do extrato (E) e das substâncias padrão .....	53
7 - Análise cromatográfica, nos sistemas II <sub>1</sub> , II <sub>2</sub> , II <sub>3</sub> , II <sub>4</sub> e II <sub>5</sub> , do extrato (E) e das substâncias padrão .	54
8 - Análise cromatográfica, nos sistemas III, IV <sub>1</sub> , V <sub>1</sub> , VI <sub>1</sub> e VI <sub>2</sub> , do extrato (E) e das substâncias padrão .	55
9 - Separação, por CLAE, do padrão externo quercetina (a), mistura de padrões (b) e extrato purificado (c) ....	58
10 - Curva padrão de quercetina em função da área dos picos determinada por CLAE .....	59
11 - Análise cromatográfica (CG) do óleo essencial extraído das flores secas de <i>Achyrocline satureioides</i> (Lam.) DC. no tempo zero de armazenamento do vegetal seco.	60
12 - Análise cromatográfica (CG) do óleo essencial extraído das flores secas de <i>Achyrocline satureioides</i> (Lam.) DC. após 4 meses de armazenamento do vegetal seco..	61

13 - Análise cromatográfica (CG) do óleo essencial extraído das flores secas de <i>Achyrocline satureioides</i> (Lam.) DC. após 8 meses de armazenamento do vegetal seco .	62
14 - Curva padrão de absorção de quercetina a 255 nm, pelo método CP/UV .....	64
15 - Espectros, no ultravioleta, de quercetina após separação por CP e extração com metanol .....	65
16 - Níveis de turvação e sedimentação observados no turbolizado e turbolizados adicionados obtidos com etanol a 80% (v/v) em função da temperatura e tempo de armazenamento .....	71
17 - Níveis de turvação e sedimentação observados no turbolizado e turbolizados adicionados obtidos com etanol a 60% (v/v) em função da temperatura e tempo de armazenamento .....	72
18 - Níveis de turvação e sedimentação observados no turbolizado e turbolizados adicionados obtidos com etanol a 40% (v/v) em função da temperatura e tempo de armazenamento .....	73
19 - Comportamento cromatográfico do turbolizado alcoólico e turbolizados alcoólicos adicionados submetidos às temperaturas de 4°C, ambiente e 60°C, após o sétimo dia de armazenamento, no sistema Ie .....	78
20 - Efeito da administração, i.p., do extrato hidroalcoólico otimizado (A) e de indometacina (B) sobre o edema produzido por carragenina (0,5 mg/ml) .....	89
21 - Análise cromatográfica, no sistema II <sub>2</sub> , do extrato otimizado bruto (EB) e purificado (EP) frente aos padrões de quercetina (Q), 3-O-metilquercetina (MQ), luteolina (LU) e ácido cafeico (AC) .....	92
22 - Análise cromatográfica, no sistema V <sub>1</sub> , do extrato otimizado bruto (EB) e purificado (EP) frente aos padrões de quercetina (Q), 3-O-metilquercetina (MQ), luteolina (LU) e ácido cafeico (AC) .....	93
23 - Espectros, no UV, do padrão de quercetina (1,0 mg/ml), em metanol, submetido à degradação térmica por 32 dias .....	97
24 - Espectros, no UV, da quercetina extraída do extrato otimizado purificado submetido à degradação térmica (60°C), em metanol.....	98
25 - Espectros, no UV, da quercetina extraída do extrato otimizado purificado submetido à degradação térmica (60°C), em metanol .....	99

## Página

- 26 - Análise cromatográfica, no sistema  $V_1$ , do extrato otimizado (EB), no tempo zero (0) e após ter sido submetido à degradação térmica nos tempos 2, 4, 8, 16 e 32 dias, às temperaturas de 40°C (a), 50°C (b) e 60°C (c), frente aos padrões de quercetina (Q), 3-O-metil quercetina (MQ), luteolina (LU) e ácido cafeico (AC). 100
- 27 - Variação do teor de óleo essencial nas flores de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. em função do tempo de armazenamento do vegetal seco ..... 106
- 28 - Relação entre concentração de quercetina e resíduo seco bruto (RSB) dos macerados em função da concentração etanólica do líquido extrator (%; v/v) ..... 107
- 29 - Aspecto geral dos extratos hidroalcoólicos (Ext) obtidos com etanol a 40% (v/v) (40), 60% (v/v) 60 e 80% (v/v) (80) e extratos hidroalcoólicos adicionados (pH↓, pHn, pH↑ e H<sub>2</sub>O), após 7 dias de armazenamento, à temperatura de 60°C ..... 116
- 30 - Comportamento do pH nos turbolizados etanólicos adicionados em função da temperatura ((a) = 4°C; (b) = ambiente; (c) = 60°C) e do tempo de armazenamento . 118
- 31 - Comportamento do pH no turbolizado e turbolizados adicionados, obtidos com etanol a 80% (v/v), em função da temperatura ((a) = 4°C; (b) = ambiente; (c) = 60°C) e do tempo de armazenamento ..... 119
- 32 - Comportamento do pH no turbolizado e turbolizados adicionados, obtidos com etanol a 60% (v/v), em função da temperatura ((a) = 4°C; (b) = ambiente; (c) = 60°C) e tempo de armazenamento ..... 120
- 33 - Comportamento do pH no turbolizado e turbolizados adicionados, obtidos com etanol a 40% (v/v), em função da temperatura ((a) = 4°C; (b) = ambiente; (c) = 60°C) e tempo de armazenamento ..... 121
- 34 - Correlação (r) entre os valores de quercetina nos macerados obtidos com etanol a 60% (v/v) a partir de 2,5, 5,0, 7,5 e 10,0 % (m/v) de sumidades floridas, durante 4, 8 e 16 dias, pelos métodos CP/UV e CLAE . 125
- 35 - Efeito da concentração de sumidades floridas (EtOH = 60%; v/v) e da concentração etanólica (sumidades floridas = 5,0%; m/v) sobre o RSB e RSP dos turbolizados ..... 127

	Página
36 - Efeito da concentração de sumidades floridas (EtOH = 60%; v/v) sobre o RSB e RSP dos macerados (tempo de maceração = 8 dias) .....	128
37 - Variação da concentração de quercetina em função da concentração etanólica (sumidades floridas 5,0 %; m/v) e da concentração de sumidades floridas (EtOH = 60%; v/v) nos extratos obtidos por turbolização ...	130
38 - Efeito da variação da concentração de sumidades floridas sobre a concentração de quercetina em extratos obtidos por maceração durante 8 dias. (EtOH = 60%; v/v) .....	131
39 - Efeito da concentração de sumidades floridas e do tempo de maceração sobre o valor do resíduo seco bruto (RSB) dos extratos obtidos com etanol a 60% (v/v) ..	133
40 - Efeito da concentração de sumidades floridas e do tempo de maceração sobre o valor do resíduo seco purificado (RSP) dos extratos obtidos com etanol a 60% (v/v).	134
41 - Variação da concentração de quercetina determinada por CP/UV, nos macerados obtidos com etanol a 60% (v/v), em função do tempo de maceração e da concentração de sumidades floridas .....	135
42 - Variação da concentração de quercetina determinada por CLAE, nos macerados obtidos com etanol a 60% (v/v), em função do tempo de maceração e da concentração de sumidades floridas .....	136
43 - Efeito da concentração de sumidades floridas nos macerados obtidos com etanol a 60% (v/v) sobre a relação entre o rendimento final em quercetina e a concentração da droga (índice Q). (Tempo de maceração = 8 dias) .....	138
44 - Comportamento do pH do extrato hidroalcoólico otimizado submetido às temperaturas de 40°C, 50°C e 60°C e da solução padrão de quercetina a 60°C .....	142
45 - Efeito sobre a inibição do edema das patas de ratos produzido pela injeção local de 0,1 ml de carragenina (0,5 mg/ml) em ratos tratados, intraperitonealmente, com extrato hidroalcoólico otimizado de <i>Achyrocline satureioides</i> (Lam.) DC., na dose de 200 mg/kg, e com indometacina, na dose de 10 mg/kg .....	145

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Abs	- absorvância
AC	- ácido cafeico
Amb	- temperatura ambiente
b.m.	- banho-maria
CCD	- cromatografia em camada delgada
CG	- cromatografia gasosa
CLAE	- cromatografia líquida de alta eficiência
CP	- cromatografia em papel
CP/UV	- cromatografia em papel/ultravioleta
CQ	- concentração de quercetina
CV	- coeficiente de variação
d.i.	- diâmetro interno
E ou Ext	- extrato
EB	- extrato bruto
EEtOH	- extrato adicionado de etanol
EH <sub>2</sub> O ou H <sub>2</sub> O	- extrato adicionado de água destilada
ep	- erro padrão
EP	- extrato purificado
EpHa ou pH↓	- extrato adicionado de tampão ácido
EpHb ou pH↑	- extrato adicionado de tampão alcalino
EpHn ou pHn	- extrato adicionado de tampão neutro

LU	- luteolina
M	- molar
MB	- macerado bruto
MP	- macerado purificado
MQ	- 3-O-metilquercetina
PF	- ponto de fusão
PM	- peso molecular
PQ	- padrão de quercetina
Q	- quercetina
QE	- quercetina isolada do extrato
QP	- quercetina padrão
r	- correlação de Pearson
RQ	- fator de resolução relativo à quercetina
Rf	- relação de frente
RSB	- resíduo seco bruto
RSP	- resíduo seco purificado
SA	- solução-amostra
SC	- solução comparativa
sh	- "shoulder" (ombro)
SM	- solução-mãe
TB	- turbolizado bruto
tc	- valor calculado da amostra relativo à distribuição "t" de Student
TE	- teor de extrato
TP	- turbolizado purificado
TR	- tempo de retenção
UV	- ultravioleta
VIS	- visível
$\alpha$	- significância do teste de hipótese

## 1 - INTRODUÇÃO

A fitoterapia representa uma opção na prevenção, no tratamento e na cura de estados patológicos. Tal fato é reconhecido pela Organização Mundial da Saúde (PENSO, 1977 e 1980; ROBERT, 1979; FARNSWORTH et al., 1985) e nacionalmente, pelos programas de incentivo à pesquisa patrocinados pela Central de Medicamentos (CEME) (BRASIL, 1985), além de encontrar-se alicerçado nos conhecimentos da medicina tradicional (BLUMENTHAL-BARBY & BALCK, 1986).

O interesse crescente pelos medicamentos de origem vegetal pode ser medido através de sua participação no arsenal terapêutico de diversos países (SCHENKEL et al., 1985). Na Alemanha, a utilização de fitoterápicos cresceu 13%, de 1978 a 1979. Na medicina chinesa, de 5.767 medicamentos, 4.773 são fitoterápicos (MENSSEN, 1981).

Sua aceitação é, no entanto, altamente controversa, principalmente pela inexistência de estudos, em número e profundidade, adequados ao asseguramento da ação biológica e aos fatores determinantes desta ação e da segurança dos produtos empregados pela população.

Essa controvérsia é estimulada pela existência de diversas correntes na farmacoterapia, como por exemplo, da "medicina popular" e da "medicina oficial" e, especialmente pelas posições

diametralmente opostas entre os defensores da "medicina dos cristais" (farmacoterapia com produtos sintéticos ou isolados de origem natural) e da "medicina verde" (fitoterapia) (LIST et al., 1969; VOGEL, 1984).

Muitas drogas vegetais utilizadas na medicina popular tiveram seu uso, antes restrito a sociedades delimitadas, expandido para o consumo generalizado.

A comercialização das drogas, quer "in natura" ou sob formas elaboradas, dissocia os componentes inerentes às práticas populares, exigindo tratamentos adequados a esta nova situação, quais sejam a comprovação da eficácia, sua reprodutibilidade e a segurança do usuário.

A "medicina dos cristais" ("white drugs medicine"), hoje solidamente estabelecida, instituiu a filosofia da "terapia racional" que se arvora na existência da comprovação científica incontestável da eficácia dos fármacos (VOGEL, 1984). Para tanto, há necessidade do conhecimento profundo sobre o local de ação, modo de ação e cinética do fármaco.

Essa posição exclusivista dos defensores da terapia racional, que se consideram como possuidores da verdade absoluta, baseia-se na visão materialista e teórico-cognitiva, que não pode traduzir o ser humano em sua totalidade (VOGEL, 1978 e 1979).

Em sentido contrário, surge a corrente da "medicina verde", centrada na visão vitalista, que pressupõe que os produtos dos seres vivos são os mais apropriados aos seres vivos, porque eles se adequaram uns aos outros pela convivência durante os tempos.

Logo, é inadmissível, no âmbito da medicina oficial, as



sumir unicamente esta ou aquela posição, prejudicando o desenvolvimento da outra corrente. Deve-se, pois, tomar medidas que coadunem ambas correntes, para não se cair no extremismo cego dissociado da realidade.

A eficácia e a constância de ação poderiam ser considerados pontos em comum para as visões da terapia medicamentosa. A constância de ação, por sua vez, é o resultado de um conjunto de medidas que principiam pela tomada de decisão quanto ao emprego de uma determinada droga, continuando com o desenvolvimento da metodologia de produção, o qual estabelece parâmetros necessários a serem mantidos para o alcance de uma determinada qualidade (HEFENDEHL & LANDER, 1984).

Esse consenso remonta ao início do segundo milênio da era cristã, quando foi estipulada a obrigatoriedade de preparar os medicamentos de acordo com normas uniformes, evitando confusões quanto à qualidade das drogas e eficiência dos medicamentos (HELMAN, 1982).

Na primeira metade deste século foram traçados pré-requisitos para a obtenção de medicamentos vegetais eficazes, exigindo-se alto grau de pureza das drogas, uma correta doseificação e uma grande estabilidade dos produtos (HELMAN, 1982).

Partindo-se do pressuposto que a qualidade é a adequabilidade a um determinado emprego (SCHNEIDERS & WOLFF, 1976) e portanto algo mensurável, é imprescindível que a mesma seja determinada e mantida.

O asseguramento da qualidade de fitoterápicos através da identificação farmacognóstica, de ensaios de identidade, quantificação, pureza, propriedades químicas, físicas e biológicas das

matérias-primas, do ciclo de processamento e do produto final significa a preocupação de que esta qualidade seja idêntica a de um protótipo, dentro de determinado grau de tolerância, adequado aos objetivos de seu emprego (BRASIL, 1982; HALBACH, 1983).

Essa necessidade, surgida de modo veemente na década de sessenta e cristalizada nas "Good Manufacturing Practices" (Boas Normas de Fabricação) da Organização Mundial da Saúde, obriga ao tratamento no mesmo nível entre os medicamentos de síntese e de origem vegetal (FREIDEN, 1984).

Atualmente, a ação tóxica de vegetais é bastante conhecida (GOLDFRANK et al., 1982; LARKIN, 1983; MEERE, 1983; HERBS, 1984; FARIAS, 1986), reforçando a adoção das medidas até agora citadas.

O asseguramento da qualidade de fitoterápicos, expresso pela palavra padronização, é assunto de vários estudos (GRAZCA, 1977; MENSSEN, 1979, 1981 e 1982; BERNHARD, 1980; STELLMACH, 1980; VAN OS, 1980; BAUER & WAGNER, 1983; HALBACH, 1983; FARIAS et al., 1985).

Na prática, a análise farmacêutica de medicamentos de origem vegetal envolve grandes problemas ligados aos conhecimentos insuficientes de muitas matérias-primas, o que se acerba nos países em desenvolvimento. Aliado a esse fato, que dificulta o ensaio de produtos cujos princípios ativos sejam desconhecidos ou sua natureza não seja segura, surgem as limitações metodológicas e aparativas, que problematizam a verificação da qualidade de produtos constituídos por diversos extratos vegetais (HALBACH, 1983; STEINIGEN, 1984). Caso os princípios ativos forem desconhecidos, é necessário buscar alternativas que possibilitem a pa

dronização do medicamento. Para tanto, utilizam-se substâncias referência (um ou mais componentes) que sejam as mais típicas possíveis para a matéria-prima em questão, preferencialmente majoritárias, com ou sem ação farmacológica e que sejam extraídas no extrato primário ("miscella") (MENSSEN, 1981; HALBACH, 1983; FROHNE, 1984; LIST & SCHMIDT, 1984). Neste caso, a identidade da matéria-prima deve ser indubitavelmente assegurada, para garantir a qualidade do produto acabado.

Os diferentes métodos existentes para a standardização físico-química de fitoterápicos incluem, entre outros, técnicas cromatográficas que permitem a quantificação de componentes de interesse diretamente, como cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), cromatografia gasosa (CG), cromatografia de gota em contra-corrente (CGCC), cromatografia em camada delgada por remissão (CCD/REM) ou, indiretamente, após separação e extração do cromatograma, seguida de determinação química (volumetria) ou físico-química (UV, fotolorimetria). Neste último caso, incluem-se a cromatografia em papel (CP), cromatografia em coluna (CC) e cromatografia em camada delgada (CCD).

A cromatografia de partição sobre papel na separação de flavonóides foi primeiramente utilizada por BATE-SMITH, em 1948 (HARBORNE, 1959; SEIKEL, 1962). Desde então, vem sendo aplicada satisfatoriamente na separação, em micro-escala, desses compostos.

O emprego quantitativo da cromatografia em papel permite a doseificação de substâncias através de dois métodos principais:

a) método da quantificação das substâncias por com-

paração de pontos visíveis, densitometria, fluorometria, métodos radiotraçadores, métodos polarográficos e condutimétricos, etc.;

b) método da eluição prévia: após desenvolvimento do cromatograma, as bandas de interesse são recortadas do papel e tratadas com solvente apropriado. A solução obtida pode ser diluída ou concentrada conforme o caso, e a concentração estabelecida através de métodos adequados. Entretanto, podem ocorrer perdas e erros conseqüentes da aplicação, desenvolvimento, detecção e eluição (SRIVASTAVA & KISHORE, 1985).

A cromatografia em camada delgada (CCD) tem a vantagem de ser, em geral, mais rápida que a cromatografia em papel (CP). Pode ser usada na análise em série de um grande número de amostras, além de possibilitar a resolução de problemas particulares de identificação. Possui a diversidade de utilização da cromatografia em coluna e o requinte de separação da cromatografia em papel. Os resultados são obtidos rapidamente, mas a reprodutibilidade dos valores de  $R_f$  não é muito boa. A detecção dos pontos é feita nas mesmas condições que em CP, entretanto é possível utilizar reveladores aos quais a celulose não resiste, como por exemplo, ácidos concentrados (RIBÉREAU-GAYON, 1968).

Para a separação de misturas complexas de flavonóides, um dos métodos utilizados atualmente é o da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

A alta sensibilidade da CLAE na separação de uma ampla série de produtos naturais vem sendo verificada por vários pesquisadores e pelo grande número de publicações (WULP & NAGEL, 1976; ROSS & BRAIN, 1977; STRACK & KRAUSE, 1978; AKADA et al., 1980; GRACZA, 1980; KÖSTER et al., 1983; PHILLIPSON, 1984),

que mostram o uso rotineiro desta técnica na análise quali e quantitativa de flavonóides e de vários outros compostos como ácidos carboxílicos, lipídios, fenóis, terpenos, pigmentos naturais, esteróides, aminas, alcalóides, antibióticos e micotoxinas (KINGSTON, 1978).

A CLAE também é empregada como método auxiliar na elucidação de estruturas. PARK et al. (1983) estudaram o efeito do tipo de flavonóide e do padrão e tipo de substituição sobre o tempo de retenção, utilizando sistema gradiente de eluição e coluna de fase reversa. Puderam, deste modo, verificar que a eluição seguia uma ordem de tempo de permanência crescente - flavanona, flavonol e flavona - verificando a mesma seqüência para os respectivos glicosídeos, porém com tempos de retenção menores. O padrão de hidroxilação também possui influência que, de modo geral, traduz-se pela eluição mais rápida com o aumento do número destes substituintes (Tab. 5). A presença de grupamentos metoxila no anel B age diminuindo o tempo de retenção, enquanto que, quando no anel A, prolonga esta característica (PARK et al., 1983). O efeito de metoxilas e da metilação de grupamentos hidroxílicos (Tab. 5) no comportamento cromatográfico foi também estudado por BANKOVA et al. (1982), utilizando coluna de fase reversa e sistema eluente isocrático. Grupos metoxila no anel B aumentaram substancialmente o tempo de retenção, nem sempre produzindo o mesmo efeito quando presentes no anel A. Foi também observado que a forma dos picos do cromatograma depende somente do tipo de flavonóide e não do padrão de substituição, constituindo-se, portanto, no fator principal a ser empregado na elucidação do tipo de flavonóide presente.

Quanto a esse aspecto, PARK et al. (1983) acrescentam que, características espectrais no UV/VIS de um composto flavonoídico, aliadas ao conhecimento do seu tempo relativo a substâncias conhecidas é, às vezes, suficiente para identificar compostos para os quais não existe padrão de referência disponível.

Os fatores que influenciam na preparação de um extrato de alta qualidade são vários e podem ser classificados como:

- teor do princípio ativo na planta, o qual depende de fatores genéticos, taxonômicos, edáficos, ambientais (clima, radiação solar) e estágio de desenvolvimento da planta no período da coleta;

- secagem da droga, onde se objetiva sua estabilização;

- preparação da droga: retirada de partes estranhas e redução da mesma;

- extração: através de diferentes métodos, sendo a maceração e a percolação os de utilização mais generalizada.

Estes aspectos são tratados com maior profundidade por SIEGFRIED (1971), HAGER & SEIDEL (1979), MEIER-BRATSCHI (1979), MENSSEN (1979), BERNHARD (1980) e STELLMACH (1980).

A fase de preparação da droga serve para levar esta a tal forma que permita extração ótima dos princípios ativos. O que determina qual o procedimento a ser seguido é o tipo da droga - ervas, raízes, folhas, flores, frutos - e o tipo e teor dos princípios ativos sobre o processo de extração, em função da forma galênica do produto final.

Quanto à extração da droga, os aparelhos empregados na prática farmacêutica e descritos nas farmacopéias são apropriados, principalmente, para a obtenção de pequenas quantidades de

tinturas ou extratos.

Contrariamente à conhecida regularidade da extração líquido-líquido, a extração sólido-líquido é composta por uma série de características. Na droga moída, rasurada ou amassada, os princípios ativos encontram-se tanto nas células intactas como nas rompidas. No segundo caso, vale a lei da extração líquido-líquido, enquanto que no primeiro, ocorrem fenômenos de difusão através da parede celular em direção à solução. Neste caso, não existe um fator de partição definido; uma parte do solvente permanece retido na superfície das células e nos capilares da droga. O estado de equilíbrio numa fase de extração é alcançado quando a concentração da(s) substância(s) retida(s) nos capilares, extraída(s) das soluções contendo matéria sólida, esteja em concentração igual a do extrato no solvente livre (BERNHARD, 1980; VOIGT & BORNSCHEIN, 1982).

Juntamente com um maior volume de produção possível, há a necessidade de que os princípios ativos sejam extraídos de modo cuidadoso, sem modificá-los. Os solventes mais utilizados, embora nem sempre ideais, constituem-se de álcool, metanol, acetona e suas misturas com água.

Os métodos de extração comumente utilizados fundamentam-se na maceração e na percolação (VOIGT & BORNSCHEIN, 1982; LIST & SCHMIDT, 1984).

A maceração é o mais simples procedimento de extração, consistindo no contato prolongado da droga com o líquido extrator, à temperatura ambiente, durante um tempo determinado, que varia com a droga, com agitação freqüente. O líquido é então separado do resíduo por prensagem. É considerado um método de ex-

tração não exaustivo, pois leva ao equilíbrio de concentração entre a droga e a "miscella" das substâncias extraíveis.

Os métodos derivados da maceração constituem-se de maceração fracionada, sendo suficiente, neste caso, a dimaceração. As polimacerações só melhoram insignificamente o rendimento da extração.

Maceração a temperaturas mais elevadas (30 - 50°C) é denominada digestão. Infusões e cozimentos podem ser considerados como formas especiais de digestão.

Progressos modernos que aumentam o rendimento da maceração se caracterizam pela turboextração ou turbolização (como Ultra-Turrax; por exemplo) e ultrassom e métodos sob vácuo e sob pressão.

A turbolização, processo mais acessível, é utilizado para preparações rápidas e de pequenas quantidades de extratos. A droga é extraída, após a adição do líquido extrator, pela ação de um rotor de grande velocidade. As perdas do solvente são evitadas com fechamento hermético do recipiente. Cuidados devem ser tomados com a elevação da temperatura, devida ao motor e à fricção, a qual não deve ultrapassar os 40°C (DÄRR, 1979; VOIGT & BORNSCHEIN, 1982).

A percolação é caracterizada pela utilização de equipamentos especiais, os percoladores. O líquido de extração flui de cima para baixo, continuamente, através da coluna formada pela droga, e retira as substâncias intracelulares, em parte pela simples lavagem das células e em parte por difusão. A velocidade de fluxo e, conseqüentemente, o tempo de contato da droga com o solvente, é determinado pelo gotejamento do líquido. Esse aspecto,



juntamente com a relação entre droga e líquido extrator e o grau de trituração da droga, são decisivos no rendimento da extração. Face à adição de novas porções do líquido extrator, há o alcance de diversos equilíbrios de concentração droga-"miscella" das substâncias extraíveis, conduzindo a uma extração exaustiva.

Procedimentos de extração relacionados à percolação constituem-se da repercolação, evacolação (percolação à vácuo), diação (percolação sob pressão) e método Soxhlet. Para fins industriais, a extração em contracorrente é a mais adequada.

GRACZA (1977) argumenta sobre as vantagens do emprego de preparações galênicas de drogas vegetais, tais como extratos e tinturas, salientando os seguintes pontos:

- a) promoção da solubilidade e absorção;
- b) ação conservante do veículo, observada em muitos casos, contra o uso da substância pura;
- c) promoção da solubilidade e absorção de algumas substâncias acompanhantes;
- d) promoção da estabilidade.

Preparações farmacêuticas contendo unicamente *A. saturoides* como matéria-prima ainda não foram desenvolvidas. Sua constituição química já foi definida por vários pesquisadores (HEGNAUER, 1969; HÄNSEL & OHLENDORF, 1971; BAUER et al., 1979; FERRARO et al., 1981; KALOGA et al., 1983; HIRSCHMANN, 1984; SIMÕES, 1984).

Embora não tenham sido ainda definidos os princípios ativos responsáveis pela gama de atividades, foi relatado que o vegetal em estudo apresenta principalmente compostos polifenólicos, dos quais, a sua grande maioria são flavonóides (HÄNSEL &

OHLENDORF, 1971; FERRARO et al., 1981; HIRSCHMANN, 1984; SIMÕES, 1984), um derivado  $\alpha$ -pirona (KALOGA et al., 1983) e óleos essenciais, com a predominância de constituintes monoterpenos (RICCIARDI et al., 1961; AKISUE, 1971; BAUER et al., 1979).

SIMÕES (1984) identificou a presença de um composto majoritário nas flores do vegetal em questão - a quercetina - juntamente com seu derivado metoxilado na posição 3 do anel C.

A quercetina é um flavonol bastante difundido no reino vegetal e, por isso, largamente conhecido e estudado, preenchendo, portanto, os requisitos exigidos para sua utilização como substância referência. Alie-se o fato de que pode ser definida e mensurável, garantindo e acompanhando a qualidade, tanto na planta quanto nos produtos intermediários e final.

As considerações quanto à sua ação farmacológica - "ação vitamínica", baseada principalmente na propriedade antioxidativa (SORATA et al., 1984; TAKAHAMA, 1985); inibição de vírus (MUESI & PRAGAI, 1985); ação antibacteriana (ANDERSEN & BERRY, 1947; NAGAHSKI et al., 1947); atividade espasmolítica (SHIBATA et al., 1960; SIMÕES, 1984); proteção contra indução e promoção de tumores (NISHINO et al., 1984); ação antiinflamatória (SIMÕES, 1984); tratamento da gota (SCHIMMER, 1986) - constituem uma vantagem adicional para sua utilização como substância referência.

Contrariamente a esta vantagem, surgem relatos quanto à potência mutagênica da quercetina. HARDIGREE & EPLER (1978), MAC GREGOR & JURD (1986), BROWN & DIETRICH (1979), NAGAO et al. (1981), ELLIGER et al. (1984) observaram ação mutagênica para microorganismos (*Salmonella*). Entretanto, testes com mamíferos "in vivo" (camundongos, ratos e coelhos) apresentaram-se, na sua maioria, negativos (SCHIMMER, 1986).

A ação genotóxica de substâncias isoladas pode ser modificada consideravelmente numa mistura, podendo diminuir ou ser totalmente encoberta, algumas vezes, porém, reforçada. Por isso, seria importante demonstrar a manutenção da potência mutagênica da quercetina em *Salmonella* também em seu extrato ou tintura (SCHIMMER, 1986).

Testes farmacológicos foram realizados para verificação da atividade biológica de preparações de marcela, tendo sido relatadas: atividade antibiótica em extratos das partes aéreas (MOTA, 1963) e em extrato dioxânico das folhas verdes (GUTKIND et al., 1981); atividade espasmolítica em extratos alcoólicos de flores (LANGELOH & SCHENKEL, 1982 e 1982a; SIMÕES, 1984); atividade antiinflamatória e analgésica em extratos aquosos a frio e a quente e extratos alcoólicos de flores (SIMÕES, 1984); ação sedativa central em extratos aquosos de folhas/caules e extratos aquosos a quente de flores (SIMÕES, 1984; SIMÕES et al., 1984) e atividade antiinflamatória tópica em extratos aquosos a quente e a frio das inflorescências (SIMÕES & RECH, 1986). Recentemente, WAGNER et al. (1984) verificaram atividades imunoestimulantes em frações polissacarídicas (heteroglicanos) de extratos aquosos ou alcalino-aquosos.

A sua utilização empírica na medicina popular se faz principalmente na forma de infusos ou decoctos das inflorescências, sendo também observadas preparações de folhas e caules. Os usos são bastante variados, destacando-se indicações como digestiva, antiespasmódica, carminativa, colagoga, eupéptica, antiinflamatória, emenagoga e na diminuição da taxa de colesterol, quando administrada internamente, e antiinflamatória e antisséptica,

quando usada externamente (D'ÁVILA, 1910; PHARMACOPÉIA, 1926; ORTH, 1937; HÖHNE, 1939; LIMA, 1941; GONZALES & LOMBARDO, 1943 e 1946; MANFRED, 1958; CARVALHO, 1972; CHIARINI, 1974; BURKART, 1974; ROSA, 1977; ARAÚJO, 1979; DIMITRI, 1980; VAN DER BERG, 1980; LIFCHITZ, 1981; MOLINA, 1981; SCHMITZ, 1981; FUNDAÇÃO NACIONAL DO ÍNDIO, 1982; PAVETTI et al., 1982; AMAT, 1983; SIMÕES et al., 1986).

Esse conjunto de aspectos positivos quanto à atividade biológica, aliado à ausência de toxicidade para extratos das in florescências (MOTA, 1963; GUTKIND et al., 1981; LANGELOH & SCHENKEL, 1982; SIMÕES, 1984) sugerem a grande possibilidade da utilização deste vegetal como preparações extrativas, além do tradicional uso "in natura", na forma de infusos ou decoctos.

Atualmente, o grande avanço no desenvolvimento da analítica química, refinamento dos métodos de comprovação farmacolôgica e novos conhecimentos em testes clínicos possibilitam maiores afirmações sobre a influência das plantas medicinais nos sistemas fisiológicos e biológicos.

De posse desses vários fatores e tendo em vista a grande utilização popular da marcela no sul do País, objetivou-se e laborar uma preparação farmacêutica das sumidades floridas da *Achyrocline satureioides* na forma de extrato, padronizando-a quimicamente através de seu constituinte flavonoídico - quercetina - e biologicamente pela ação antiinflamatória.

Este trabalho significa, também, a preocupação do Curso de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul em conjugar esforços no sentido de permitir uma visão integrada de drogas vegetais de uso corrente, aliando as investições

gações botânicas, fitoquímicas, farmacológicas e tecnológicas. A marcela, *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. cristaliza, como prmeiro exemplo, esta filosofia.

## 2 - PARTE EXPERIMENTAL

### 2.1 - MATERIAL

#### 2.1.1 - Material Vegetal

O material botânico estudado foi coletado na época de sua floração, em fevereiro de 1985, no distrito de Pinto Bandeira, município de Bento Gonçalves, RS, e armazenado em lugar fresco, ao abrigo da luz solar direta. Sua identificação foi realizada pela Profa. Lilian Auler Mentz, do Departamento de Botânica do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. O vegetal testemunha encontra-se registrado sob o número 63.541 do Herbário ICN da mesma Universidade.

As pesquisas foram desenvolvidas utilizando-se as sumidades floridas reduzidas em moinho de martelos dotado de peneira com abertura de malha de 7 mm. Para a determinação dos óleos essenciais foram utilizadas as flores, sem redução prévia.

#### 2.1.2 - Material Biológico

Na avaliação da atividade antiinflamatória utilizaram-se ratos machos Wistar, adultos, pesando entre 190 a 250 g, provenientes do biotério do Instituto de Biociências da UFRGS. Pa-

ra o ensaio da toxicidade foram utilizados camundongos Swiss, de ambos os sexos, pesando entre 15 e 25 g, provenientes do mesmo biotério.

### 2.1.3 - Aparelhos e Equipamentos

- . Aparelho Clevenger modificado (VAN OS, 1965).
- . Aparelho de destilação para determinação do teor alcoólico (FARMACOPÉIA, 1977).
- . Aparelho de tamisação vibratório RETSCH com tamises segundo a DIN 4188.
- . Areômetro DIN 12791 - série M100 473768 e 473870.
- . Cromatógrafo a gás VARIAN 3700 com detector de ionização de chama, acoplado a integrador HP 3390 H.
- . Cromatógrafo WATERS - modelo 6000 A para cromatografia líquida de alta eficiência com injetor universal U6K, detector de comprimento de onda variável WATERS - Lambda Max-481 e registrador PERKIN-ELMER - modelo 56.
- . Espectrofotômetro ultravioleta VARIAN - série 634 com registrador linear.
- . Estufa de ar circulante HERAEUS - B 5042 - tipo RVT 360.
- . Estufas termostatizadas BIOMATIC.
- . Evaporador rotatório BÜCHI - RV 2.
- . Lâmpada universal de quartzo FLUOTEST 254 e 360 nm.
- . Microscópio de ponto de fusão tipo KOFLER.
- . Microscópio estereoscópico (lupa).
- . Moinho de martelos com peneira de abertura de malha

de 7 mm (GANASINI).

- . pHmetro KNICK pH-mV-METER - tipo 520.
- . Pletismógrafo de Winder, Wax e Been (WINDER et al., 1957).
- . Prensa hidráulica manual HAFICO.
- . Turbolizador ARNO super.

#### 2.1.4 - Reagentes, Soluções e Substâncias Reagentes

Todos os reagentes utilizados, exceto quando diferentemente especificados, possuíam grau de pureza pró-análise. A totalidade das extrações foi realizada com etanol 96° GL (firma PEREIRA).

##### Soluções

- . solução alcoólica de cloreto de alumínio a 2% (m/v)
- . solução de ácido acético glacial a 1% (v/v)
- . solução de ácido clorídrico a 70% (m/v)
- . solução de ácido fosfórico a 1% (m/v)
- . solução de cloreto de sódio a 0,9% (m/v) (solução salina)
- . solução de hexametilenotetramina a 0,5% (m/m)
- . solução hidroalcoólica (água : etanol; 95 : 5; v/v) de laurilsulfato de sódio a 0,05% (m/v)
- . solução de hidrogenofosfato dissódico 0,066 M
- . solução de hidrogenofosfato monossódico 0,066 M
- . solução de indometacina sódica triidratada (INDOCID<sup>F</sup> injetável - Merck, Sharp & Dohme) contendo 25 mg/ml de indometacina
- . solução metanólica de ácido acético glacial a 5% (m/v)
- . solução salina de carragenina sódica (PM 60.000-100.000)



a 0,5 mg/ml

- . solução salina de pentobarbital sódico a 20 mg/ml
- . solução salina de tris-(hidroximetil)aminometano a 1%

(m/v)

- . solução tampão de borato pH 7,0
- . solução tampão de fosfato pH 9,6
- . solução tampão de fosfato seg. Sörensen pH 4,55, 6,98

e 9,03 (MÜNZEL et al., 1959)

Substâncias de referência

- . ácido cafeico<sup>a)</sup>
- . luteolina<sup>b)</sup>
- . 3-O-metilquercetina<sup>c)</sup>
- . quercetina (Firma MERCK; art. 7546 - lote 4149878)
- . limoneno<sup>d)</sup>
- . mistura de  $\alpha$ -pineno e  $\beta$ -pineno<sup>d)</sup>

## 2.2 - METODOLOGIA

### 2.2.1 - Caracterização Botânica

O vegetal foi examinado com auxílio de microscópio este reoscópico (lupa), sob iluminação artificial, dando-se maior ênfase

---

As substâncias de referência citadas foram cedidas por:

- a) - Universidade de Münster - República Federal da Alemanha
- b) - Universidade de Toulouse III - França
- c) - Curso de Pós-Graduação em Farmácia - UFRGS
- d) - Disciplina de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia, UFRGS.

se aos elementos constituintes das sumidades floridas.

#### 2.2.2 - Determinação do pH

Foi realizada em pHmetro calibrado com soluções tampão de fosfato e borato, pH 7,0 e 9,6, respectivamente. As amostras testadas foram preparadas de acordo com os itens 2.2.13.2 e 2.2.17.

#### 2.2.3 - Determinação da Perda por Dessecação (WOJAHN, 1951)

Em pesa-filtro (d.i., 27 mm x 55 mm), previamente tarado, pesou-se exatamente cerca de 2 g da droga, colocou-se em estufa a 100 - 105°C por 2 horas, deixou-se esfriar em dessecador, pesando-se a seguir. Após, recolocou-se em estufa por mais 30 minutos, repetindo-se o procedimento até peso constante.

Determinou-se a perda por dessecação 2, 3, 7, 12 e 17 meses após a coleta, por ocasião, respectivamente, da determinação do teor de extrato e teor de flavonóides totais, caracterização preliminar do extrato, caracterização cromatográfica, determinações quantitativas e desenvolvimento do método de extração.

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

#### 2.2.4 - Determinação do Resíduo Seco (BÖHME, H. & HARTKE, 1981)

Pesou-se exatamente cerca de 20 g do extrato, em pesa-filtro (d.i., 27 mm x 55 mm) previamente tarado, e evaporou-se

em banho-maria, sob movimentação constante. Após evaporação, colocou-se em estufa a 100 - 105°C por 2 horas, deixou-se esfriar em dessecador e pesou-se. O resultado é calculado em relação a 100 g do extrato, pela média de 3 - 5 determinações.

#### 2.2.5 - Determinação do Teor Alcoólico (FARMACOPEIA, 1977)

Foi realizada segundo método da destilação especificado na FARMACOPEIA Brasileira (1977) e o teor alcoólico determinado pela densidade, a 25°C, através de picnômetro e areômetro, com auxílio da tabela alcoométrica. O resultado é fornecido em percentual volumétrico, a 15,56°C.

#### 2.2.6 - Determinação do Teor de Óleo Essencial (FARMACOPEIA, 1977a; BRITISH, 1980)

Realizado conforme método I de dosagem de óleos essenciais nas drogas vegetais, por arraste de vapor d'água, especificado na FARMACOPEIA Brasileira (1977a) e BRITISH Pharmacopoeia (1980), em aparelho Clevenger modificado (VAN OS, 1965).

Utilizou-se 50 g de flores não contundidas em 500 ml de água destilada e procedeu-se a destilação por 5 horas (AKISUE, 1971). O destilado recolhido foi medido, acrescido de 0,5 ml de n-hexano e pequena quantidade de sulfato de sódio anidro e guardado a baixa temperatura (-10°C).

Os testes foram realizados com o vegetal seco, no tempo zero e após 4 e 8 meses de armazenamento.

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

sencial em 50 g da droga e em porcentagem da droga dessecada.

#### 2.2.7 - Determinação do Teor de Extrato (DAC, 1979 - modificada)

Cerca de 1 g da droga moída (800  $\mu\text{m}$ ), exatamente pesado, foi aquecido à fervura com 100 g de água durante 10 minutos. Após resfriamento, completou-se a água evaporada e filtrou-se, desprezando-se os primeiros 20 ml. Com 20,0 g do restante do filtrado determinou-se o resíduo seco conforme técnica descrita no item 2.2.4.

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

$$\text{TE} = \frac{g \times 500}{p} \quad (\% ; \text{ m/m}) \quad (1),$$

onde:

g = massa do resíduo seco (g);

p = massa da droga (g).

#### 2.2.8 - Determinação do Teor de Flavonóides Totais (DAC, 1979a)

Cerca de 0,400 g da droga pulverizada (800  $\mu\text{m}$ ) exatamente pesados, colocados em balão de fundo redondo de 100 ml e acrescidos de 1 ml de uma solução de hexametilenotetramina a 0,5% (m/m) (EUROPEAN, 1969), 20 ml de acetona R (EUROPEAN, 1969) e 2 ml de ácido clorídrico R<sub>1</sub> (EUROPEAN, 1969) foram aquecidos em banho-maria, sob refluxo, por 30 minutos. A mistura foi filtrada para balão volumétrico de 100 ml através de pequena quantidade de algodão. O resíduo da droga e o algodão foram lavados, em balão de

fundo redondo, com duas porções de 20 ml de acetona, aquecendo-se à fervura sob refluxo, por 10 minutos. Após resfriamento à temperatura ambiente, as soluções foram filtradas, através de algodão, para o balão volumétrico, completando-se o volume com acetona. 20 ml da solução foram tratados, em funil de separação, com 20 ml de água e após extraídos com 15 ml de acetato de etila R (EUROPEAN, 1969) repetindo-se por três vezes, com porções de 10 ml de acetato de etila.

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

A 10 ml da SM adicionou-se 1 ml do reagente de cloreto de alumínio (BÖHME & HARTKE, 1981a), diluindo-se a 25 ml com solução metanólica de ácido acético R (BÖHME & HARTKE, 1981a) (solução-amostra SA). Ao mesmo tempo, 10 ml da SM foram diluídos a 25 ml com solução metanólica de ácido acético (solução comparativa SC). Após 30 minutos, mediu-se a extinção da SA a 425 nm, em cubeta com 1,000 cm de espessura contra SC.

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

$$Q = \frac{E \cdot 62500}{500 \cdot e \cdot (100-t)} \quad (\% \text{ m/m}) \quad (2),$$

onde:

E = extinção medida;

e = massa da droga (g);

t = perda por dessecação (% m/m).

fundo redondo, com duas porções de 20 ml de acetona, aquecendo-se à fervura sob refluxo, por 10 minutos. Após resfriamento à temperatura ambiente, as soluções foram filtradas, através de algodão, para o balão volumétrico, completando-se o volume com acetona. 20 ml da solução foram tratados, em funil de separação, com 20 ml de água e após extraídos com 15 ml de acetato de etila R (EUROPEAN, 1969) repetindo-se por três vezes, com porções de 10 ml de acetato de etila.

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

A 10 ml da SM adicionou-se 1 ml do reagente de cloreto de alumínio (BÖHME & HARTKE, 1981a), diluindo-se a 25 ml com solução metanólica de ácido acético R (BÖHME & HARTKE, 1981a) (solução-amostra SA). Ao mesmo tempo, 10 ml da SM foram diluídos a 25 ml com solução metanólica de ácido acético (solução comparativa SC). Após 30 minutos, mediu-se a extinção da SA a 425 nm, em cubeta com 1,000 cm de espessura contra SC.

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

$$Q = \frac{E \cdot 62500}{500 \cdot e \cdot (100-t)} \quad (\% \text{ m/m}) \quad (2),$$

onde:

E = extinção medida;

e = massa da droga (g);

t = perda por dessecação (% m/m).

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

#### 2.2.9 - Determinação do Ponto de Fusão

O ponto de fusão foi realizado em microscópio dotado de bloco tipo Kofler, sem correção.

#### 2.2.10 - Análise Cromatográfica

Para o desenvolvimento das condições cromatográficas sobre papel e em camada delgada foi empregado extrato obtido pelo aquecimento sob refluxo de 10 g da droga em 100 ml de água destilada, durante uma hora. O extrato foi filtrado e o marco pressionado e lavado com água destilada aquecida. Extraíu-se com duas vezes 50 ml mais quatro vezes 25 ml de acetato de etila. O extrato acetato de etila foi lavado com duas vezes 50 ml de água destilada. Acrescentou-se uma pequena quantidade de sulfato de sódio anidro e lavou-se o papel de filtro e o sulfato de sódio com acetato de etila. Evaporou-se em evaporador rotatório e deixou-se 24 horas em dessecador, resultando num resíduo de 0,2285 g. Retomou-se o resíduo em 25 ml de metanol e procedeu-se a análise cromatográfica frente aos padrões de quercetina (Q), 3-O-metilquercetina (MQ), luteolina (LU) e ácido cafeico (AC).

##### 2.2.10.1 - Cromatografia em Papel (CP)

Foram utilizadas, como suporte, tiras de papel de fil-

tro comum ( $138 \text{ g/m}^2$ ) (I) e papel Whatman nº 1 (II) com dimensões de 18 x 25 cm. Os eluentes testados foram preparados de acordo com as seguintes proporções de volume:

a - clorofórmio : metanol : água (60 : 40 : 5);

b - clorofórmio : metanol : água (40 : 60 : 5);

c - clorofórmio : metanol : água (10 : 90 : 5);

d - clorofórmio : ácido acético glacial : água (50:45:5).

(EGGER, 1969);

e - clorofórmio : ácido acético glacial : água (35:60:5);

f - clorofórmio : metanol : ácido acético glacial : água  
(10 : 40 : 45 : 5);

g - clorofórmio : metanol : ácido acético glacial : água  
(25 : 25 : 40 : 5);

h - n-butanol : ácido acético glacial : água (BAW) (4:1:5)  
(STAHL & SCHILD, 1981);

i - n-butanol : ácido acético glacial : água (BAW)  
(60 : 15 : 25);

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

k - ácido clorídrico : ácido acético glacial : água  
(3 : 30 : 10) (Forestal) (HARBORNE, 1959; MARKHAM, 1975);

l - ácido acético (2 - 60%; v/v) (HARBORNE, 1959; MARK-  
HAM, 1975):

1 - a 15%

2 - a 40%

3 - a 60%

m - água destilada (SWAIN, 1976).

Procedeu-se o desenvolvimento ascendente do cromatogra-



ma, em câmara saturada, até altura aproximada de 15 cm. Após secagem do suporte à temperatura ambiente e sob ventilação, as manchas foram detectadas à luz visível, à luz ultravioleta (360 nm), à luz UV<sub>360</sub> após exposição a vapores de amônia, à luz visível e UV<sub>360</sub> após nebulização com cloreto de alumínio a 2% (m/v) e por exposição a vapores de iodo.

#### 2.2.10.2 - Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Os cromatogramas em CCD foram desenvolvidos em placas de vidro (20 x 20 cm), preparadas em laboratório, com os suportes descritos abaixo numa espessura de 0,25 mm, empregando-se os respectivos eluentes (proporções volumétricas):

##### I - silicagel G60 (Merck)

1 - tolueno : clorofórmio : acetona (40 : 25 : 35) (EGGER, 1969; MARKHAM, 1975)

2 - benzeno : piridina : ácido fórmico (36 : 9 : 5) (HÖRHAMMER et al., 1972)

3 - acetato de etila : ácido fórmico : água (100:10:5)

4 - acetato de etila : tolueno : ácido fórmico : água (100 : 50 : 10 : 5)

5 - acetato de etila : tolueno : ácido fórmico : água (50 : 50 : 10 : 5)

##### II - silicagel HF<sub>254</sub> (Merck)

1 - tolueno : clorofórmio : acetona (40 : 25 : 35) (EGGER, 1969)

2 - tolueno : acetato de etila : ácido fórmico : água (80 : 20 : 10 : 5)

3 - tolueno : acetato de etila : ácido fórmico : água  
(65 : 35 : 5 : 5)

4 - clorofórmio : metanol (15 : 1) (MARKHAM, 1975)

5 - benzeno : acetato de etila (3 : 1) (MARKHAM, 1975)

III - silicagel GF<sub>254</sub> (Merck)

- acetato de etila : tolueno : ácido fórmico : água  
(100 : 50 : 10 : 5)

IV - celulose microcristalina para CCD (AVICEL)

1 - clorofórmio : ácido acético glacial : água (50 :  
45 : 5) (EGGER, 1969)

2 - ter-butanol : ácido acético glacial : água (TBA)  
(3 : 1 : 1) (MABRY, 1970; MARKHAM, 1975)

V - celulose microcristalina para CCD (Merck) + poliami  
da 11 para CCD (Merck) (5 : 1; m/m) (MARKHAM, 1975)

1 - clorofórmio : ácido acético glacial : água (50 : 45  
: 5) (EGGER, 1969; MARKHAM, 1975)

2 - ter-butanol : ácido acético glacial : água (TBA)  
(3 : 1 : 1) (MABRY, 1970; MARKHAM, 1975)

VI - poliamida (placas alumizadas) (Merck)

1 - metanol : ácido acético glacial : água (18 : 1 : 1)  
(MABRY, 1970a; MARKHAM, 1975)

2 - clorofórmio : metanol : butanona (60 : 26 : 14) e á  
gua para saturação (MARKHAM, 1975)

As placas com suporte de silicagel foram ativadas a 120°C  
por 20 minutos antes do uso.

Desenvolveram-se os cromatogramas em câmara saturada até,  
aproximadamente, 15 cm de altura.

Para a visualização dos cromatogramas, utilizaram-se os

mesmos agentes de detecção descritos para cromatografia em papel (item 2.2.10.1).

### 2.2.10.3 - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Desenvolveram-se os cromatogramas utilizando-se, como suporte, coluna 5  $\mu$  Spherical C<sub>18</sub> (150 x 3,9 mm) com fase reversa de octadecilsilano, eluente metanol : ácido fosfórico a 1% (v/v) (40 : 60; v/v), fluxo de 2,0 ml/min, detecção a 275 nm com sensibilidade de 0,05 AUFS e velocidade de registro de 10 mm/min com sensibilidade de 10 mV. Todas as soluções foram injetadas em volume de 20  $\mu$ l.

Para a determinação das condições de separação, utilizou-se, ainda, como eluente, metanol : ácido fosfórico a 1% (v/v) nas proporções de volume 55 : 45; 50 : 50; 60 : 40 e 70 : 30 e misturas de proporções diversas de metanol e ácido acético a 1% (v/v), ou seja, 25, 50 e 75% (v/v) e velocidade de fluxo variável.

As soluções de amostras (EP) e padrões foram filtradas através de filtro de politetrafluoretileno, de porosidade 0,22  $\mu$ m, e injetadas com auxílio de seringa de 100  $\mu$ l de capacidade. As misturas eluentes foram filtradas, antes da injeção, através de filtro de politetrafluoretileno, de porosidade 0,45  $\mu$ m, e desgaseificadas sob pressão reduzida, com agitação.

Os fatores de resolução em relação ao padrão externo (RQ) foram calculados através da equação

$$RQ = \frac{2 (t_n - t_Q)}{W_n + W_Q} \quad (\text{MEYER, 1979}) \quad (3)$$

onde:

$t_n$  = tempo de retenção do pico n (cm);  
 $t_Q$  = tempo de retenção do pico de quercetina (cm);  
 $W_n$  = largura da base do pico n (cm);  
 $W_Q$  = largura da base do pico de quercetina (cm).

#### 2.2.10.4 - Cromatografia Gasosa (CG)

Para realização dos cromatogramas em fase gasosa, utilizaram-se as seguintes condições de trabalho: coluna capilar OV-17 (0,32 x 250 mm) de sílica fundida; gás de arraste =  $H_2$ ; temperatura inicial =  $50^\circ C$  por 5 minutos; temperatura final =  $200^\circ C$  por 20 minutos; velocidade do aumento da temperatura da coluna =  $10^\circ C/min$ ; velocidade do papel = 0,5 cm/min; temperatura do detector =  $300^\circ C$ ; temperatura de vaporização =  $210^\circ C$ ; atenuação =  $2^9$ ; razão de "split" = 1/90; volume injetado = 1  $\mu l$ .

As áreas dos picos foram calculadas, com auxílio do integrador, em percentuais da área total do cromatograma, excetuando-se o pico do solvente.

#### 2.2.11 - Métodos de Extração (Preparação dos Extratos)

Os extratos trabalhados durante as pesquisas foram obtidos por turbolização ou maceração das sumidades floridas moídas (item 2.1.1.).

### 2.2.11.1 - Turbolização

Turbolizaram-se 5,0, 10,0, 15,0 e 20,0 g de sumidades floridas com 200 ml de etanol sem diluição (96°GL) ou 200 ml de misturas hidroalcoólicas a 40, 60 e 80% (v/v), em recipiente fechado, por 15 minutos, à temperatura ambiente ( $25^{\circ}\text{C} \pm 3$ ), numa velocidade de  $14.100 \text{ min}^{-1}$ . Previamente, porém, as misturas droga/líquido extrator foram deixadas em repouso durante 15 minutos.

Durante a extração, tomou-se cuidado de evitar que a temperatura não ultrapassasse os  $40^{\circ}\text{C}$ . Caso contrário, deixava-se esfriar, à temperatura ambiente, antes de continuar a extração (DÄRR, 1979; VOIGT & BORNSCHEIN, 1982).

Após extração, os turbolizados foram filtrados através de papel de filtro e prensaram-se os resíduos (marcos) em prensa hidráulica manual. Os extratos resultantes da prensagem foram filtrados e reunidos aos anteriores. Completaram-se os volumes a 200 ml (volume inicial) pela lavagem dos marcos com o próprio líquido extrator, seguida de prensagem e filtração, obtendo-se, dessa forma, os Turbolizados Brutos (TB) (Esquema 1).

Para realização dos estudos preliminares, foram turbolizados 30,0g das sumidades floridas em 350 ml dos líquidos extratores etanol e misturas hidroetanólicas a 40, 60 e 80% (v/v). Seguiu-se metodologia descrita acima, porém, sem completar ao volume inicial.

### 2.2.11.2 - Maceração

Foram macerados 5,0, 10,0, 15,0 e 20,0 g de sumidades

floridas com 200 ml de misturas hidroalcoólicas a 40, 60 e 80% (v/v), durante 1, 2, 4, 8 e 16 dias, em frasco erlenmeyer provido de tampa esmerilhada, ao abrigo da luz, com agitação ocasional.

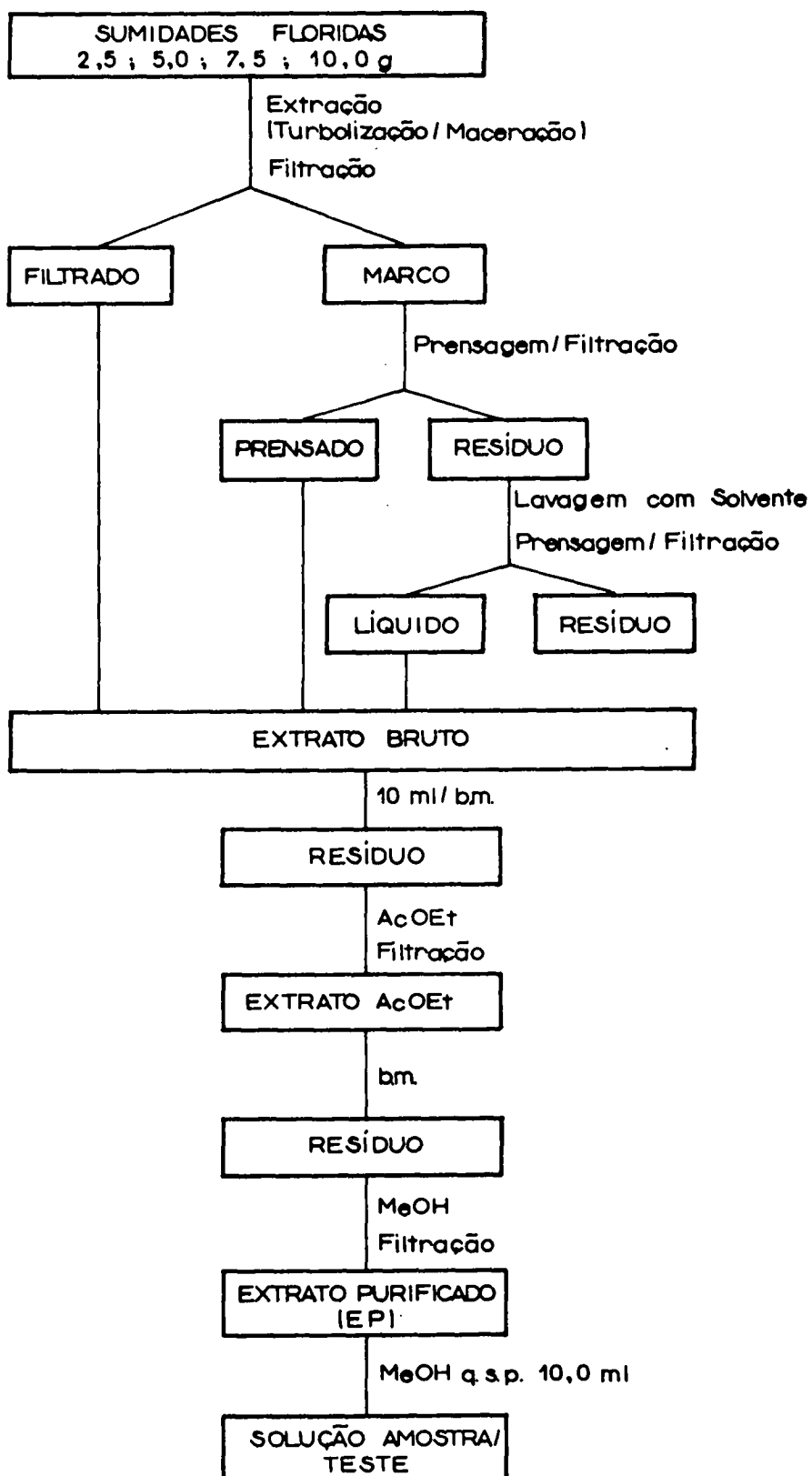
Para fins de estudo da estabilidade e avaliação farmacológica, maceraram-se 75,0 g de sumidades floridas em 1000 ml de etanol a 80% (v/v) por 8 dias, com agitação ocasional.

Para obtenção dos Macerados Brutos (MB), após extração, seguiu-se a metodologia descrita na extração por turbolização (2.2.11.1) (Esquema 1).

#### 2.2.12 - Purificação dos Extratos

Alíquotas de 10,0 ml de cada um dos extratos brutos (TB e MB) foram evaporadas em banho-maria e os resíduos extraídos com, aproximadamente, 10 ml de acetato de etila. Filtrou-se e lavou-se o filtro com o mesmo solvente. O extrato acetato de etila foi levado à secura em banho-maria; os resíduos, tratados com cerca de 5 ml de metanol; a solução, filtrada e o filtro, lavado com o próprio solvente. Completou-se o volume a 10,0 ml com metanol, obtendo-se, assim, os Turbolizados Purificados (TP) e os Macerados Purificados (MP).

Para a análise dos resíduos secos dos extratos purificados, seguiu-se a mesma metodologia, partindo-se de 100,0 ml (em alguns casos 50,0 ml) dos extratos brutos (TB e MB) e determinaram-se os Resíduos Secos Purificados (RSP), conforme descrito no item 2.2.4.



ESQUEMA 1 - Processo de extração e preparação das soluções amostras.

## 2.2.13 - Caracterização Preliminar dos Extratos

### 2.2.13.1 - Preparação dos Tampões

Foram preparados tampões de pH ácido, neutro e alcalino segundo Sörensen (MÜNDEL et al., 1959) conforme Tabela 1.

TABELA 1 - Preparação dos tampões segundo Sörensen.

pH	Hidrogenofosfato monossódico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 0,066 M) (ml)	Hidrogenofosfato dissódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 0,066 M) (ml)
4,65	50,0	-
7,00	20,0	30,0
9,03	-	50,0

### 2.2.13.2 - Procedimento

Verificou-se o comportamento dos extratos alcoólico e hidroalcoólico (EtOH 40, 60 e 80%; v/v) obtidos conforme item 2.2.11.1. De cada um dos 4 extratos, retiraram-se 120 ml que foram divididos em 4 alíquotas de 30 ml, às quais adicionaram-se 30 ml dos tampões de pH ácido, neutro e alcalino e água destilada, respectivamente (extratos modificados). Os 3 extratos tampoados e o extrato adicionado de água foram subdivididos em 3 porções de 20 ml cada, para avaliação frente às temperaturas de 4°C, ambiente e 60°C. Paralelamente, 20 ml de cada extrato hidroalcoólico original foram também submetidos às 3 diferentes temperaturas. O extrato alcoólico foi diluído com igual volume de etanol



e submetido às mesmas condições.

Os 60 extratos foram acondicionados em frascos de vidro âmbar (d.i., 25 mm), dotados de tampa plástica rosqueável e observados durante 14 dias.

No decorrer do período de observação, verificaram-se possíveis alterações das características físico-químicas, tais como: pH, turvação e sedimentação e modificação da característica organoléptica cor.

Os resultados referentes à turvação e sedimentação foram fornecidos com base em 5 níveis, como a seguir:

#### Turvação

- . nível 0: límpido (sem turvação)
- . nível 1: baixa turvação
- . nível 2: média turvação
- . nível 3: alta turvação
- . nível 4: completamente turvo (correspondente ao extrato que apresentou turvação mais intensa)

#### Sedimentação

- . nível 0: sem depósito
- . nível 1: depósito ralo
- . nível 2: depósito entre 2 - 3 mm
- . nível 3: depósito entre 3 - 4 mm
- . nível 4: depósito entre 4 - 5 mm

Verificou-se o comportamento cromatográfico dos extrato alcoólico e extratos alcoólicos modificados frente aos padrões

das agliconas - quercetina (Q), 3-O-metilquercetina (MQ) e luteolina (LU) - e do ácido fenólico - ácido cafeico (AC) - no sistema cromatográfico Ie (item 2.2.10.1).

#### 2.2.14 - Determinação Quantitativa

##### 2.2.14.1 - Preparação da Solução Padrão

Para o método da cromatografia em papel associado à espectroscopia no ultravioleta, utilizou-se solução metanólica de quercetina a 1,0 mg/ml. Na cromatografia líquida de alta eficiência foram empregadas soluções metanólicas de quercetina a 0,024, 0,036 e 0,048 mg/ml, como padrão externo, e 3-O-metilquercetina a 0,120 mg/ml, luteolina a 0,060 mg/ml e ácido cafeico (qualitativamente), como padrões auxiliares.

Para fins de estudo da estabilidade, preparou-se uma solução padrão de quercetina a 1,0 mg/ml em etanol a 80% (v/v).

##### 2.2.14.2 - Cromatografia em Papel/Espectrometria no Ultravioleta (Método CP/UV)

No método de doseamento por cromatografia em papel associado à espectroscopia no UV (CP/UV), as soluções amostras (extratos purificados - TP e MP) oriundas dos macerados e turbolizados contendo 2,5, 5,0, 7,5 e 10,0 % (m/v) de sumidades floridas (EP<sub>2,5</sub>, EP<sub>5,0</sub>, EP<sub>7,5</sub> e EP<sub>10,0</sub>, respectivamente), assim como o padrão (PQ), foram aplicadas na forma de linha de 3 cm de comprimento (Sistema II<sub>2</sub>), com auxílio de seringa de 100 µl de capa

cidade, nos volumes de 300, 150, 100 e 60  $\mu\text{l}$ , respectivamente, para as amostras e de 20  $\mu\text{l}$ , para o padrão. Para a obtenção da curva padrão, foram aplicados 10, 20, 30, 40 e 50  $\mu\text{l}$  da solução padrão.

Após realização dos cromatogramas, recortaram-se as zonas correspondentes à quercetina (padrão e amostras), extraiu-se com metanol, em banho-maria, por 30 minutos, completou-se o volume a 5,0 ml com o mesmo solvente e procedeu-se a leitura das absorvâncias em espectrofotômetro ultravioleta, a 255 nm.

Paralelamente, diluíram-se 10, 20, 30, 40 e 50  $\mu\text{l}$  da solução padrão a 5,0 ml com metanol e determinaram-se as absorvâncias no mesmo comprimento de onda.

A concentração de quercetina nas amostras foi calculada a partir da equação da reta determinada pela curva padrão

$$\text{CQ} = \frac{\text{Abs} - a}{b} \cdot \text{fd} \quad (4),$$

onde:

CQ = concentração de quercetina na amostra (mg%; m/v);

Abs = absorção da quercetina na amostra;

a = intersecção com o eixo de y;

b = inclinação da reta;

fd = fator de diluição em relação à quantidade de sumi-des floridas (%; m/v) (2,5 = 0,333; 5,0 = 0,667; 7,5 = 1,000; 10,0 = 1,667).

Os resultados correspondem à média de 3-6 determinações.

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

### 2.2.14.3 - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (Método CLAE)

O doseamento através do método da CLAE foi realizado mediante comparação da área dos picos com o padrão externo quercetina nas condições especificadas em 2.2.10.3. A área dos picos referentes à quercetina (padrão e amostras) foi determinada pelo método da triangulação (altura x largura a meia altura, em cm) e a concentração de quercetina nas amostras calculada através da equação

$$CQ = \frac{CP \cdot AQ}{AP} \cdot fd \quad (5),$$

onde:

CQ = concentração de quercetina na amostra (mg%; m/v);

CP = concentração de quercetina padrão (mg/ml);

AQ = área do pico de quercetina da amostra (cm<sup>2</sup>);

AP = área do pico de quercetina padrão (cm<sup>2</sup>);

fd = fator de diluição da amostra em relação à quantidade de sumidades floridas (%; m/v); (2,5 = 333,33; 5,0 = 500,00; 7,5 = 666,67; 10,0 = 1000,00).

Os resultados correspondem à média de três determinações. A validação do método foi realizada pela comparação estatística entre as áreas do pico do padrão, a cada determinação.

### 2.2.15 - Verificação da Pureza da Substância Referência

A pureza da quercetina extraída dos extratos purificados, por cromatografia em papel, foi verificada comparando-se o

espectro no ultravioleta com o de uma amostra autêntica. Foram realizados testes adicionais como co-cromatografia com amostra autêntica de quercetina, no sistema  $V_1$ , e cromatografia bidimensional, nos sistemas  $IV_1$  e  $IV_2$ , sentido 1 e 2, respectivamente. O ponto de fusão foi também determinado.

#### 2.2.16 - Desenvolvimento do Método de Extração

Foram realizados testes para a otimização do extrato através dos dois métodos de extração: turbolização e maceração. Os fatores analisados foram:

- . concentração de sumidades floridas: 2,5, 5,0, 7,5 e 10,0 % (m/v);

- . concentração de etanol no líquido extrator: etanol a 40, 60 e 80 % (v/v) e etanol não diluído;

- . tempo de maceração: 1, 2, 4, 8 e 16 dias; em função da concentração de quercetina presente nos extratos e dos resíduos secos brutos e purificados, sendo fixadas a temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 3$ ) e a granulometria da droga.

Além dos fatores acima, foram levados em consideração os testes referentes à caracterização preliminar (item 2.2.13), quanto às características físico-químicas e organolépticas observadas nos extratos.

O macerado obtido a partir de 7,5 % de sumidades floridas com etanol a 80% durante 8 dias foi cromatografado no sistema  $V_1$ .

#### 2.2.17 - Estudo da Estabilidade do Extrato Otimizado

Amostras do extrato otimizado, obtido a partir da maceração de 7,5 % (m/v) de sumidades floridas com etanol a 80% (v/v)

durante 8 dias, foram acondicionadas em frascos de vidro âmbar, dotados de tampa plástica rosqueável, e submetidas às temperaturas de 40, 50 e 60°C, em estufas termostatzadas.

A estabilidade do extrato foi avaliada após o período de 2, 4, 8, 16 e 32 dias de armazenamento, através do doseamento da substância de referência quercetina pelo método de quantificação CP/UV.

Paralelamente, avaliou-se uma solução padrão de quercetina a 1,0 mg/ml em etanol a 80% (v/v), à temperatura de 4°C, ambiente (25°C ± 2) e 60°C, no tempo zero, 16 e 32 dias. Para cada tempo, foram também observadas variações da coloração e do pH, tanto do extrato como da solução padrão.

Analisou-se, cromatograficamente, no sistema V<sub>1</sub>, o extrato hidroalcoólico otimizado, no tempo zero e nos demais tempos, após ter sido submetido à degradação térmica nas temperaturas de 40, 50 e 60°C.

#### 2.2.18 - Avaliação da Atividade Antiinflamatória

Determinou-se a atividade antiinflamatória do extrato obtido a partir da maceração de 7,5 % (m/v) de sumidades floridas com etanol a 80% (v/v) durante 8 dias (resíduo seco = 1,0179% (m/v) ± 0,0086).

Seguiu-se metodologia descrita por WINTER et al. (1962), que utilizaram carragenina para indução do edema nas patas de ratos.

Injetou-se o extrato, intraperitonalmente, na dose de 200 mg/kg de peso corporal, em ratos Wistar, adultos, machos, pesan-

do entre 190 e 250 g, previamente anestesiados, pela mesma via, com solução salina de pentobarbital sódico, na dose de 40 mg/kg de peso corporal. Após 1 hora, induziu-se o edema na aponevrose subplantar da pata traseira esquerda dos ratos, através da injeção de 0,1 ml de solução salina de carragenina a 0,5 mg/ml. As patas direitas serviram de controle, através da injeção de 0,1 ml de salina.

Paralelamente, ensaiaram-se animais controle que receberam, i.p., o veículo utilizado na dissolução, ou seja, solução de tris-(hidroximetil)aminometano a 1% (m/v), correspondente ao volume máximo injetado do extrato.

Um outro grupo de animais recebeu, i.p., uma solução de indometacina, na forma de indometacina sódica triidratada, dissolvida em água estéril, na dose de 10 mg/kg (ARRIGONI-MARTELLI, 1977). Ao grupo controle da indometacina, administrou-se o veículo no volume máximo aplicado aos animais que receberam a solução referência.

Mediram-se os volumes das patas, em triplicata, nos tempos de 0,5, 1, 2, 4 e 6 horas após a injeção do agente flogístico, utilizando-se pletismógrafo de Winder, Wax e Been (WINDER et al., 1967), ligeiramente modificado, onde o volume da pata, quando imersa em A (aproximadamente 15 ml de capacidade), até al tura da articulação tíbio-társica, corresponde ao volume do líquido deslocado em B (Fig. 1). O líquido utilizado foi uma solução do agente tensioativo laurilsulfato de sódio, na concentração de 0,05% (m/v) em água : etanol (95 : 5; v/v).

Os resultados foram calculados em relação ao aumento percentual do volume das patas traseiras, ensaiadas antes e após a injeção do agente flogístico. A atividade antiinflamatória do ex

trato e substância referência foi expressa como percentual de redução do edema, em relação aos grupos controles. A ação antiin-  
flamatória do extrato foi também calculada em relação a 100% da  
atividade da indometacina.

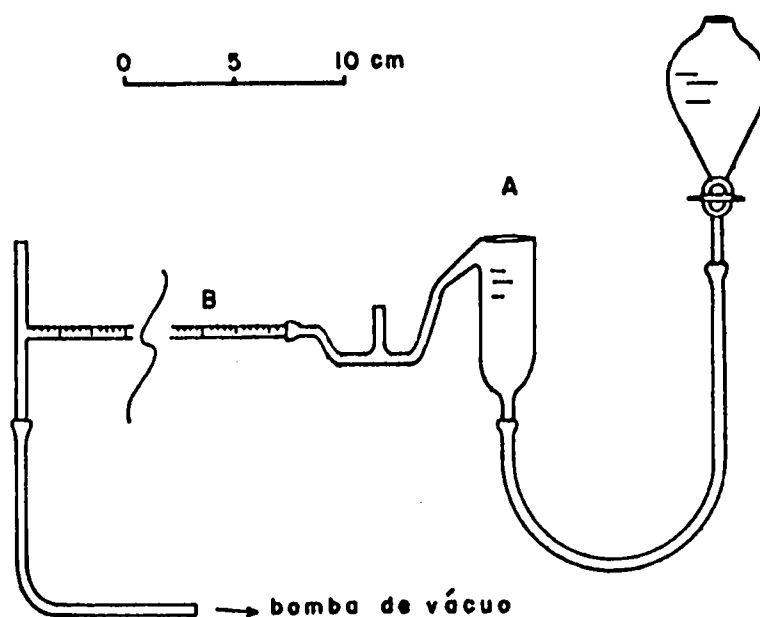


FIGURA 1 - Pletismôgrafo de Winder, Wax e Been, ligeiramente mo-  
dificado (WINDER et al., 1957).

- A - recipiente para imersão da pata do animal, cujo vo-  
lume se deseja determinar;
- B - tubo graduado para onde escoo o líquido, corres-  
pondente ao volume da pata mergulhada.



### 2.2.19 - Determinação do Índice de Atividade Antiinflamatória (iAa)

Dos resultados obtidos através da realização da técnica descrita em 2.2.18, utilizaram-se os dados referentes ao tempo de 4 horas e determinou-se o Índice de atividade antiinflamatória, relativamente ao grupo tratado com a substância referência indometacina, segundo a fórmula

$$iAa = \frac{\% \text{ inibição do extrato}}{\% \text{ inibição da indometacina}} \cdot 100 (\%) (6).$$

### 2.2.20 - Ensaio da Toxicidade

Utilizou-se metodologia preconizada pela Farmacopéia Brasileira (1987)\*.

A camundongos Swiss, de ambos os sexos, pesando entre 15 e 25 g, administrou-se, via i.p., extrato obtido através da maceração de 7,5 % (m/v) de sumidades floridas com etanol a 80% (v/v) durante 8 dias, na dose de 200 mg/kg (resíduo seco = 1,0179 % (m/v)  $\pm$  0,0086).

Foram testados 3 grupos de 7 animais cada um, sendo um dos grupos avaliado em relação ao extrato não degradado e os outros dois, ensaiados com o mesmo extrato submetido à degradação térmica por 16 e 32 dias, na temperatura de 60°C. Um quarto gru

---

\* SCHAPOVAL, E.E.S. (Comissão Permanente de Revisão da Farmacopéia Brasileira. 4. ed.). Comunicação pessoal, 1987.

po de 7 animais serviu de controle, através da administração do veículo de dissolução (solução de tris-(hidroximetil)aminometano a 1% (m/v)) em volume proporcional ao peso.

Os animais foram mantidos em condições normais de ambiente e alimentação e observados durante um período de 48 horas.

### 2.2.21 - Cálculos Estatísticos

As estatísticas calculadas serviram, em sua maioria, para descrição do comportamento individual das variáveis em estudo (médias, desvios padrão, coeficientes de variação).

Foram, também, analisadas amostras de pares de variáveis entre as quais se supunha haver dependência linear, calculando-se os coeficientes de regressão linear e a correlação linear de Pearson ( $r$ ). Sobre esta, testou-se a hipótese de correlação nula ( $H_0$ ) contra a hipótese da correlação ser  $r$  ( $H_1$ ) utilizando-se a distribuição "t" de Student.

Além disso, compararam-se as médias de amostras independentes, testando-se a hipótese de igualdade, através da distribuição "t".

Os cálculos referentes à regressão linear, correlação linear de Pearson ( $r$ ) e teste "t", tanto para a correlação como para a diferença entre as médias de duas amostras independentes, foram elaborados utilizando-se os programas descritos na Figura 2.

Os programas a seguir, escritos em linguagem BASIC, foram desenvolvidos em micro-computador PC-1211 da Sharp. Sua utilização é possível com a máquina no modo de operação "DEF" e todas

## PROGRAMA A

```

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

```

## PROGRAMA B

```

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

```

FIGURA 2 - Programa para cálculo dos coeficientes de regressão linear simples, correlação linear de Pearson (r) e teste "t" para r (PROGRAMA A) e cálculo do valor de "t" referente ao teste de diferença entre as médias de duas amostras independentes (PROGRAMA B).

as memórias disponíveis (consegue-se isso digitando o comando "CLEAR" e a tecla "ENTER"). Os dois programas prevêem um máximo de 18 elementos em cada amostra quando ambos estão na memória.

Caso se deseje utilizar o programa de regressão linear, deve-se pressionar as teclas "SHFT" e "A" e esperar pelas solicitações que o próprio programa fará ao usuário. A entrada de cada um dos dados deverá consistir da digitação do valor solicitado seguido da pressão da tecla "ENTER". Os pares de dados (x;y) da regressão são incluídos da seguinte forma: entra-se com valor de "x", espera-se o sinal "?" e então entra-se com o valor de "y".

Para a utilização do programa de teste de diferença entre as médias de duas amostras independentes (PROGRAMA B), pressionam-se as teclas "SHFT" e "B" e espera-se pelas solicitações do programa. A forma de entrada de dados é análoga à do programa de regressão (PROGRAMA A).

Os programas param ao apresentarem algum resultado, esperando que o usuário pressione "ENTER" para continuar o processamento.

### 3 - RESULTADOS

#### 3.1 - CARACTERIZAÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO

##### 3.1.1 - Descrição Botânica

TABELA 2 - Caracterização botânica das partes aéreas de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. Compilação obtida de dados bibliográficos e material depositado no Herbário da UFRGS.

Elemento	Característica
Distribuição no Estado do RS	Ampla
Período de floração	Verão, esporadicamente no restante do ano
Habitus	Subarbusto
Caule	Não alado
Folhas com	Pecíolo sésil ou estreitadas em curto pecíolo Limbo linear a linear-lanceolado Pêlos branco tomentosos Dimensões variáveis (até 1,8 x 12 cm)
Capítulos	Reunidos em densos glomérulos paniculados, de aproximadamente 1 mm de diâmetro
brácteas	Amarelas, de consistência escariosa, forma lanceolada e ápice agudo, número de séries variáveis (3 a 4 séries, totalizando, aproximadamente, 14 brácteas)

Cont.

TABELA 2 - Continuação.

Elemento	Características
Flores	Femininas filiformes radiais (normalmente entre 3-6) Hermafroditas tubulosas centrais (até cerca de 3)
Papus	Branco, unisseriado, com cerca de 4 mm de comprimento e formado por 20 cerdas
Aquênio	Escuro, glabro, elipsoidal

## 3.1.2 - Perda por Dessecação

TABELA 3 - Perda por dessecação do material botânico em função do tempo de armazenamento.

Tempo de armazenamento (meses)	n	Perda por dessecação	
		(%; m/m)	CV (%)
2	3	13,00 ± 0,15	1,18
3	3	12,28 ± 0,27	2,17
7	3	11,68 ± 0,09	0,76
12	3	11,03 ± 0,05	0,49
17	3	10,42 ± 0,17	1,66

## 3.1.3 - Determinação do Teor de Extrato

O resíduo seco obtido pela aplicação da técnica descrito no item 2.2.7, a partir de 1,0050 g do vegetal, foi de 0,0290 g, resultando num teor de extrato de 14,43%.

### 3.1.4 - Determinação do Teor de Flavonóides Totais

O teor de flavonóides totais foi calculado como quercetina, através da equação (2), conforme metodologia descrita no item 2.2.8, partindo dos seguintes dados:  $E_{425\text{nm}} = 0,547$ ;  $e = 0,401 \text{ g}$ ;  $t = 13,00 \% \text{ (m/m)}$ . O teor de flavonóides resultou em  $1,96 \% \text{ (m/m)}$ .

### 3.1.5 - Determinação do Teor de Óleo Essencial

TABELA 4 - Porcentagem de óleo essencial das flores de *A. saturoioides* em função do tempo de armazenamento do vegetal seco.

Tempo de armazenamento do vegetal seco (meses)	Volume de óleo essencial em 50 g da droga (ml)	Perda por dessecção das flores inteiras (%; m/m)	Óleo essencial em relação à droga dessecada (%; v/m)
0	0,74	12,46 ± 0,47	0,84
4	0,61	12,88 ± 0,70	0,69
8	0,64	9,47 ± 0,87	0,70

### 3.2 - ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

As Figuras 3, 4, 5, 6, 7 e 8 e Tabelas 5 e 6 representam o comportamento cromatográfico do extrato obtido conforme metodologia descrita em 2.2.10, comparativamente às substâncias padrão.

## 3.2.1 - Cromatografia em Papel (CP)

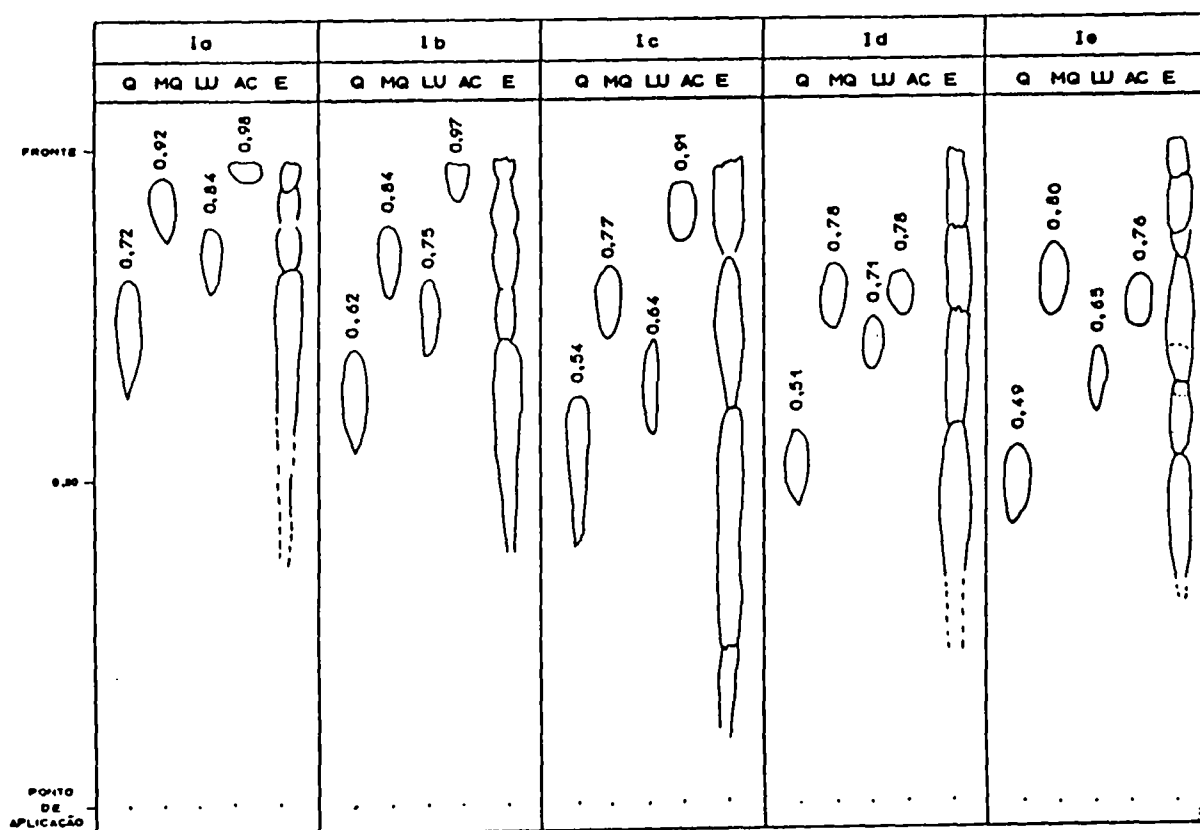


FIGURA 3 - Análise cromatográfica, nos sistemas Ia, Ib, Ic, Id e Ie, do extrato (E) e das substâncias padrão (Q = quer<sub>u</sub> cetina; MQ = 3-O-metilquer<sub>u</sub> cetina, LU = luteolina; AC = ácido cafeico).

Suporte: papel de filtro comum; Eluentes: Ia = cloro<sub>u</sub> fórmio:metanol:águ<sub>a</sub> (60:40:5); Ib = cloro<sub>u</sub> fórmio:metanol:águ<sub>a</sub> (40:60:5); Ic = cloro<sub>u</sub> fórmio:meta-  
 nol:águ<sub>a</sub> (10:90:5); Id = cloro<sub>u</sub> fórmio:ácu<sub>u</sub> do acético glacial:águ<sub>a</sub> (50:45:5);  
 Ie = cloro<sub>u</sub> fórmio:ácu<sub>u</sub> do acético glacial:águ<sub>a</sub> (35:60:5).



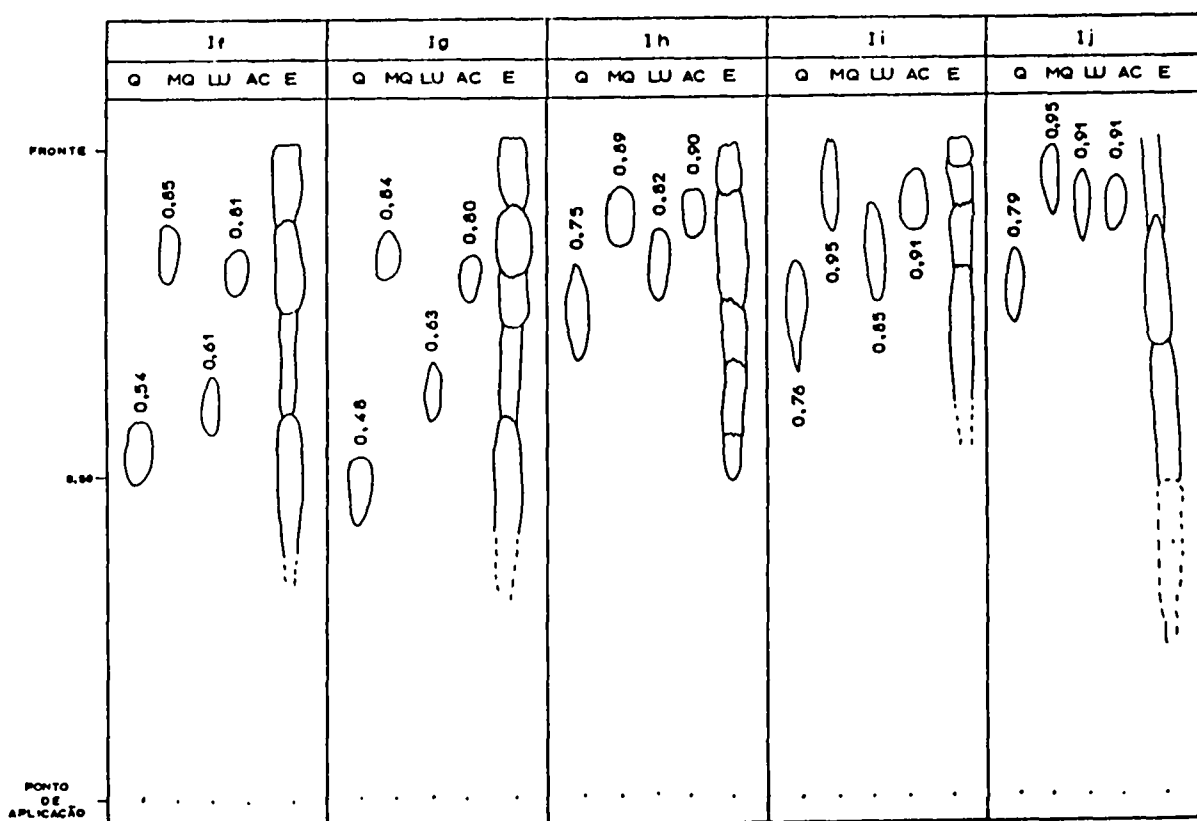


FIGURA 4 - Análise cromatográfica, nos sistemas If, Ig, Ih, Ii e Ij, do extrato (E) e das substâncias padrão (Q = quer cetina; MQ = 3-O-metilquercetina; LU = luteolina; AC = ácido cafeico).

Suporte: papel de filtro comum; Eluentes: If = clorofórmio:metanol:ácido acético glacial:água (10:40:45:5); Ig = clorofórmio:metanol:ácido acético glacial:água (25:25:40:5); Ih = n-butanol:ácido acético glacial:água (BAW) (4:1:5); Ii = n-butanol:ácido acético glacial:água (BAW) (60:15:25); Ij = n-butanol:ácido acético glacial:água (BAW) (6:1:2).

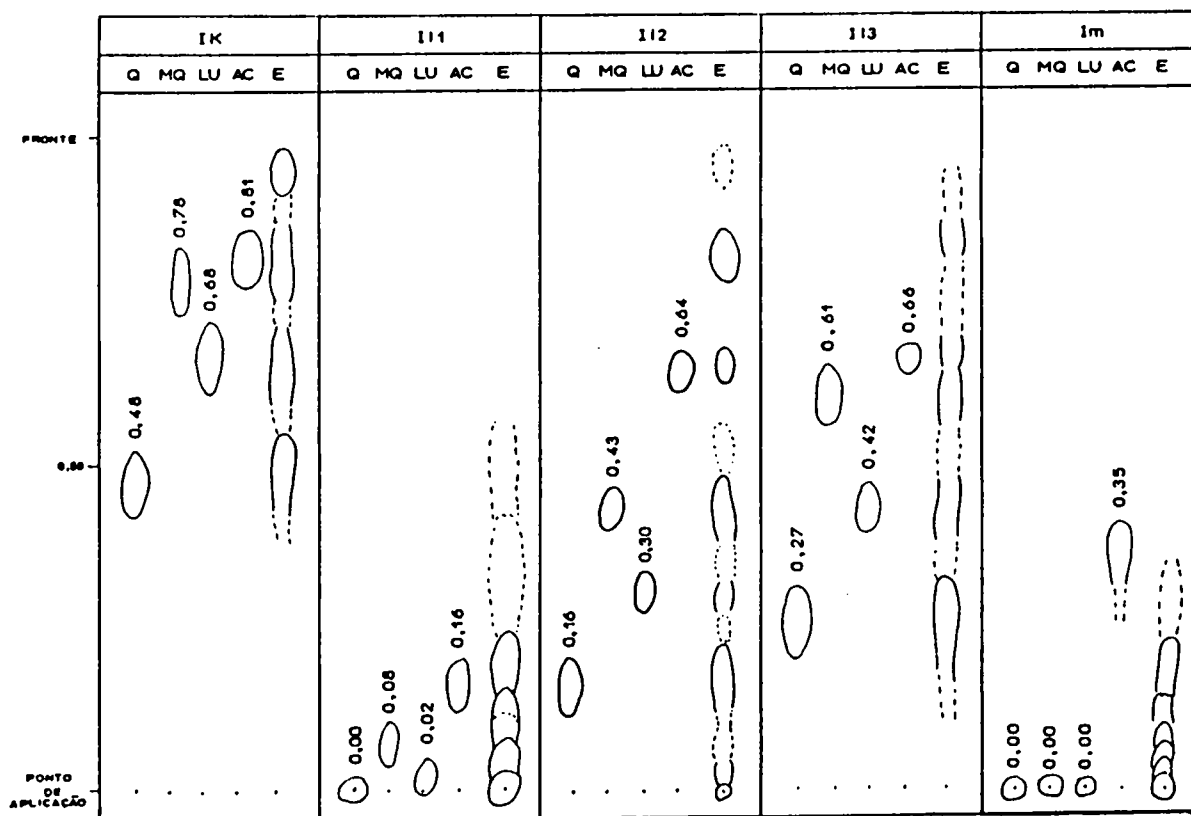
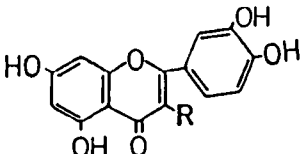
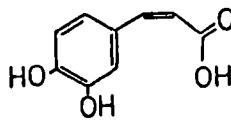


FIGURA 5 - Análise cromatográfica, nos sistemas Ik, Il<sub>1</sub>, Il<sub>2</sub>, Il<sub>3</sub> e Im, do extrato (E) e das substâncias padrão (Q=queretina; MQ = 3-O-metilqueretina; LU = luteolina; AC = ácido cafeico).

Suporte: papel de filtro comum; Eluentes: Ik = ácido clorídrico:ácido acético glacial:água (Forestal) (3:30:10); Il<sub>1</sub> = ácido acético a 15%; Il<sub>2</sub> = ácido acético a 40%; Il<sub>3</sub> = ácido acético a 60%; Im = água destilada.

TABELA 5 - Comportamento cromatográfico das substâncias padrão e substâncias com Rf correspondente observado no extrato, no sistema I12 (veja Fig. 5).

Substância	Querceti na	3-O-Me- tilquer- cetina	Luteolina	Ácido cafeico	
Fórmula					
	R=OH	R=OCH <sub>3</sub>	R=H		
Rf	0,16	0,45	0,27	0,66	
DETECÇÃO	Visível	Amarelo	-	-	
	UV <sub>360</sub>	Amarelo brilhante	Marrom opaco	Marrom amarelo	Azul Azul violáceo*
	NH <sub>3</sub> /UV <sub>360</sub>	Amarelo brilhante intenso	Amarelo pálido	Amarelo pálido Amarelo esverdeado*	Azul brilhante Azul esverdeado*
	AlCl <sub>3</sub>	Amarelo- limão	Amarelo	Amarelo- limão	-
	AlCl <sub>3</sub> /UV <sub>360</sub>	Amarelo- limão intenso	Amarelo pálido intenso	Amarelo- limão intenso	Azul brilhante Azul esbranquiçado*
	Vapores de iodo	Marrom amarelado	Marrom amarelado	Marrom amarelado	Marrom amarelado

\* Variações no comportamento das manchas com Rf correspondente aos respectivos padrões detectadas no extrato.

## 3.2.2 - Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

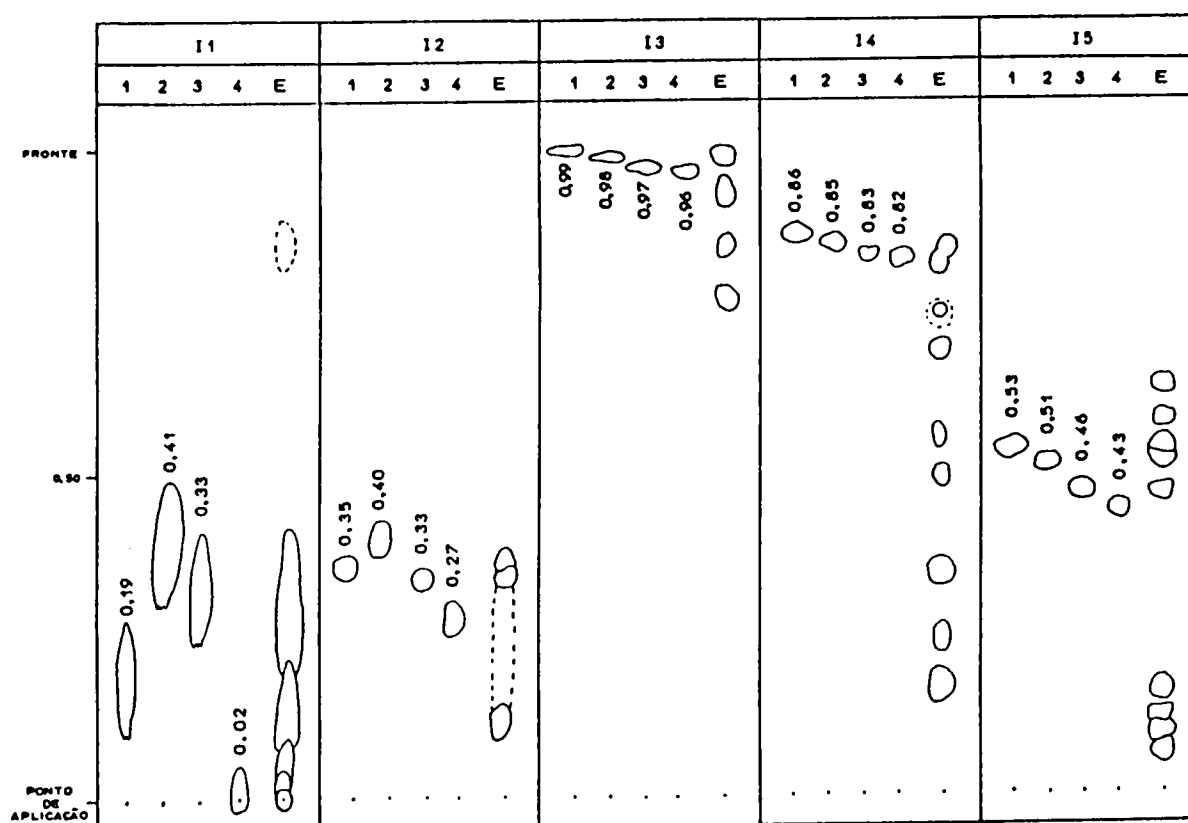


FIGURA 6 - Análise cromatográfica, nos sistemas I<sub>1</sub>, I<sub>2</sub>, I<sub>3</sub>, I<sub>4</sub> e I<sub>5</sub>, do extrato (E) e das substâncias padrão (1 = quercetina; 2 = 3-O-metilquercetina; 3 = luteolina; 4 = ácido cafeico).

Suporte: silicagel G60; Eluentes: I<sub>1</sub> = tolueno:clorofórmio:acetona (40:25:35); I<sub>2</sub> = benzeno:piridina:ácido fórmico (36:9:5); I<sub>3</sub> = acetato de etila:ácido fórmico:água (100:10:5); I<sub>4</sub> = acetato de etila:tolueno:ácido fórmico:água (100:50:10:5); I<sub>5</sub> = acetato de etila:tolueno:ácido fórmico:água (50:50:10:5).

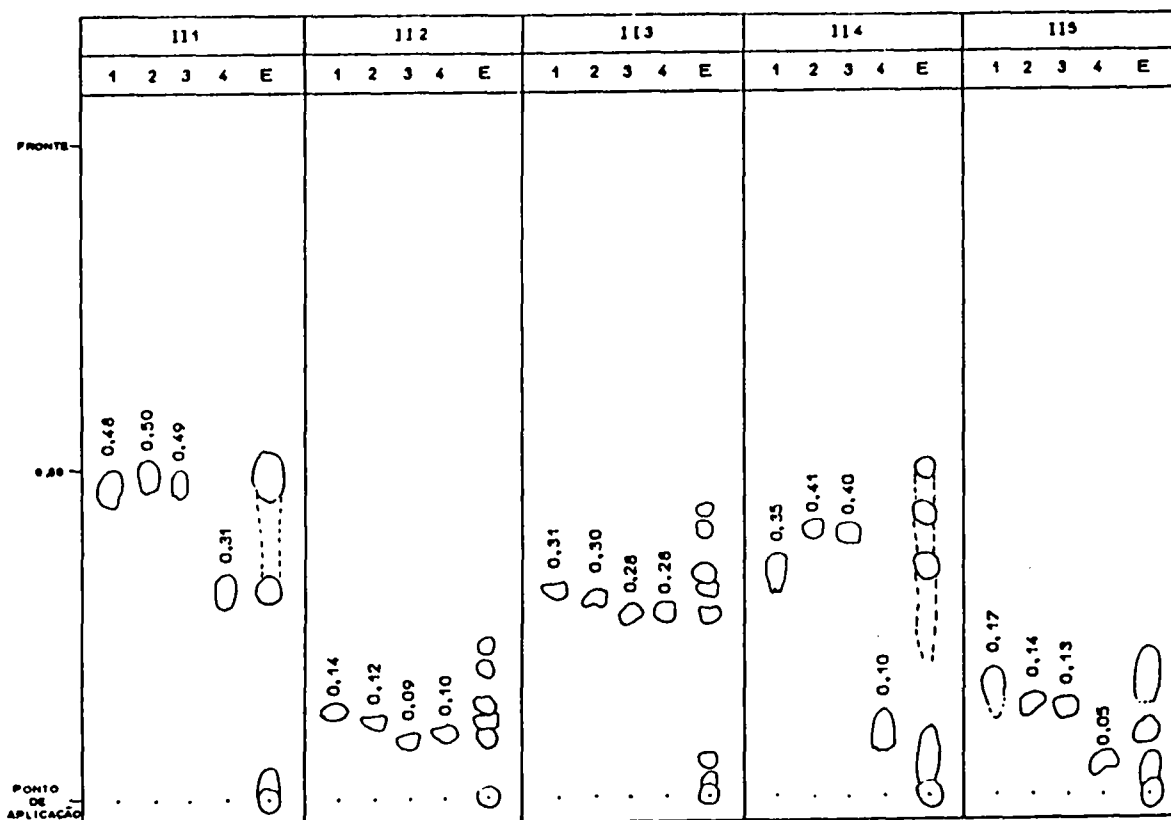


FIGURA 7 - Análise cromatográfica, nos sistemas II<sub>1</sub>, II<sub>2</sub>, II<sub>3</sub>, II<sub>4</sub> e II<sub>5</sub>, do extrato (E) e das substâncias padrão (1 = quercetina; 2 = 3-O-metilquercetina; 3 = luteolina; 4 = ácido cafeico).

Suporte: silicagel HF254; Eluentes: II<sub>1</sub> = tolueno:clorofórmio:acetona (40:25:35); II<sub>2</sub> = tolueno:acetato de etila:ácido fórmico:água (80:20:10:5); II<sub>3</sub> = tolueno:acetato de etila:ácido fórmico:água (65:35:5:5); II<sub>4</sub> = clorofórmio:metanol (15:1); II<sub>5</sub> = benzeno:acetato de etila (3:1).

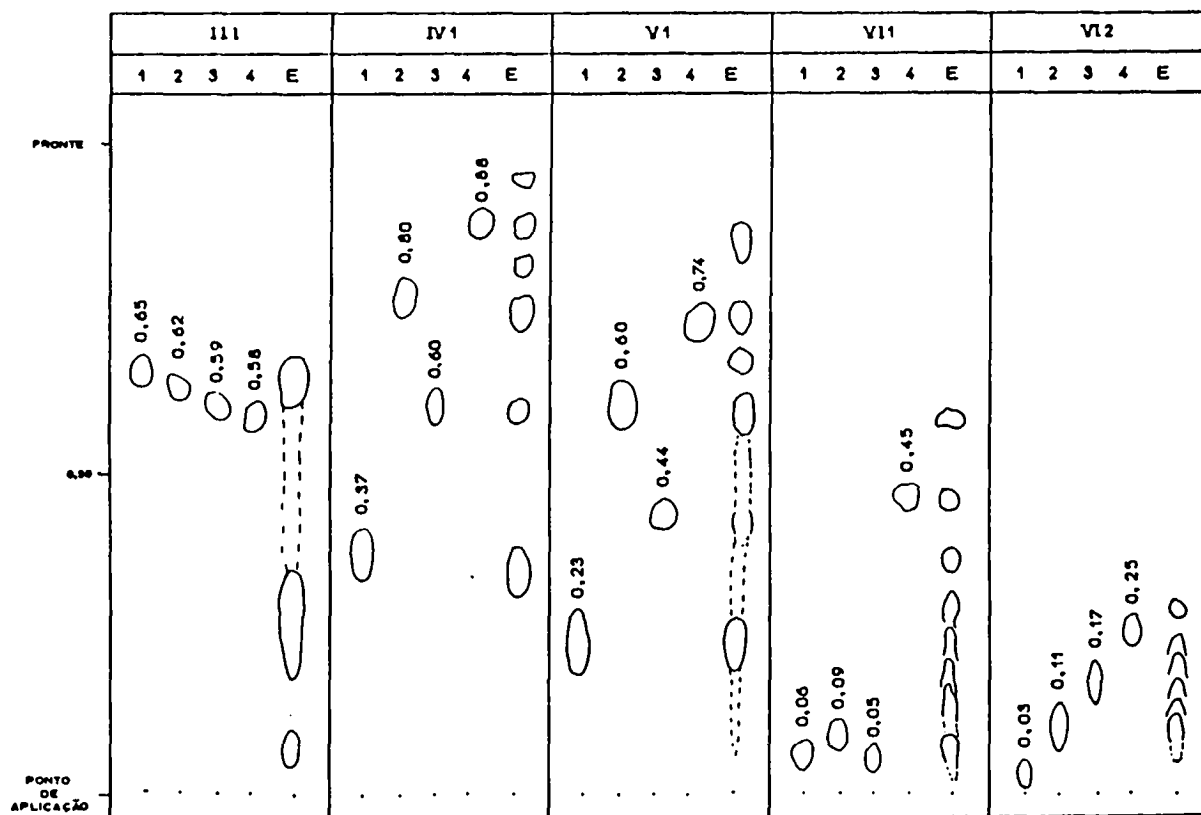


FIGURA 8 - Análise cromatográfica, nos sistemas III, IV<sub>1</sub>, V<sub>1</sub>, VI<sub>1</sub> e VI<sub>2</sub>, do extrato (E) e das substâncias padrão (1 = quercetina; 2 = 3-O-metilquercetina; 3 = luteolina; 4 = ácido cafeico).

Suporte: silicagel GF<sub>254</sub>; Eluente: III = acetato de etila:tolueno:ácido fórmico:água (100:50:10:5).

Suporte: celulose; Eluente: IV<sub>1</sub> = clorofórmio:ácido acético glacial:água (50:45:5).

Suporte: celulose + poliamida (5:1); Eluente: V<sub>1</sub> = clorofórmio:ácido acético glacial:água (50:45:5).

Suporte: poliamida; Eluentes: VI<sub>1</sub> = metanol:ácido acético glacial:água (18:1:1); VI<sub>2</sub> = clorofórmio:metanol:butanona (60:26:14).

TABELA 6 - Comportamento cromatográfico das substâncias padrão e substâncias com Rf correspondente observado no extrato, no sistema V<sub>1</sub> (veja Fig. 8).

Substância	Quercetina	3-O-Metil quercetina	Luteolina	Ácido cafeico	
Relação de frente (Rf)	0,24	0,62	0,45	0,76	
DETECÇÃO	Visível	Amarelo	-	-	
	UV <sub>360</sub>	Amarelo-ouro	Marrom violáceo	Marrom violáceo	
	NH <sub>3</sub> /UV <sub>360</sub>	Amarelo-ouro intenso	Amarelo pálido intenso	Amarelo pálido	Azul esverdeado Marrom violáceo*
	AlCl <sub>3</sub>	Amarelo-limão	Amarelo	Amarelo fraco	Verde amarelado Marrom esverdeado*
	AlCl <sub>3</sub> /UV <sub>360</sub>	Amarelo-limão intenso	Amarelo-ouro	Amarelo	Verde amarelado Amarelo esverdeado*
	Vapores de iodo	Marrom	Marrom	Marrom	Marrom

\* Variações no comportamento das manchas com Rf correspondente aos respectivos padrões detectadas no extrato.

### 3.2.3 - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A Figura 9(c) refere-se ao extrato hidroalcoólico purificado resultante da maceração de 7,5 % (m/v) de sumidades floridas com etanol a 60% (v/v) durante 8 dias.

TABELA 7 - Tempo de retenção (TR), largura da base do pico (W) e fator de resolução relativo à quercetina (RQ) das substâncias padrão analisadas por CLAE.

Substância	TR (cm)	W (cm)	RQ
Quercetina	3,44	0,85	0
3-O-Metilquercetina e Luteolina	4,45	1,00	1,09
Ácido cafeico	2,35	0,58	1,52



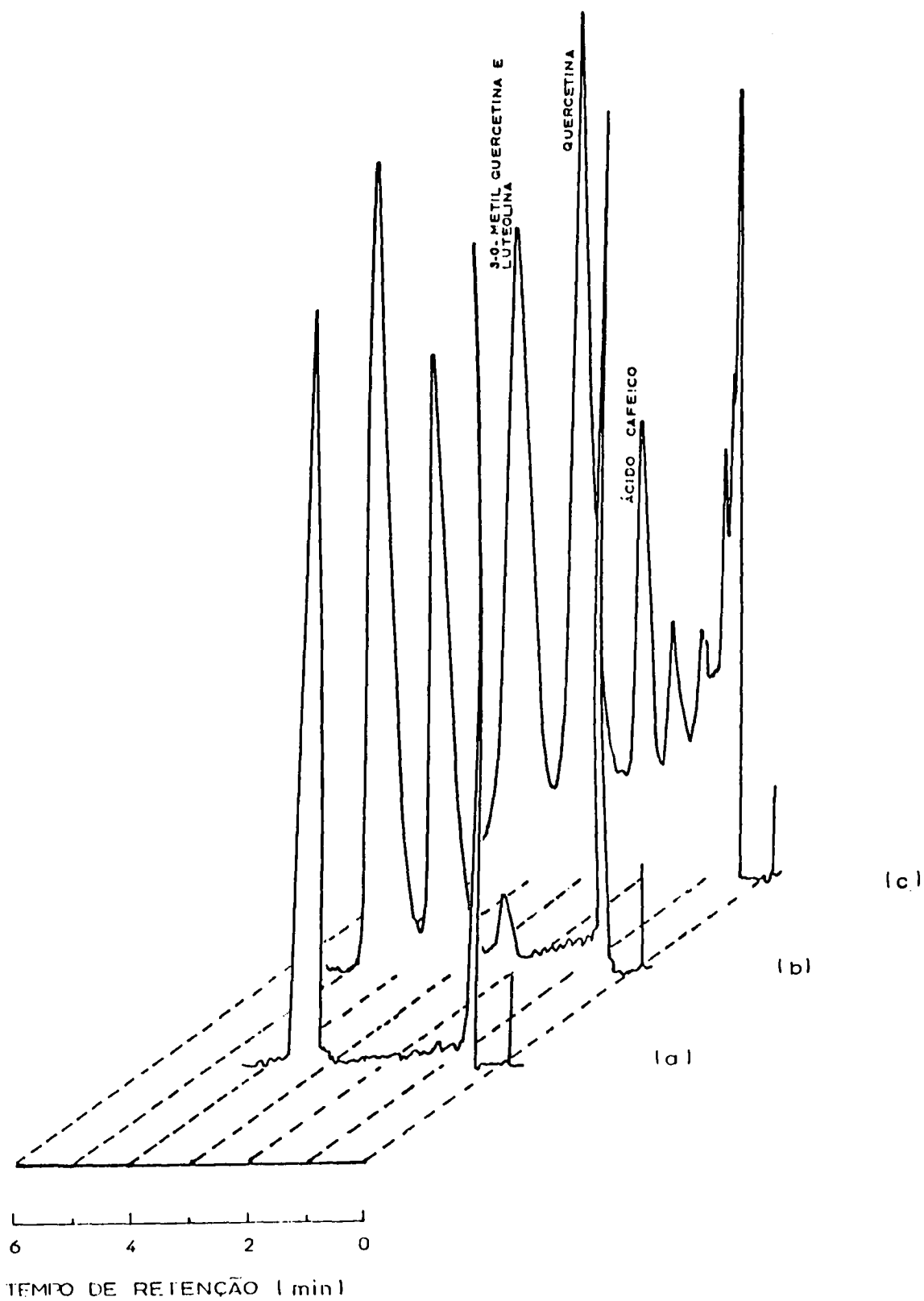


FIGURA 9 - Separação, por CLAE, do padrão externo quercetina (a), mistura de padrões (b) e extrato purificado (c).

## Curva padrão de quercetina

TABELA 8 - Área dos picos de quercetina determinada por CLAE.

Concentração de quercetina ( $\mu\text{g/ml}$ )	n	Área do pico ( $\text{cm}^2$ )	CV (%)
24	3	$2,94 \pm 0,15$	5,12
36	26	$4,31 \pm 0,15$	3,48
48	8	$6,29 \pm 0,30$	4,77

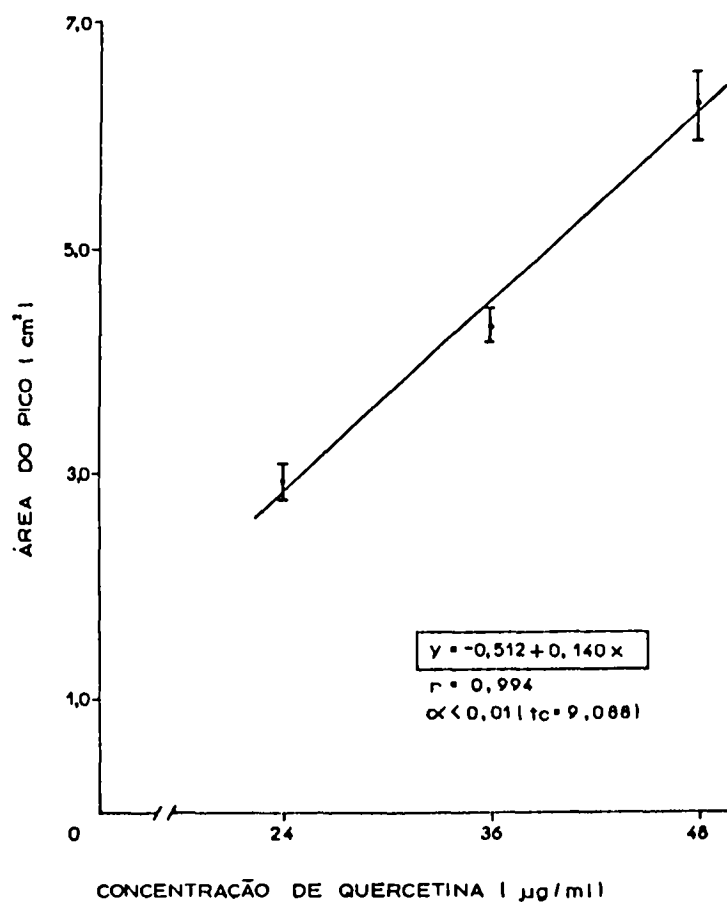


FIGURA 10 - Curva padrão de quercetina em função da área dos picos determinada por CLAE.

## 3.2.4 - Cromatografia Gasosa (CG)

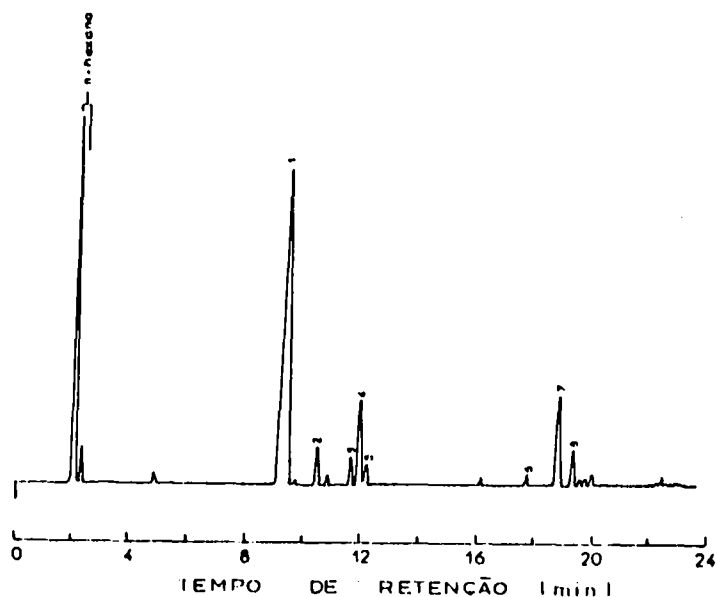


FIGURA 11 - Análise cromatográfica (CG) do óleo essencial extraído das flores secas de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. no tempo zero de armazenamento do vegetal seco. (Condições: veja item 2.2.10.4)

TABELA 9 - Cromatografia gasosa do óleo essencial extraído das flores secas de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. no tempo zero de armazenamento do vegetal seco. Tempo de retenção (TR) e percentual da área total do cromatograma (exceto a área do solvente) dos principais picos (acima de 1%).

Pico nº	TR (min)	Área (%)	Pico nº	TR (min)	Área (%)
1	9,31	68,54	5	12,12	1,61
2	10,41	3,38	6	17,67	1,18
3	11,59	2,50	7	18,74	10,83
4	11,87	8,49	8	19,25	3,47

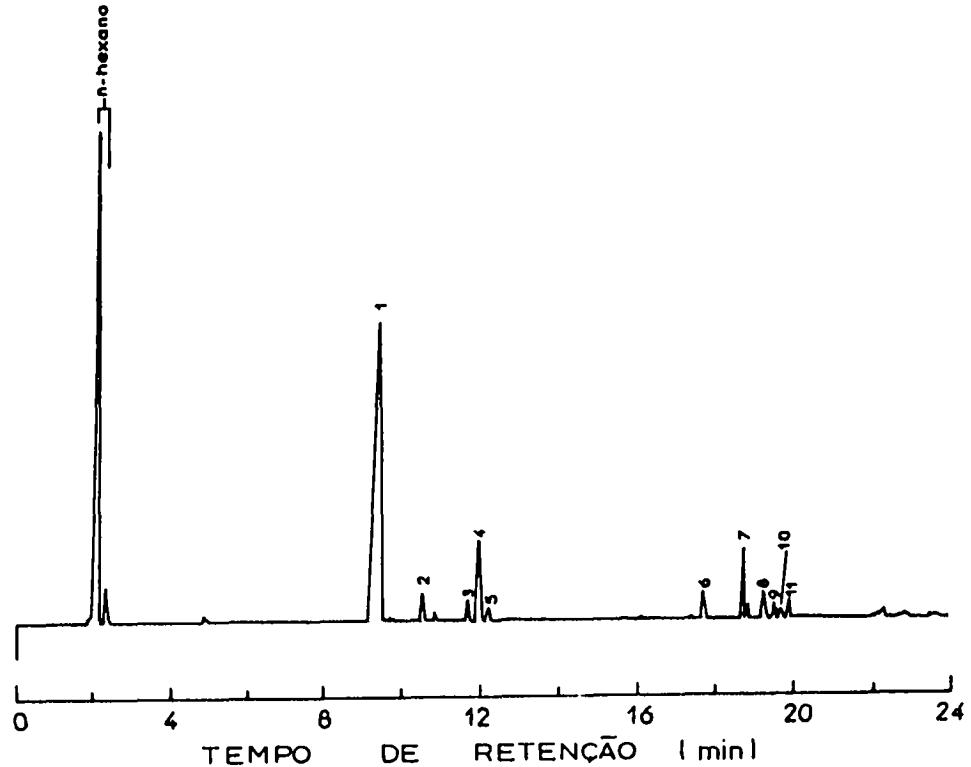


FIGURA 12 - Análise cromatográfica (CG) do óleo essencial extraído das flores secas de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. após 4 meses de armazenamento do vegetal seco. (Condições: veja item 2.2.10.4)

TABELA 10 - Cromatografia gasosa do óleo essencial extraído das flores secas de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. após 4 meses de armazenamento do vegetal seco. Tempo de retenção (TR) e percentual da área total do cromatograma (exceto a área do solvente) dos principais picos (acima de 1%).

Pico nº	TR (min)	Área (%)	Pico nº	TR (min)	Área (%)
1	9,27	64,17	7	18,71	8,49
2	10,42	2,79	8	19,24	3,18
3	11,60	2,08	9	19,53	1,97
4	11,88	9,22	10	19,90	1,72
5	12,12	1,68	11	22,34	1,78
6	17,68	2,94			

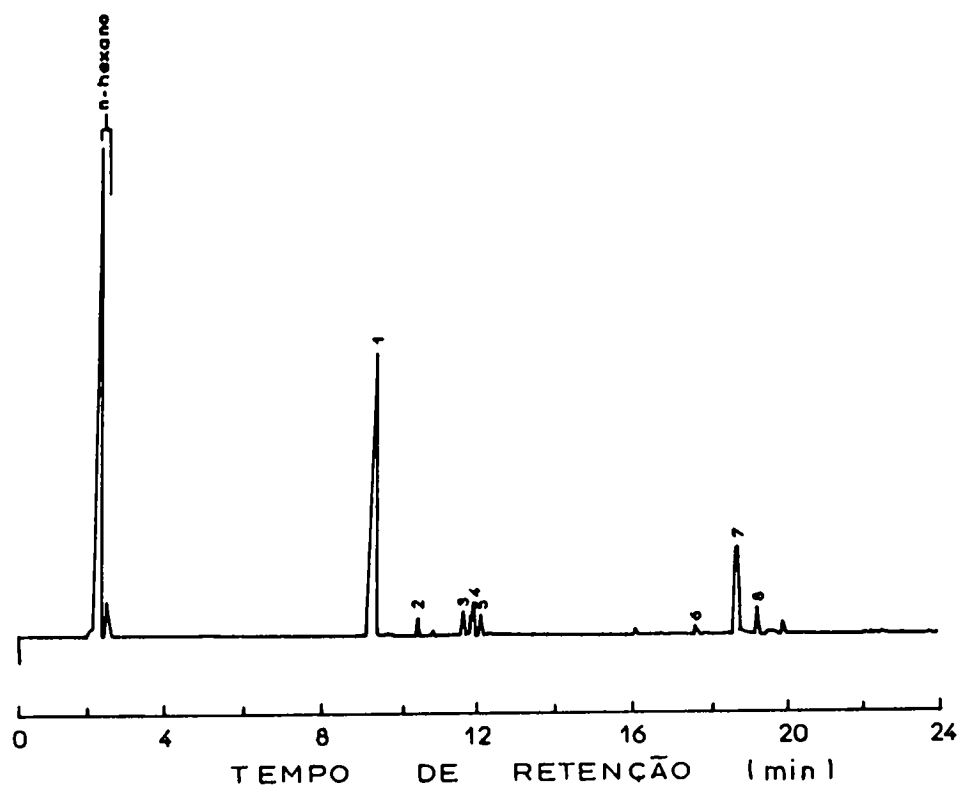


FIGURA 13 - Análise cromatográfica (CG) do óleo essencial extraído das flores secas de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. após 8 meses de armazenamento do vegetal seco. (Condições: veja item 2.2.10.4)

TABELA 11 - Cromatografia gasosa do óleo essencial extraído das flores secas de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. após 8 meses de armazenamento do vegetal seco. Tempo de retenção (TR) e percentual da área total do cromatograma (exceto a área do solvente) dos principais picos (acima de 1%).

Pico nº	TR (min)	Área (%)	Pico nº	TR (min)	Área (%)
1	9,23	70,81	5	12,01	3,80
2	10,38	2,18	6	-	-
3	11,56	2,98	7	18,69	12,31
4	11,82	4,21	8	19,21	3,70

## 3.3 - DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA (MÉTODO CP/UV)

Curva padrão de absorção de quercetina

TABELA 12 - Valores de absorção da solução padrão determinados por CP/UV e, diretamente, por UV, a 255 nm.

Concentração de quercetina ( $\mu\text{g}/5 \text{ ml}$ )	n	CP/UV		UV	
		Abs	CV (%)	Abs	CV (%)
10	3	$0,236 \pm 0,011$	4,88	$0,244 \pm 0,002$	0,87
20	3	$0,431 \pm 0,014$	3,29	$0,438 \pm 0,003$	0,65
30	3	$0,647 \pm 0,014$	2,19	$0,613 \pm 0,004$	0,69
40	3	$0,839 \pm 0,006$	0,76	$0,806 \pm 0,004$	0,53
50	3	$1,084 \pm 0,016$	1,52	$0,990 \pm 0,006$	0,64

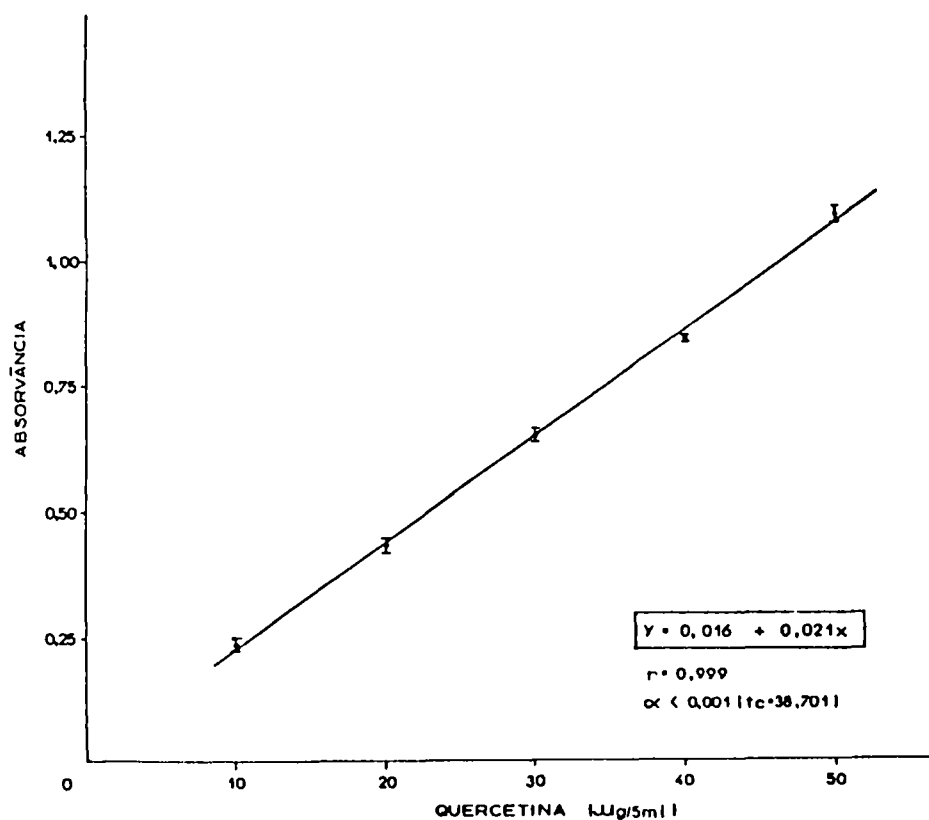


FIGURA 14 - Curva padrão de absorção de quercetina a 255 nm, pelo método CP/UV.

Verificação da pureza da quercetina extraída dos extratos:

PF = 318<sup>o</sup>C (dec), sem correção.

TABELA 13 - Valores de Rf da co-cromatografia e cromatografia bi dimensional de quercetina padrão (QP) e quercetina extraída dos extratos (QE).

Tipo	Sistemas	Rf	
		QE	QP
Co-cromatografia	V <sub>1</sub>	0,21	0,21
	V <sub>2</sub>	0,24	0,24
Bidimensional	IV <sub>1</sub> (sentido 1)	0,35	0,35
	IV <sub>2</sub> (sentido 2)	0,55	0,56

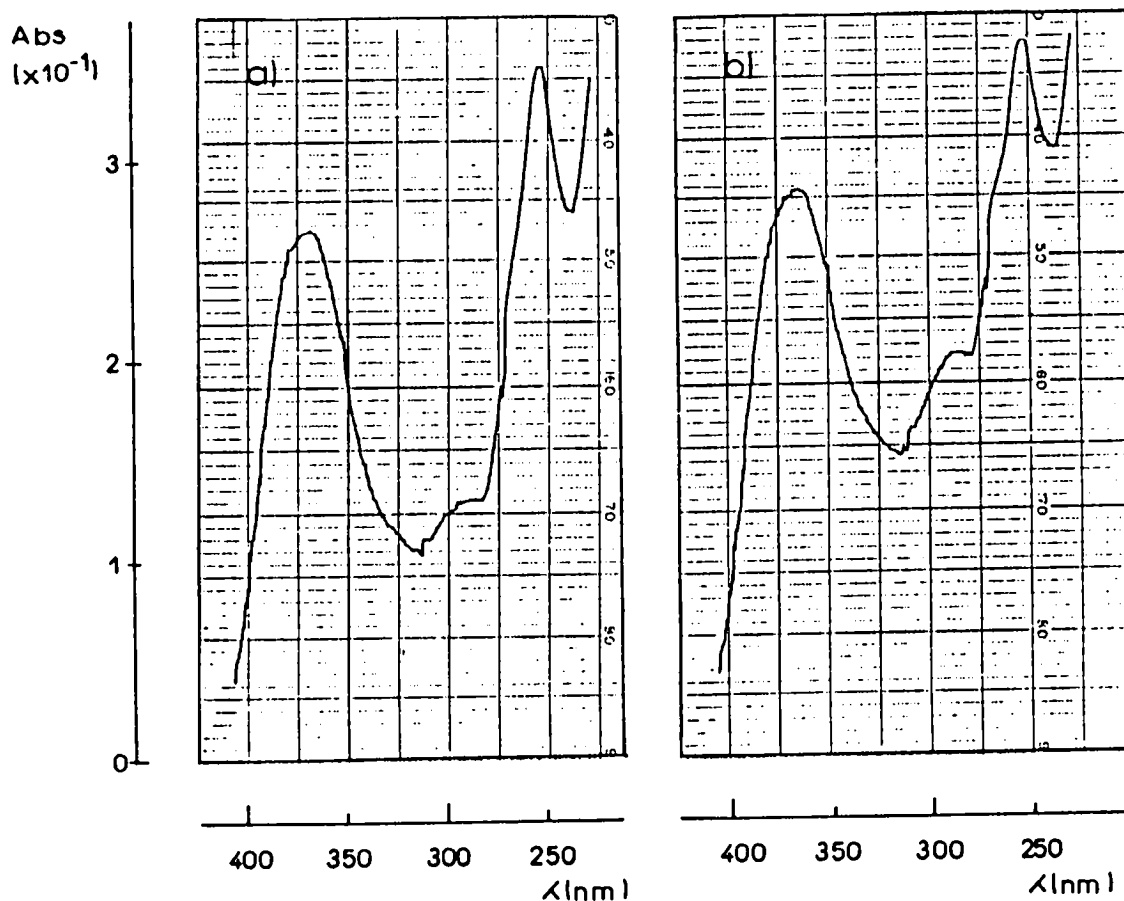


FIGURA 15 - Espectros, no ultravioleta, de quercetina após separação por CP e extração com metanol. a) padrão; b) isolada do extrato purificado (EP). (Velocidade de varredura: 50 nm/min; velocidade de registro: 2 cm/min).

TABELA 14 - Valores máximos de absorção, no ultravioleta, de quercetina padrão (QP) e quercetina isolada do extrato purificado (QE), em metanol.

	QP	QE
Banda I	370 298 sh	370 297 sh
Banda II a	270	268
Banda II b	255	255



### 3.4 - CARACTERIZAÇÃO PRELIMINAR

Nas Tabelas 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 e 22 e nas Figuras 16, 17, 18 e 19 foi empregada a seguinte notação para os extratos:

EpHa = extrato adicionado de tampão ácido  
EpHn = extrato adicionado de tampão neutro  
EpHb = extrato adicionado de tampão alcalino  
EH<sub>2</sub>O = extrato adicionado de água destilada  
EEtOH = extrato adicionado de etanol  
Ext = extrato original

#### 3.4.1 - Variação da Cor, Turvação e Sedimentação e pH dos Turbulizados, com ou sem Aditivos

O depósito máximo observado nos diversos extratos analisados foi de 5 mm.

TABELA 15 - Coloração dos turbolizados etanólicos adicionados, logo após a preparação (tempo zero) e após um e quatorze dias de armazenamento, em função da temperatura de armazenamento.

Temperatura	Extrato	Tempo (dias)		
		Zero	1	14
4°C	EpHa	Amarelo esverdeado	Amarelo esverdeado	Amarelo esverdeado
	EpHn	Castanho claro	Castanho claro	Castanho claro
	EpHb	Castanho	Castanho	Castanho
	EH <sub>2</sub> O	Amarelo esverdeado	Amarelo	Amarelo
	EEtOH	Amarelo-limão	Amarelo esverdeado	Amarelo esverdeado
Amb	EpHa	Amarelo esverdeado	Amarelo esverdeado	Amarelo-ouro esverdeado
	EpHn	Castanho claro	Castanho claro	Castanho
	EpHb	Castanho	Castanho	Castanho escuro
	EH <sub>2</sub> O	Amarelo esverdeado	Amarelo	Verde amarelado
	EEtOH	Amarelo-limão	Amarelo esverdeado	Castanho claro esverdeado
60°C	EpHa	Amarelo esverdeado	Amarelo	Amarelo-ouro
	EpHn	Castanho claro	Castanho claro	Castanho
	EpHb	Castanho	Castanho	Castanho escuro
	EH <sub>2</sub> O	Amarelo esverdeado	Amarelo	Amarelo-ouro
	EEtOH	Amarelo-limão	Amarelo esverdeado	Castanho esverdeado

TABELA 16 - Coloração do turbolizado e turbolizados adicionados obtidos com etanol a 80% (v/v), logo após a preparação (tempo zero) e após um e quatorze dias de armazenamento, em função da temperatura de armazenamento.

Temperatura	Extrato	Tempo (dias)		
		Zero	1	14
4°C	EpHa	Amarelo pálido	Amarelo-limão	Amarelo-limão
	EpHn	Castanho amarelado	Castanho amarelado	Castanho amarelado
	EpHb	Castanho	Castanho claro	Castanho claro
	EH <sub>2</sub> O	Amarelo pálido	Amarelo-limão	Amarelo-limão
	Ext	Castanho esverdeado	Castanho amarelado	Castanho amarelado
Amb	EpHa	Amarelo pálido	Amarelo	Amarelo-ouro
	EpHn	Castanho amarelado	Castanho claro	Castanho claro
	EpHb	Castanho	Castanho alaranjado	Castanho
	EH <sub>2</sub> O	Amarelo pálido	Amarelo	Amarelo-limão
	Ext	Castanho esverdeado	Castanho amarelo-ouro	Castanho amarelado
60°C	EpHa	Amarelo pálido	Amarelo-ouro	Amarelo-ouro esverdeado
	EpHn	Castanho amarelado	Castanho	Castanho avermelhado
	EpHb	Castanho	Castanho avermelhado	Castanho escuro avermelhado
	EH <sub>2</sub> O	Amarelo pálido	Amarelo-ouro	Amarelo-ouro esverdeado
	Ext	Castanho esverdeado	Castanho claro	Castanho

TABELA 17 - Coloração do turbolizado e turbolizados adicionados obtidos com etanol a 60% (v/v), logo após a preparação (tempo zero) e após um e quatorze dias de armazenamento, em função da temperatura de armazenamento.

Temperatura	Extrato	Tempo (dias)		
		Zero	1	14
4°C	EpHa	Amarelo pálido	Amarelo pálido	Amarelo pálido
	EpHn	Castanho claro	Castanho claro	Castanho claro
	EpHb	Castanho	Castanho claro	Castanho claro
	EH <sub>2</sub> O	Amarelo pálido	Amarelo pálido	Amarelo pálido
	Ext	Castanho avermelhado	Castanho claro	Castanho claro
Amb	EpHa	Amarelo pálido	Amarelo alaranjado	Amarelo
	EpHn	Castanho claro	Castanho	Castanho
	EpHb	Castanho	Castanho	Castanho avermelhado
	EH <sub>2</sub> O	Amarelo pálido	Amarelo alaranjado	Amarelo
	Ext	Castanho avermelhado	Castanho	Castanho
60°C	EpHa	Amarelo pálido	Castanho claro	Castanho
	EpHn	Castanho claro	Castanho	Castanho avermelhado
	EpHb	Castanho	Castanho escuro	Castanho escuro avermelhado
	EH <sub>2</sub> O	Amarelo pálido	Castanho claro	Castanho
	Ext	Castanho avermelhado	Castanho	Castanho avermelhado

TABELA 18 - Coloração do turbolizado e turbolizados adicionados obtidos com etanol a 40% (v/v), logo após a preparação (tempo zero) e após um e quatorze dias de armazenamento, em função da temperatura de armazenamento.

Temperatura	Extrato	Tempo (dias)		
		Zero	1	14
4°C	EpHa	Amarelo	Amarelo alaranjado	Amarelo alaranjado
	EpHn	Castanho claro	Castanho claro	Castanho claro
	EpHb	Castanho	Castanho	Castanho
	EH <sub>2</sub> O	Amarelo	Amarelo	Amarelo
	Ext	Castanho amarelado	Castanho claro	Castanho claro
Amb	EpHa	Amarelo	Amarelo pálido	Amarelo pálido
	EpHn	Castanho claro	Castanho amarelado	Castanho claro
	EpHb	Castanho	Castanho alaranjado	Castanho
	EH <sub>2</sub> O	Amarelo	Amarelo pálido	Amarelo pálido
	Ext	Castanho amarelado	Castanho amarelado	Castanho claro
60°C	EpHa	Amarelo	Castanho amarelado	Castanho claro
	EpHn	Castanho claro	Castanho alaranjado	Castanho avermelhado
	EpHb	Castanho	Castanho escuro alaranjado	Castanho avermelhado
	EH <sub>2</sub> O	Amarelo	Laranja amarelado	Castanho claro
	Ext	Castanho amarelado	Castanho alaranjado	Castanho

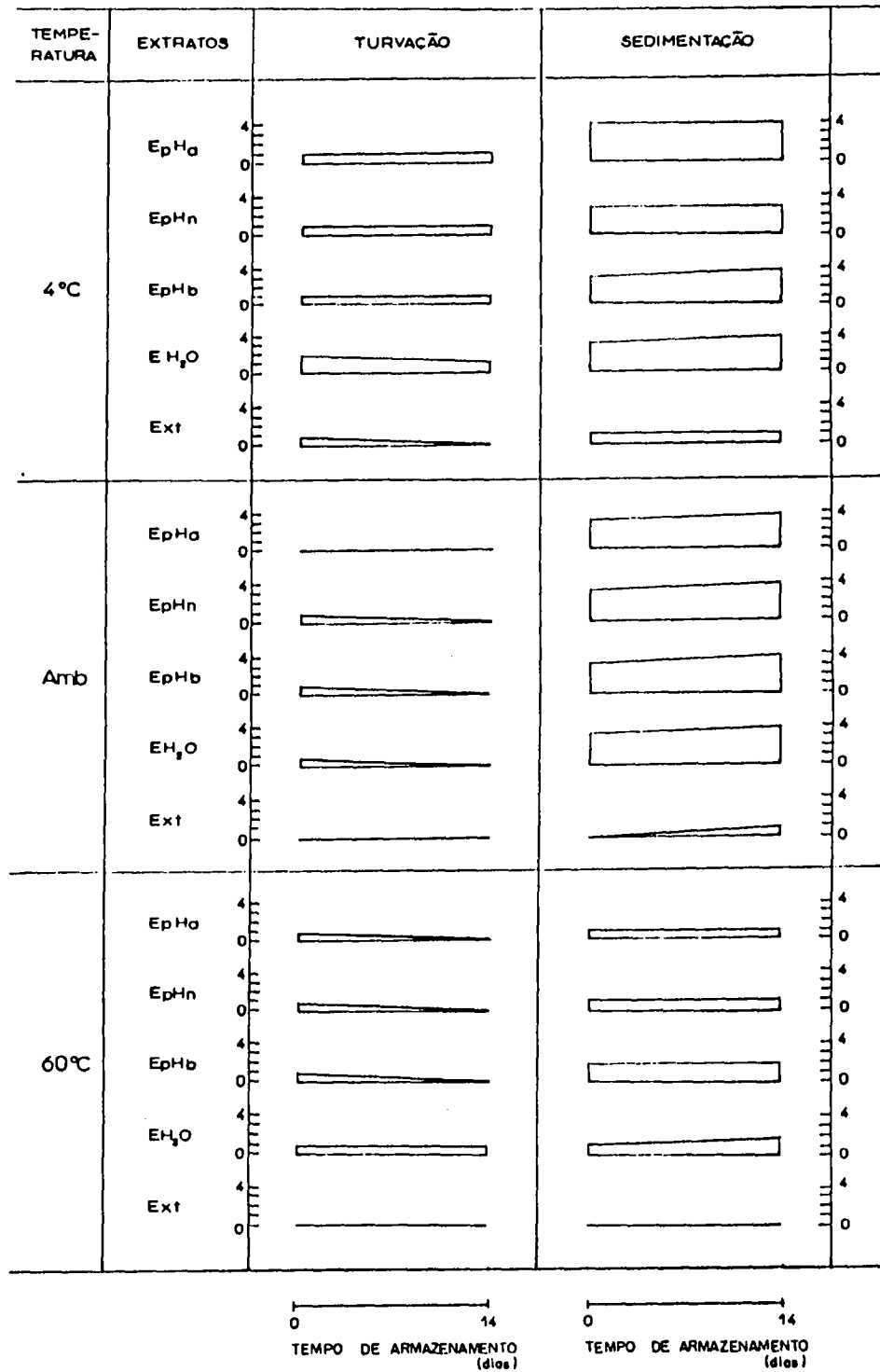


FIGURA 16 - Níveis de turvação e sedimentação observados no turbolizado e turbolizados adicionados obtidos com etanol a 80% (v/v) em função da temperatura e tempo de armazenamento.

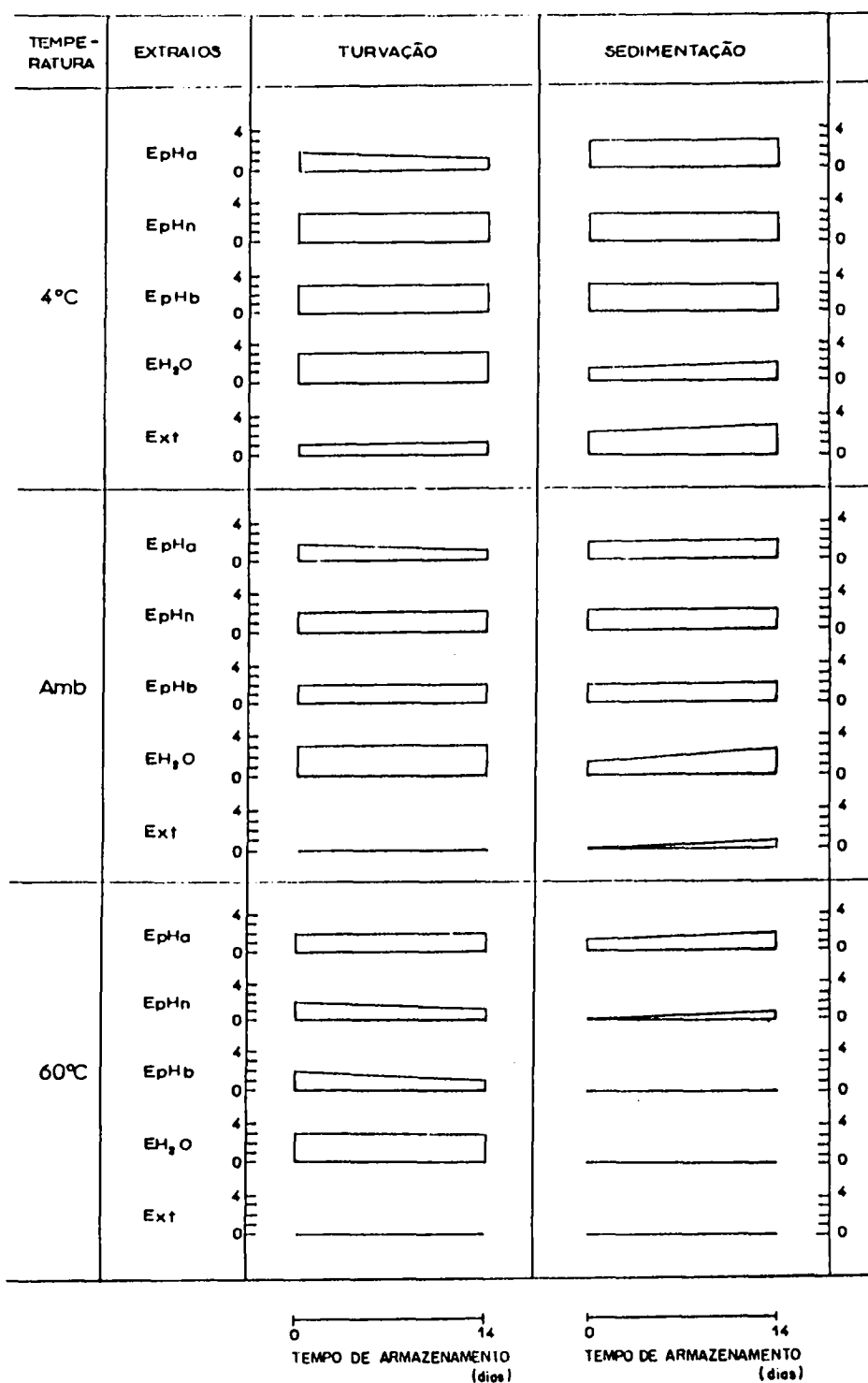


FIGURA 17 - Níveis de turvação e sedimentação observados no turbolizado e turbolizados adicionados obtidos com etanol a 60% (v/v) em função da temperatura e tempo de armazenamento.

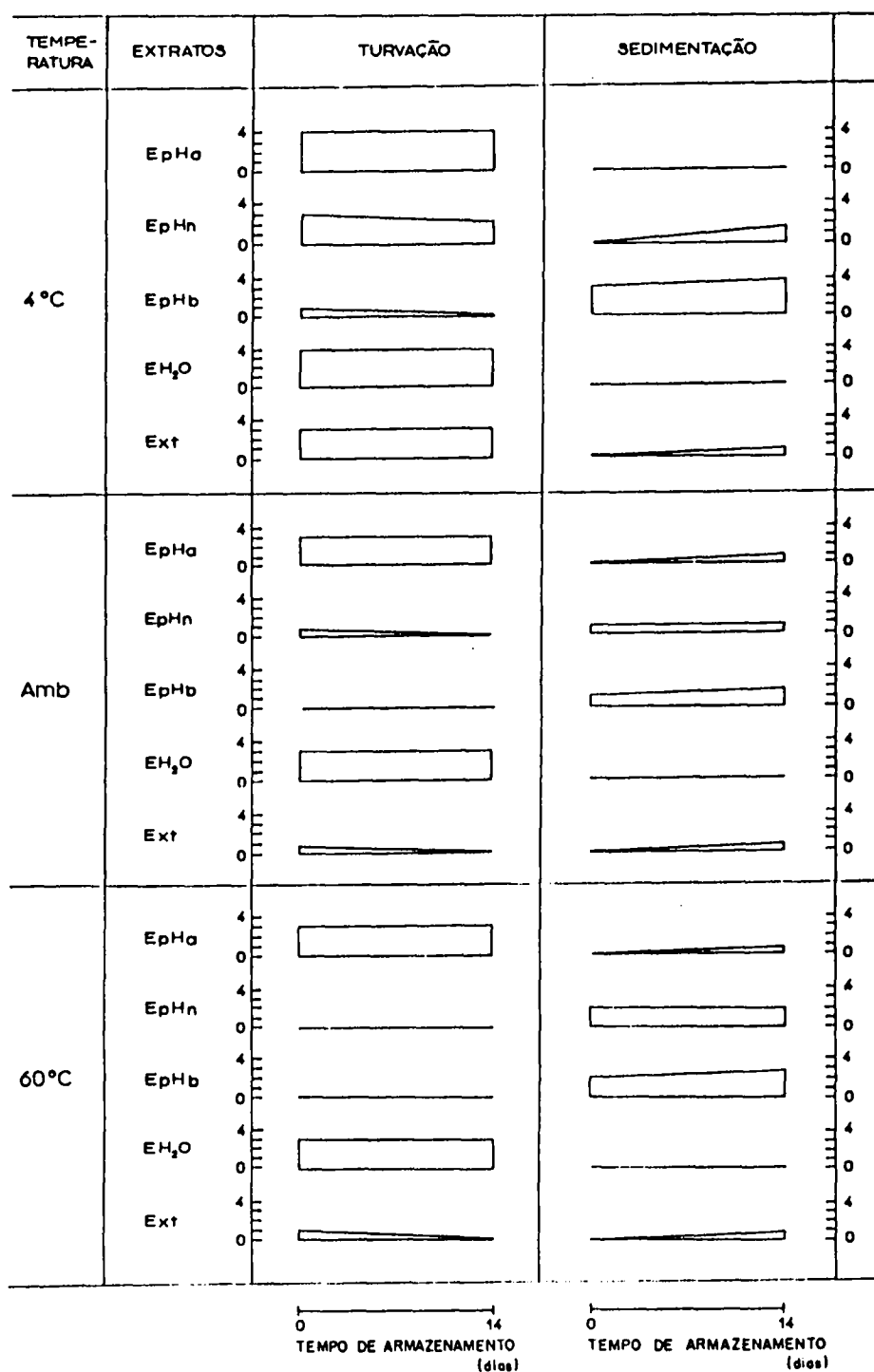


FIGURA 18 - Níveis de turvação e sedimentação observados no turbolizado e turbolizados adicionados obtidos com etanol a 40% (v/v) em função da temperatura e tempo de armazenamento.





TABELA 20 - Comportamento do pH do turbolizado e turbolizados adicionados obtidos com etanol a 80% (v/v) em função da temperatura e tempo de armazenamento.

Temperatura	Extrato	Tempo (dias)									
		0	1	2	3	4	7	8	9	10	14
4°C	EpHa	5,0	5,0	-	5,0	5,0	5,0	4,9	4,9	4,9	4,9
	EpHn	7,4	7,4	-	7,4	7,4	7,2	7,2	7,1	7,0	7,0
	EpHb	8,1	7,9	-	7,8	7,7	7,3	7,4	7,35	7,2	7,1
	EH <sub>2</sub> O	4,9	4,85	-	4,85	4,8	4,8	4,75	4,75	4,75	4,75
	Ext	5,6	5,5	-	5,5	5,5	5,4	5,4	5,35	5,35	5,4
Amb	EpHa	5,0	4,95	5,0	5,0	4,95	5,0	4,9	4,9	4,9	4,9
	EpHn	7,4	7,35	7,4	7,4	7,3	7,2	7,15	7,05	7,05	7,05
	EpHb	8,1	7,9	7,9	7,8	7,7	7,6	7,55	7,45	7,45	7,5
	EH <sub>2</sub> O	4,9	4,8	4,8	4,8	4,8	4,75	4,75	4,75	4,75	4,75
	Ext	5,6	5,5	5,5	5,5	5,5	5,5	5,5	5,5	5,45	5,5
60°C	EpHa	5,0	4,8	4,8	4,8	4,7	4,7	4,8	4,75	4,8	4,75
	EpHn	7,4	7,15	7,2	7,1	7,0	6,95	6,85	6,75	6,75	6,55
	EpHb	8,1	7,65	7,65	7,6	7,45	7,3	7,25	7,2	7,2	7,15
	EH <sub>2</sub> O	4,9	4,65	4,7	4,7	4,6	4,7	4,65	4,65	4,7	4,6
	Ext	5,6	5,4	5,5	5,5	5,4	5,5	5,4	5,4	5,45	5,4

TABELA 21 - Comportamento do pH do turbolizado e turbolizados adicionados obtidos com etanol a 60% (v/v) em função da temperatura e tempo de armazenamento.

Temperatura	Extrato	Tempo (dias)									
		0	1	2	3	4	7	8	9	10	14
4°C	EpHa	5,2	5,3	-	5,2	-	5,25	5,15	5,1	5,1	5,1
	EpHn	7,2	7,2	-	7,2	7,2	6,9	6,9	6,9	6,8	6,7
	EpHb	7,8	7,7	-	7,7	7,7	7,4	7,4	7,4	7,15	7,1
	EH <sub>2</sub> O	5,2	5,2	-	5,2	5,2	5,1	5,1	5,0	5,05	5,05
	Ext	5,5	5,5	-	5,5	5,5	5,45	5,4	5,3	5,4	5,3
Amb	EpHa	5,2	5,15	-	-	-	-	-	-	-	-
	EpHn	7,2	7,1	7,1	7,1	7,1	7,0	6,95	6,85	6,85	6,85
	EpHb	7,8	7,65	7,7	7,7	7,7	7,5	7,5	7,3	7,3	7,3
	EH <sub>2</sub> O	5,2	5,1	5,2	5,2	5,15	5,15	5,1	5,05	5,05	5,05
	Ext	5,5	5,5	5,5	5,5	5,5	5,5	5,45	5,4	5,45	5,45
60°C	EpHa	5,2	4,95	4,95	4,9	4,9	5,0	4,9	4,85	4,75	4,65
	EpHn	7,2	6,95	7,0	6,9	6,85	6,8	6,75	6,7	6,65	6,55
	EpHb	7,8	7,5	7,5	7,5	7,4	7,25	7,25	7,15	7,1	6,95
	EH <sub>2</sub> O	5,2	4,9	5,0	4,95	4,9	4,9	4,85	4,85	4,8	4,8
	Ext	5,5	5,35	5,5	5,4	5,3	5,3	5,3	5,3	5,3	5,2

TABELA 22 - Comportamento do pH do turbolizado e turbolizados adicionados obtidos com etanol a 40% (v/v) em função da temperatura e tempo de armazenamento.

Temperatura	Extrato	Tempo (dias)									
		0	1	2	3	4	7	8	9	10	14
4°C	EpHa	5,2	5,2	-	5,2	5,1	5,1	-	-	-	-
	EpHn	7,1	7,1	-	7,1	7,0	6,85	6,85	6,8	6,7	6,5
	EpHb	7,7	7,6	-	7,6	7,55	7,3	7,3	7,25	7,15	7,0
	EH <sub>2</sub> O	5,2	5,2	-	5,2	5,2	5,1	5,1	5,1	5,05	5,05
	Ext	5,4	5,35	-	5,35	5,4	5,3	5,3	5,2	5,2	5,2
Amb	EpHa	5,2	5,1	5,1	5,1	5,0	5,2	5,1	5,1	5,1	5,0
	EpHn	7,1	7,0	7,0	7,0	6,95	6,9	6,85	6,8	6,8	6,75
	EpHb	7,7	7,6	7,6	7,6	7,55	7,5	7,4	7,2	7,2	7,2
	EH <sub>2</sub> O	5,2	5,2	5,2	5,2	5,2	5,2	5,1	5,1	5,1	5,0
	Ext	5,4	5,3	5,4	5,4	5,35	5,35	5,3	5,3	5,3	5,25
60°C	EpHa	5,2	5,0	5,0	4,9	4,9	4,9	4,85	4,85	4,8	4,7
	EpHn	7,1	6,8	6,8	6,7	6,7	6,7	6,6	6,6	6,55	6,45
	EpHb	7,7	7,4	7,35	7,2	7,2	7,15	7,05	7,0	6,95	6,85
	EH <sub>2</sub> O	5,2	5,0	5,0	4,9	4,9	4,9	4,85	4,85	4,8	4,75
	Ext	5,4	5,2	5,2	5,2	5,1	5,2	5,1	5,1	5,1	5,05

## 3.4.2 - Análise Cromatográfica

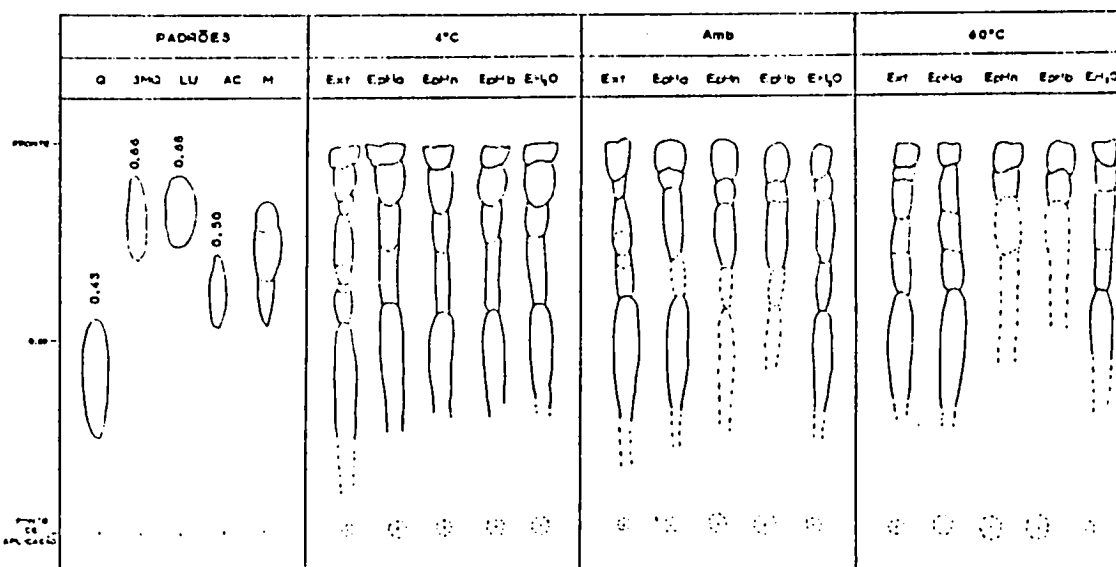


FIGURA 19 - Comportamento cromatográfico do turbolizado alcoólico e turbolizados alcoólicos adicionados submetidos às temperaturas de 4°C, ambiente e 60°C, após o sétimo dia de armazenamento, no sistema Ie. Volume aplicado = 10 µl (Q = quercetina; MQ = 3-O-metilquercetina; LU = luteolina; AC = ácido cafeico; M = MQ + LU + AC).

### 3.5 - DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO

#### 3.5.1 - Turbolização

##### 3.5.1.1 - Otimização da Concentração de Sumidades Floridas

TABELA 23 - Resíduo seco bruto (RSB) dos turbolizados obtidos com etanol a 60% (v/v) em função da concentração de sumidades floridas.

Sumidades floridas (%; m/v)	n	RSB (%; m/m)	CV (%)
2,5	3	0,3920 ± 0,0019	0,49
5,0	3	0,7620 ± 0,0102	1,35
7,5	3	1,1010 ± 0,0118	1,08
10,0	3	1,2564 ± 0,0105	0,84

TABELA 24 - Resíduo seco purificado (RSP) dos turbolizados obtidos com etanol a 60% (v/v) em função da concentração de sumidades floridas.

Sumidades floridas (%; m/v)	n	RSP (%; m/m)	CV (%)
2,5	3	0,1059 ± 0,0037	3,54
5,0	3	0,1862 ± 0,0009	0,49
7,5	3	0,3413 ± 0,0062	1,82
10,0	3	0,3478 ± 0,0005	0,14

TABELA 25 - Concentração de quercetina nos turbolizados obtidos com etanol a 60% (v/v), após purificação, em função da concentração de sumidades floridas.

Sumidades floridas (%; m/v)	Abs	n	Quercetina (mg%; m/v)	CV (%)
2,5	0,280	5	4,19 ± 0,13	3,14
5,0	0,283	5	8,48 ± 0,37	4,39
7,5	0,467	5	21,49 ± 1,05	4,90
10,0	0,215	5	15,78 ± 1,25	7,95

### 3.5.1.2 - Otimização da Concentração Etanólica do Líquido Extrator

TABELA 26 - Resíduo seco bruto (RSB) dos turbolizados obtidos a partir de 5,0% (m/v) de sumidades floridas em função da concentração etanólica do líquido extrator.

Concentração etanólica (%; v/v)	n	RSB (%; m/m)	CV (%)
40	3	0,5108 ± 0,0109	2,13
60	3	0,7620 ± 0,0102	1,35
80	3	0,7566 ± 0,0118	1,56
100	3	0,6395 ± 0,116	1,81

TABELA 27 - Resíduo seco purificado (RSP) dos turbolizados obtidos a partir de 5,0% (m/v) de sumidades floridas em função da concentração etanólica do líquido extrator.

Concentração etanólica (%; v/v)	n	RSP (%; m/m)	CV (%)
40	3	0,0138 ± 0,0239	2,78
60	3	0,1862 ± 0,0009	0,49
80	3	0,2469 ± 0,0026	1,06
100	3	0,4026 ± 0,0037	0,92

TABELA 28 - Concentração de quercetina nos turbolizados obtidos a partir de 5,0% (m/v) de sumidades floridas, após purificação, em função da concentração etanólica do líquido extrator.

Concentração etanólica (%; v/v)	Abs	n	Quercetina (mg%; m/v)	CV (%)
40	0,046	3	0,95 ± 0,04	4,39
60	0,416	3	8,48 ± 0,37	4,39
80	0,424	3	12,95 ± 0,40	3,08
100	0,890	3	27,74 ± 0,49	1,78



## 3.5.2 - Maceração

## 3.5.2.1 - Otimização do Tempo de Maceração e da Concentração de Sumidades Floridas

TABELA 29 - Resíduo seco bruto (RSB) e purificado (RSP) dos macerados obtidos com etanol a 60% (v/v) em função da concentração de sumidades floridas e do tempo de maceração.

Tempo de maceração (dias)	Sumidades floridas (%; m/v)	n	RSB		RSP (%; m/m)
			(%; m/m)	CV (%)	
1	2,5	3	0,3749 ± 0,0032	0,86	0,0880
	5,0	3	0,7005 ± 0,0138	1,97	0,1347
	7,5	3	0,9584 ± 0,0086	0,90	0,2323
	10,0	3	1,2375 ± 0,0086	0,69	0,3176
2	2,5	3	0,3926 ± 0,0018	0,45	0,0965
	5,0	3	0,7086 ± 0,0111	1,57	0,1629
	7,5	3	0,9915 ± 0,0104	1,05	0,2336
	10,0	3	1,2668 ± 0,0038	0,30	0,3198
4	2,5	3	0,4038 ± 0,0036	0,89	0,1129
	5,0	3	0,7416 ± 0,0013	0,18	0,2021
	7,5	3	1,0455 ± 0,0065	0,62	0,3142
	10,0	3	1,3064 ± 0,0144	1,10	0,4600
8	2,5	3	0,4432 ± 0,0026	0,59	0,1415
	5,0	3	0,7630 ± 0,0004	0,00	0,2568
	7,5	3	1,0878 ± 0,0041	0,37	0,4286
	10,0	3	1,3568 ± 0,0091	0,67	0,5150
16	2,5	3	0,4570 ± 0,0021	0,46	0,1507
	5,0	3	0,7671 ± 0,0025	0,33	0,2658
	7,5	3	1,1315 ± 0,0020	0,17	0,4442
	10,0	3	1,3901 ± 0,0110	0,79	0,5324

TABELA 30 - Concentração de quercetina nos macerados obtidos com etanol a 60% (v/v), após purificação, em função da concentração de sumidades floridas e do tempo de maceração, pelo método de doseamento CP/UV.

Tempo de maceração (dias)	Sumidades floridas (%; m/v)	Abs	n	Concentração de quercetina*	
				(mg%; m/v)	CV (%)
1	2,5	0,281	3	4,20 ± 0,15	3,64
	5,0	0,284	3	8,52 ± 0,10	1,23
	7,5	0,290	3	13,06 ± 0,25	1,90
	10,0	0,248	3	18,41 ± 0,22	4,03
2	2,5	0,309	3	4,65 ± 0,04	0,97
	5,0	0,294	3	8,81 ± 0,32	3,64
	7,5	0,293	3	13,19 ± 0,29	2,24
	10,0	0,321	3	24,21 ± 0,07	0,31
4	2,5	0,449	3	6,87 ± 0,47	6,83
	5,0	0,397	3	12,09 ± 0,45	3,71
	7,5	0,445	3	20,31 ± 0,44	2,14
	10,0	0,432	3	32,99 ± 0,16	0,48
8	2,5	0,507	3	7,80 ± 0,12	1,59
	5,0	0,489	3	15,00 ± 0,89	5,93
	7,5	0,602	3	27,90 ± 0,93	3,33
	10,0	0,511	3	39,31 ± 0,78	1,98
16	2,5	0,508	3	7,80 ± 0,35	4,54
	5,0	0,597	3	18,43 ± 0,49	2,67
	7,5	0,709	3	33,00 ± 0,57	1,72
	10,0	0,515	3	39,60 ± 0,61	1,55

\* Para o cálculo da concentração de quercetina, segundo a equação (4), (item 2.2.14.2):  $a = 0,016$ ;  $b = 0,021$ .

TABELA 31 - Tempo de retenção da quercetina extraída dos macerados obtidos com etanol a 60% (v/v), após purificação, em função do tempo de maceração e da concentração de sumidades floridas, por CLAE.

Tempo de maceração (dias)	Sumidades floridas (%; m/v)	n	Tempo de retenção	
			(min)	CV (%)
4	2,5	3	3,59 ± 0,06	1,82
	5,0	3	3,64 ± 0,01	0,29
	7,5	3	3,61 ± 0,06	1,82
	10,0	3	3,59 ± 0,04	1,01
8	2,5	3	3,37 ± 0,01	0,37
	5,0	3	3,39 ± 0,06	1,71
	7,5	3	3,38 ± 0,03	0,81
	10,0	3	3,36 ± 0,11	3,27
16	2,5	3	3,07 ± 0,01	0,19
	5,0	3	3,03 ± 0,01	0,17
	7,5	3	3,05 ± 0,01	0,19
	10,0	3	3,08 ± 0,03	0,94

TABELA 32 - Concentração de quercetina nos macerados obtidos com etanol a 60% (v/v), após purificação, em função do tempo de maceração e da concentração de sumidades floridas, pelo método de doseamento CLAE.

Tempo de maceração (dias)	Sumidades floridas (% m/v)	Área do pico (U m <sup>2</sup> )	n	Concentração de quercetina	
				(mg % m/v)	CV (%)
4	2,5	2,18	3	5,55 ± 0,48	8,71
	5,0	2,86	3	10,92 ± 0,52	4,81
	7,5	3,98	3	20,24 ± 1,58	7,80
	10,0	4,39	3	33,54 ± 0,32	0,97
8	2,5	2,98	3	8,30 ± 0,09	1,12
	5,0	3,58	3	14,96 ± 0,37	2,48
	7,5	5,42	3	30,20 ± 1,05	3,47
	10,0	4,43	3	37,03 ± 1,34	3,61
16	2,5	3,36	3	9,34 ± 0,11	1,21
	5,0	4,82	3	20,11 ± 0,48	2,37
	7,5	6,88	3	38,32 ± 1,01	2,65
	10,0	5,42	3	45,31 ± 0,64	1,41

### 3.5.2.2 - Otimização da Concentração Alcoólica do Líquido Extrator

TABELA 33 - Resíduo seco bruto (RSB) dos extratos obtidos a partir de 7,5 % (m/v) de sumidades floridas após 8 dias de maceração em função da concentração alcoólica do líquido extrator.

Concentração alcoólica (%; v/v)	n	RSB (%; m/m)	CV (%)
40	5	0,9253 ± 0,0045	0,49
60	5	0,9808 ± 0,0041	0,37
80	5	1,0179 ± 0,0087	0,85

TABELA 34 - Resíduo seco purificado (RSP) dos extratos obtidos a partir de 7,5 % (m/v) de sumidades floridas após 8 dias de maceração em função da concentração alcoólica do líquido extrator.

Concentração alcoólica (%; v/v)	n	RSP (%; m/m)	CV (%)
40	3	0,1609 ± 0,0060	3,73
60	3	0,2266 ± 0,0032	1,40
80	3	0,3340 ± 0,0029	0,86

TABELA 35 - Concentração de quercetina nos extratos purificados obtidos a partir de 7,5 % (m/v) de sumidades floridas após 8 dias de maceração em função da concentração alcoólica do líquido extrator.

Concentração alcoólica (%; v/v)	n	Abs	Quercetina	
			(mg %; m/v)	CV (%)
40	6	0,190	8,30 ± 0,29	3,48
60	4	0,257	11,50 ± 0,52	4,49
80	6	0,285	12,82 ± 0,29	2,29

### 3.6 - DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE AVALIAÇÃO BIOLÓGICA

#### Avaliação da atividade antiinflamatória

O extrato hidroalcoólico ensaiado apresentou os resultados sumarizados nas Tabelas 36, 37 e 38 e Figura 20.

TABELA 36 - Aumento percentual do volume das patas, em relação às patas controle, após injeção local de 0,1 ml de carragenina (0,5 mg/ml) nos grupos tratados, intraperitonealmente, com o extrato hidroalcoólico otimizado das sumidades floridas de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC., substância referência indometacina e seus respectivos veículos de dissolução (grupos controle).

TEMPO (h)	TRATAMENTO							
	EXTRATO (200 mg/kg)		CONTROLE (Solução salina de tris-(hidorimetil)aminometano a 1% (m/v))		INDOMETACINA (10 mg/kg)		CONTROLE (água estéril)	
	% aumento ± ep		% aumento ± ep		% aumento ± ep		% aumento ± ep	
0,5	7,70	2,09	18,80	5,00	5,08	1,79	20,48	3,22
1	10,27	4,63	24,57	3,78	11,68	2,76	25,92	3,34
2	10,67	4,02	28,60	5,83	10,74	3,86	28,59	4,22
4	7,45	1,75	27,40	5,56	9,34	4,33	27,77	4,31
6	7,53	4,67	26,70	5,68	8,21	2,41	28,35	5,10

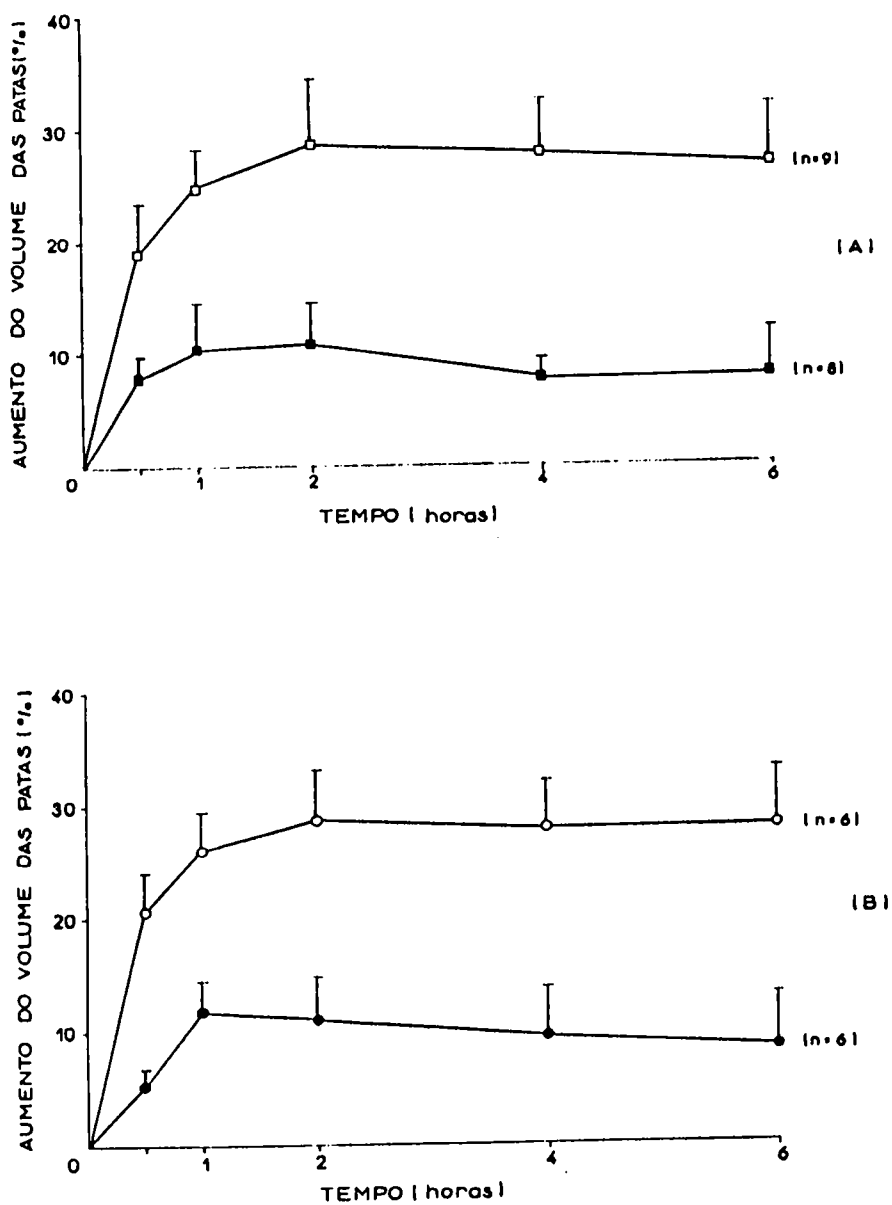


FIGURA 20 - Efeito da administração, i.p., do extrato hidroalcoólico otimizado (A) e de indometacina (B) sobre o edema produzido por carragenina (0,5 mg/ml).

- (■) extrato otimizado (200 mg/kg)
- (□) controle do extrato (solução salina de tris-(hidroximetil)aminometano a 1% m/v)
- (●) substância referência indometacina (10 mg/kg)
- (○) controle da indometacina (água estéril)



TABELA 37 - Atividade antiinflamatória do extrato hidroalcoólico otimizado e da substância referência indometacina, em relação aos grupos controle (solução salina de tris-(hidroximetil)aminometano a 1% (m/v) para o extrato, e água estéril para o grupo referência).

TRATAMENTO	DOSE (mg/kg)	INIBIÇÃO DO EDEMA (%) ± ep				
		0,5 h	1 h	2 h	4 h	6 h
EXTRATO	200	59 ± 11,12	58* ± 18,54	63* ± 14,06	73* ± 6,39	72* ± 17,49
INDOMETACINA	10	75* ± 8,74	56* ± 10,65	62* ± 13,50	66* ± 15,59	71* ± 8,50

\* Diferença significativa em relação aos respectivos grupos controles para  $\alpha < 0,05$ .

TABELA 38 - Atividade percentual antiinflamatória do extrato hidroalcoólico otimizado em relação ao grupo referência indometacina.

TRATAMENTO	DOSE (mg/kg)	INIBIÇÃO DO EDEMA (%)				
		0,5 h	1 h	2 h	4 h	6 h
INDOMETACINA	10	100	100	100	100	100
EXTRATO	200	79	104	102	111	102

### 3.7 - CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO OTIMIZADO

Os resultados referem-se ao extrato hidroalcoólico, denominado extrato otimizado, resultante da maceração de 7,5 % (m/v) de sumidades floridas com líquido extrator constituído de etanol a 80% (v/v) durante um período de 8 dias.

#### 3.7.1 - Determinação Qualitativa por Cromatografia (Figs. 21 e 22)

#### 3.7.2 - Determinações Organolépticas e Físico-Químicas

cor: castanho esverdeada

odor: característico

sabor: amargo e característico

pH: 5,58

densidade:  $0,8661 \pm 0,0002$  (CV% = 0,02)

teor alcoólico: 70% (v/v) (picnômetro)

72% (v/v) (areômetro)

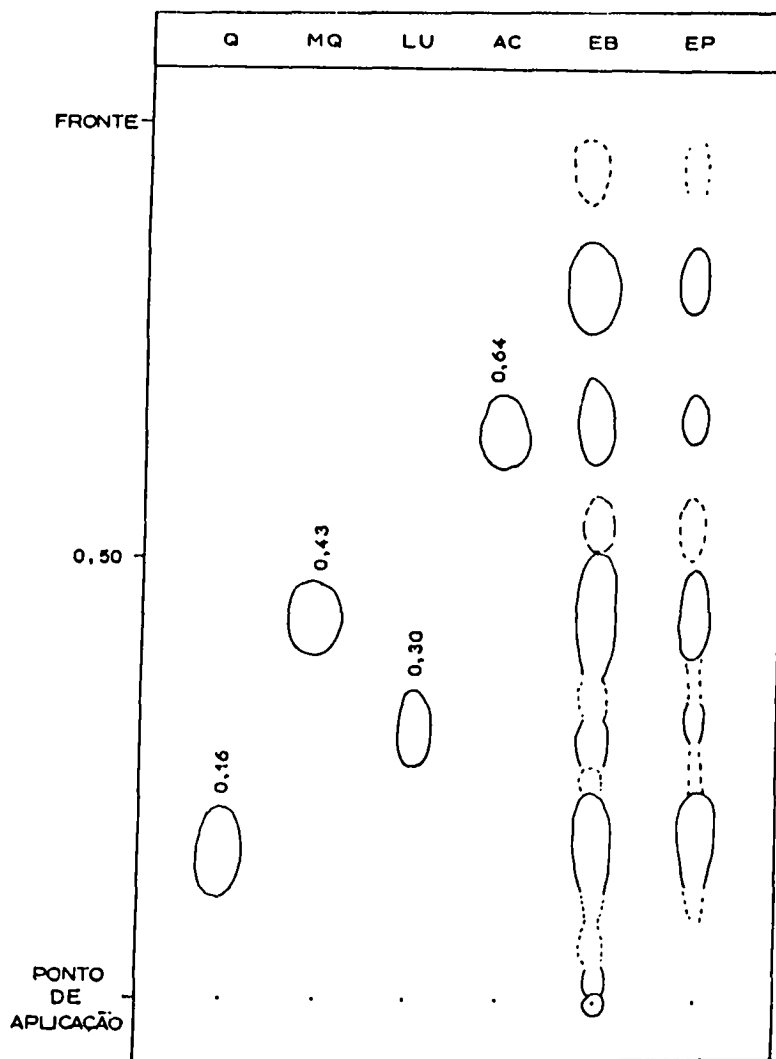


FIGURA 21 - Análise cromatográfica, no sistema  $Il_2$ , do extrato o timizado bruto (EB) e purificado (EP) frente aos pa- drões de quercetina (Q), 3-O-metilquercetina (MQ), lu teolina (LU) e ácido cafeico (AC).

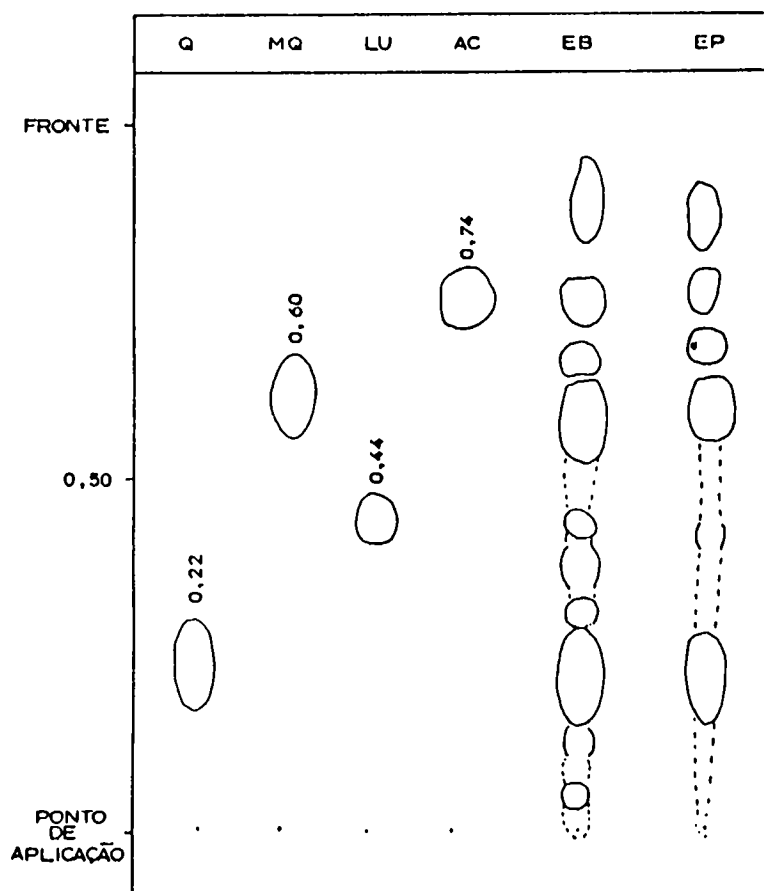


FIGURA 22 - Análise cromatográfica, no sistema  $V_1$ , do extrato otimizado bruto (EB) e purificado (EP) frente aos padrões de quercetina (Q), 3-O-metilquercetina (MQ), luteolina (LU) e ácido cafeico (AC).

## 3.7.3 - Determinação Quantitativa

TABELA 39 - RSB, RSP e concentração de quercetina determinada pelo método CP/UV, no extrato otimizado.

Resíduo seco bruto (RSB) (%; m/m)	1,0179 ± 0,0086	(CV = 0,85%)
Resíduo seco purificado (RSP) (%; m/m)	0,3340 ± 0,0029	(CV = 0,86%)
Concentração de quercetina (CQ) (mg%; m/v)	12,82 ± 0,29	(CV = 2,29%)

## 3.7.4 - Estudo da Estabilidade

TABELA 40 - Comportamento do pH do extrato otimizado e da solução de quercetina a 1,0 mg/ml em etanol a 80% (v/v) em função do tempo e da temperatura de armazenamento.

Tempo (dias)		0	2	4	8	16	32
Extrato Otimizado		5,58	-	-	-	-	-
Temperatura	40°C	-	5,55	5,53	5,40	5,45	5,46
	50°C	-	5,54	5,47	5,42	5,46	5,49
	60°C	-	5,51	5,43	5,43	5,48	5,48
Solução hidroalcoólica de quercetina (1,0 mg/ml)		5,30	-	-	-	-	-
Temperatura	Amb (20°C ± 2)	-	-	-	-	-	5,44
	60°C	-	-	-	-	5,70	5,88

TABELA 41 - Concentração de quercetina no extrato otimizado em função do tempo e temperatura de armazenamento.

Tempo (dias)	Temperatura (°C)	Abs	n	Quercetina	
				(mg%; m/v)	CV (%)
0	Amb	0,285	6	12,82 ± 0,29	2,29
	40	0,341	6	15,46 ± 0,51	3,28
	50	0,315	6	14,25 ± 0,54	3,82
2	60	0,359	6	16,34 ± 0,62	3,80
	40	0,321	3	14,54 ± 0,41	2,82
	50	0,314	3	14,21 ± 0,42	2,96
4	60	0,338	3	15,32 ± 0,35	2,30
	40	0,420	3	19,25 ± 0,40	2,08
	50	0,400	3	18,30 ± 0,61	3,33
8	60	0,371	3	16,89 ± 0,37	2,20
	40	0,331	3	15,02 ± 0,17	1,14
	50	0,333	3	15,09 ± 0,34	2,27
16	60	0,414	3	18,93 ± 0,39	2,06
	40	0,387	3	17,65 ± 0,37	2,09
	50	0,335	3	15,19 ± 0,62	4,10
32	60	0,322	3	14,59 ± 0,19	1,29

TABELA 42 - Concentração de quercetina na solução hidroalcoólica (etanol a 80%; v/v) de quercetina a 1,0 mg/ml em função do tempo e temperatura de armazenamento.

Tempo (dias)	Temperatura	Abs	n	Quercetina		
				(mg%; m/v)		CV (%)
0	Amb (20°C ± 2)	0,414	5	63,17	0,94	1,49
16	Amb (20°C ± 2)	0,382	3	58,15	1,48	2,54
	60°C	0,326	3	49,15	0,61	1,24
32	4°C	0,412	3	62,86	0,76	1,21
	Amb (20°C ± 2)	0,354	3	53,65	1,29	2,40
	60°C	0,287	3	43,07	1,75	4,06

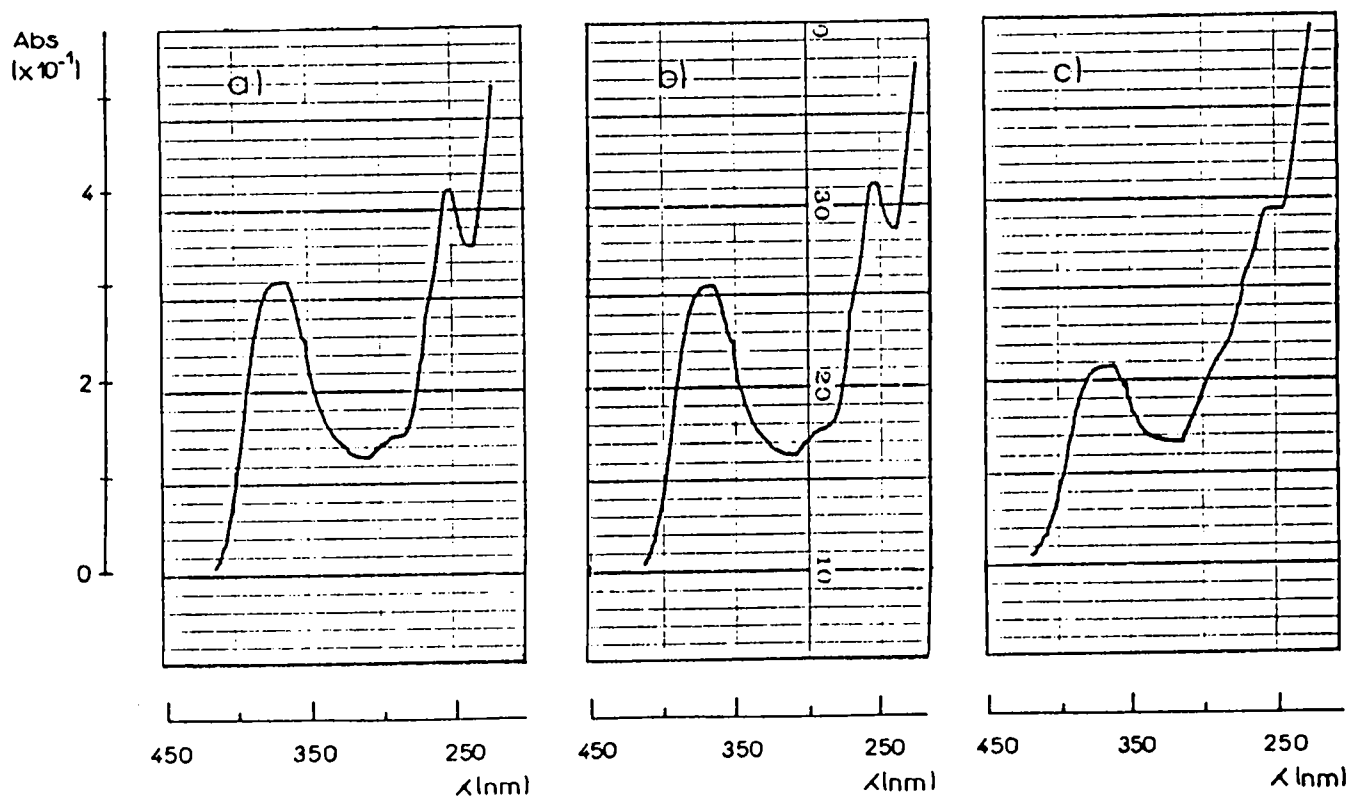


FIGURA 23 - Espectros, no UV, do padrão de quercetina (1,0 mg/ml), em metanol, submetido à degradação térmica por 32 dias. (a) 4°C; (b) condições ambientais; (c) 60°C.



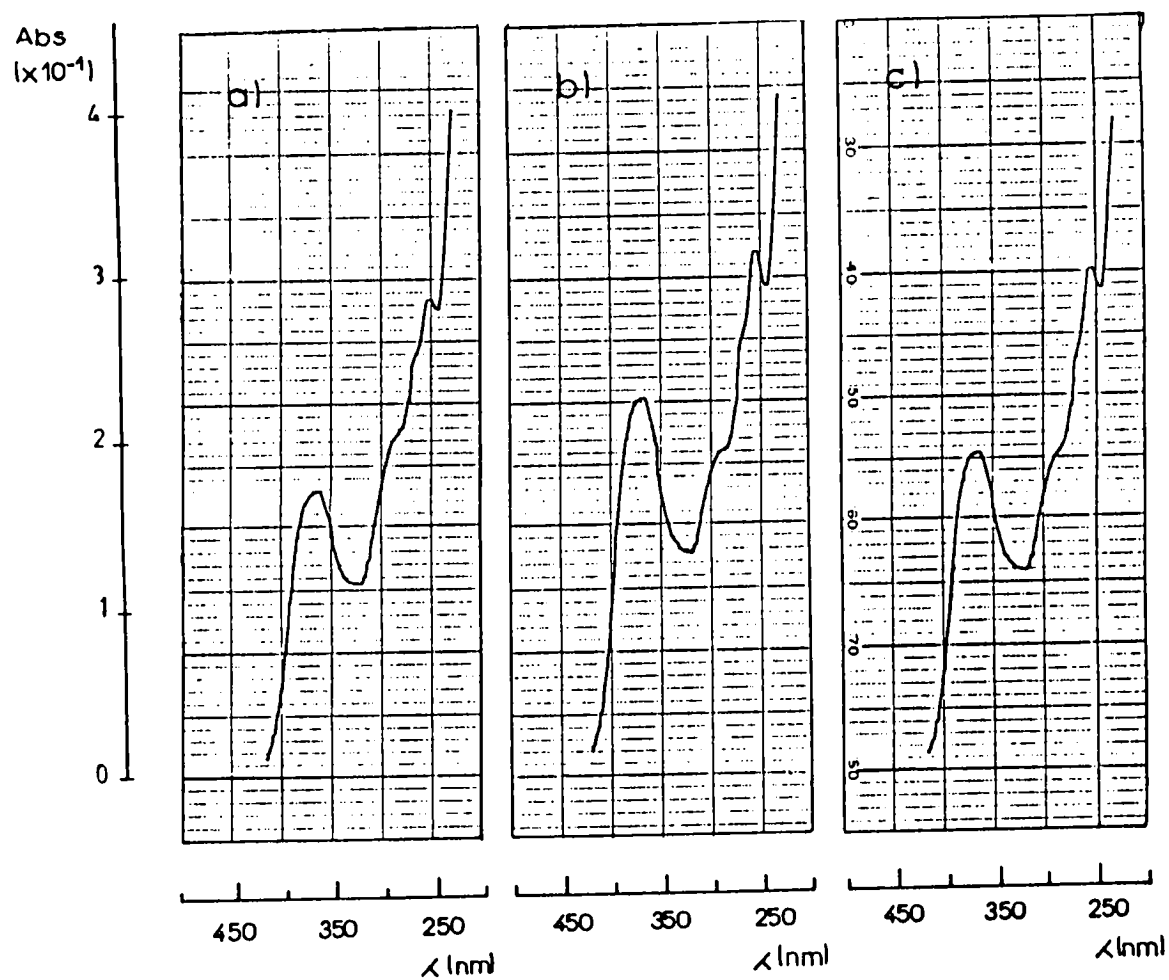


FIGURA 24 - Espectros, no UV, da quercetina extraída do extrato otimizado purificado submetido à degradação térmica (60°C), em metanol. (a) tempo zero; (b) 2 dias; (c) 4 dias.

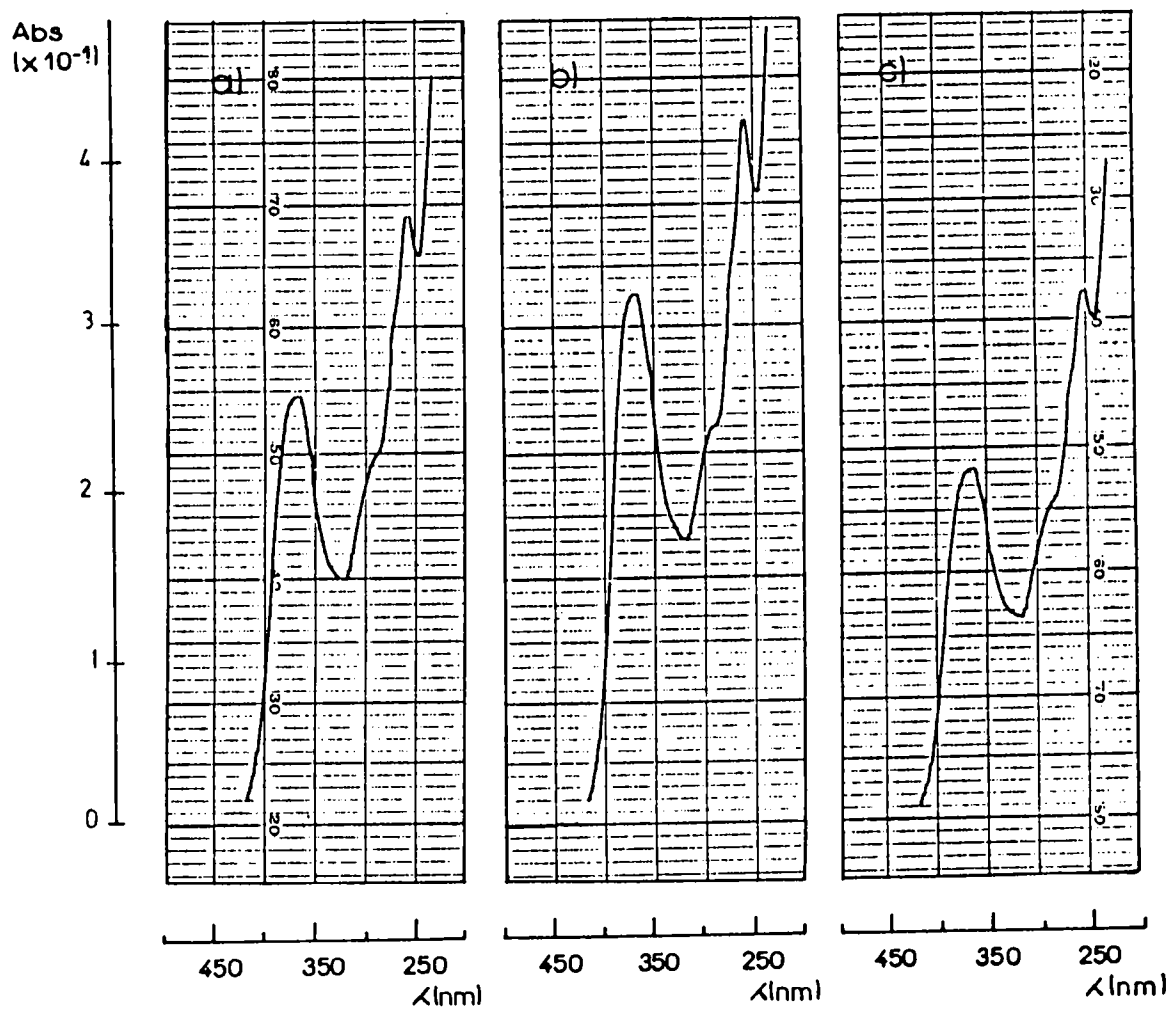


FIGURA 25 - Espectros, no UV, da quercetina extraída do extrato otimizado purificado submetido à degradação térmica (60°C), em metanol. (a) 8 dias, (b) 16 dias, (c) 32 dias.

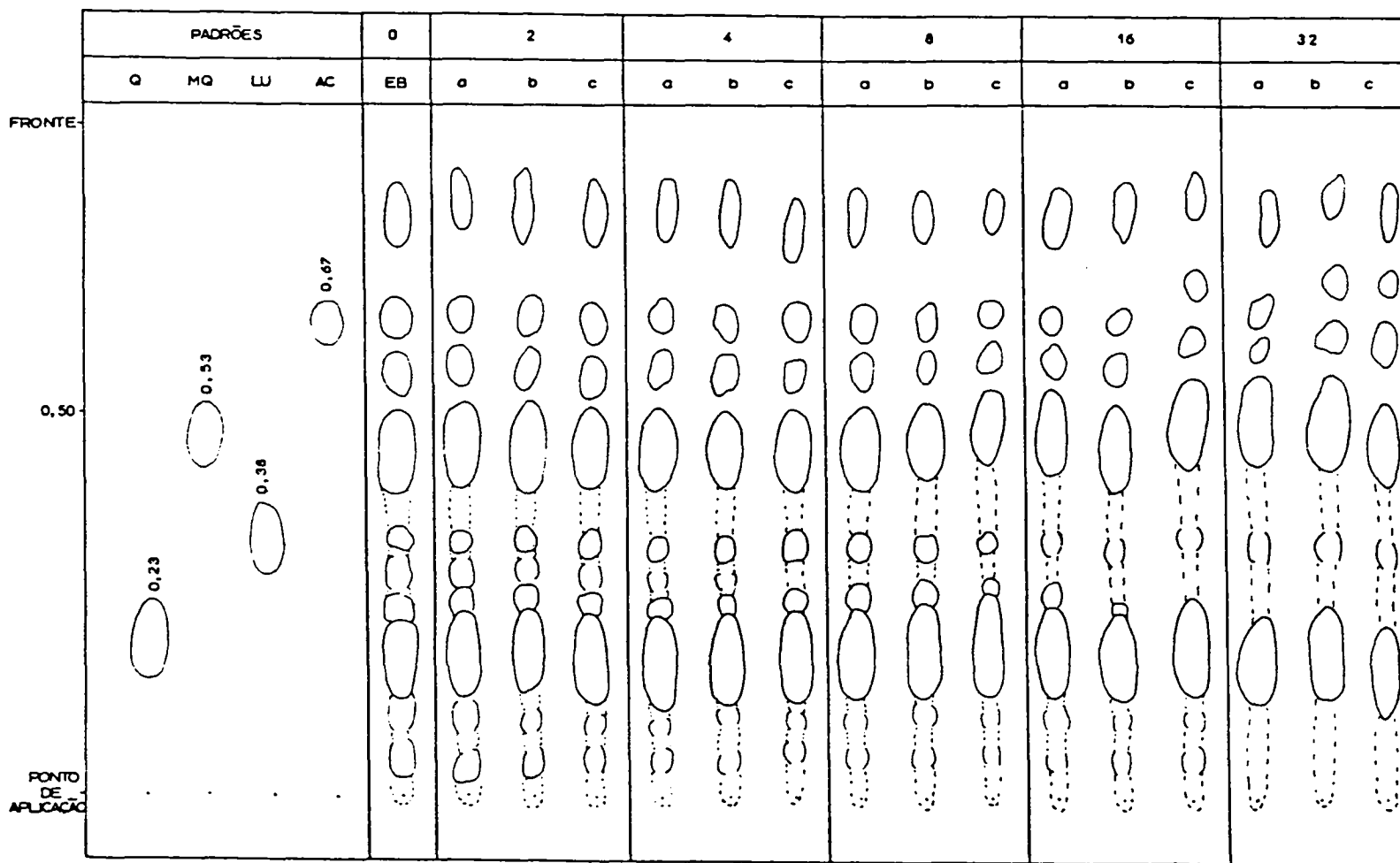


FIGURA 26 - Análise cromatográfica, no sistema  $V_1$ , do extrato otimizado (EB), no tempo zero (0) e após ter sido submetido à degradação térmica nos tempos 2, 4, 8, 16 e 32 dias, às temperaturas de 40°C (a), 50°C (b) e 60°C (c), frente aos padrões de quercetina (Q), 3-O-metilquercetina (MQ), luteolina (LU) e ácido cafeico (AC).

### 3.7.5 - Determinação do Índice de Atividade Antiinflamatória (iAa)

A porcentagem de inibição do edema das patas dos ratos apresentada pelo extrato e pela substância referência indometacina em relação a seus grupos controles, na 4ª hora após a injeção do agente flogístico, foi de 73% e 66%, respectivamente. Dessa forma, o índice de atividade antiinflamatória do extrato, em relação à indometacina, calculado segundo a fórmula (6) (item 2.2.19), foi de 111%.

### 3.8 - ENSAIO DA TOXICIDADE

Os camundongos tratados com o extrato hidroalcoólico otimizado das sumidades floridas de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. não degradado e com o mesmo extrato submetido à degradação térmica por 16 e 32 dias, à temperatura de 60°C, na dose de 200 mg/kg, apresentaram comportamento semelhante entre si e em relação ao grupo controle. Até, aproximadamente, 3 horas da administração dos extratos e veículo, observou-se que os camundongos apresentavam irritação cutânea (pruridos), intensamente no início (após ± 10 minutos da administração), e mais espaçadamente, à medida que o tempo decorria, intercalando com períodos de sono lência. Os grupos tratados com os extratos mostraram-se, aparentemente, mais calmos e sonolentos que o grupo controle. Após 24 e 48 horas da administração, os 4 grupos apresentaram comportamento normal.

#### 4 - DISCUSSÃO

A problemática da utilização de medicamentos de origem vegetal está ligada, entre outros fatores, à qualidade das matérias-primas, das técnicas de obtenção e do produto acabado. Somente a determinação da qualidade de cada um desses fatores pode conferir ao produto a segurança na sua utilização. Naturalmente, o fator primordial está ligado à matéria-prima vegetal.

Face à dificuldade na diferenciação das espécies do gênero *Achyrocline*, por possuírem caracteres morfológicos muito semelhantes entre si (BAKER, 1967; GIANGUALANI, 1976) e à importância dessa etapa na caracterização da matéria-prima para a qualidade da tecnologia e do produto final, foi inicialmente realizada a caracterização botânica através da comparação das descrições morfológicas, dando ênfase às sumidades floridas (matéria-prima) (Tab. 2).

Esta necessidade assume grande importância pois os dados farmacológicos e a indicação farmacopêica (PHARMACOPÉIA, 1926) referem-se especificamente à espécie *Achyrocline satureioides*.

Para tanto, foram utilizados os trabalhos de GONZALES & LOMBARDO (1943), GROTTA (1960), CABRERA (1963, 1974 e 1978), BAKER (1967), GIANGUALANI (1976) e LOMBARDO (1983), além da monografia constante na PHARMACOPÉIA Brasileira (1926). Comparou-se

também com material de herbário (ICN nº 63.541).

Com relação às duas espécies de *Achyrocline* encontradas no Rio Grande do Sul, segundo levantamento do material depositado no Herbário ICN, de 1924 a 1985, a diferença entre *A. satureioides* e *A. vauthieriana* consiste, basicamente, na presença de caule alado e pecíolo decorrente da última espécie. Além destas, *A. vauthieriana* caracteriza-se pela presença de pêlos lanuginosos e glandulosos no caule e folhas, enquanto que em *A. satureioides*, ambos apresentam-se tomentosos. Esta espécie encontra-se amplamente distribuída no RS, florescendo, principalmente, entre os meses de janeiro a maio, ao passo que *A. vauthieriana* restringe-se ao nordeste do Estado, com período de floração em fevereiro e março.

Outras duas espécies do gênero *Gnaphalium*, *G. cheirantiifolium* e *G. gaudichaudianum*, são encontradas no Estado com características morfológicas semelhantes às do gênero anterior. Essas espécies, entretanto, são herbáceas e apresentam capítulos campanulados, de 5-6 mm de diâmetro, com numerosas flores femininas, bi a plurisseriadas e aquênio oblongo, acastanhado. Por outro lado, as espécies do gênero *Achyrocline* existentes no Estado são subarborescentes, com capítulos cilíndricos, de aproximadamente 1 mm de diâmetro, com poucas flores femininas (9 no máximo), unisseriadas e aquênios elipsóides, de coloração escura.

As diferenças apresentadas nas fontes bibliográficas citadas podem ser contestadas, pois delimitam fatores que sofrem modificações por razões ambientais, assim como: tamanho do vegetal e das folhas, coloração da flor, coloração devida aos pêlos e número de brácteas, além da utilização de diferentes nomen

claturas para a mesma característica morfológica.

Essa fase salientou a necessidade do trabalho em conjunto com especialistas na área de botânica, especialmente devido à descrição não conclusiva apresentada na respectiva monografia da PHARMACOPÉIA Brasileira (1926) não permitindo diferenciar, com segurança, a matéria-prima com a de espécies próximas.

Na diferenciação do gênero *Achyrocline*, são de grande valia, ainda, os aspectos cor e odor, pois a planta fresca possui propriedades organolépticas muito características, podendo-se descartar, de início, a possibilidade da presença de vegetais estranhos, com características macroscópicas semelhantes, como é o caso das espécies do gênero *Gnaphalium*.

A cor pode auxiliar também na determinação do estado de maturação da planta, que é utilizada popularmente na época da maturação completa das flores, e no estudo da variação da composição química e ação biológica em função do período vegetativo, já que se trata de um vegetal ainda não cultivado.

Um fator relevante quanto à qualidade das matérias-primas refere-se às condições de secagem e armazenamento da droga, onde o grau de influência dos fatores ambientais como luz, umidade e temperatura depende das características da droga, assim como de sua constituição química.

As flores requerem, em particular, maiores cuidados que outras partes do vegetal, pois possuem, geralmente, princípios ativos mais termolábeis que outras drogas (CLAUS & TYLER, 1965). Sendo assim, as sumidades floridas de *A. satureioides* foram secas ao abrigo da luz solar direta, à temperatura ambiente (25 a 29°C) e umidade relativa do ar entre 60 e 80%, por dois me

ses.

A variação da concentração de componentes voláteis, como possível fator indicativo de alterações durante o período de armazenamento, foi estudada através da determinação periódica da perda por dessecação das sumidades floridas (Tab. 3). Notou-se um leve decréscimo dos valores com o decorrer do tempo, indicando tratar-se de um farmacógeno estável com relação a aqueles componentes.

Os valores calculados encontram-se abaixo dos limites máximos preconizados pelo Código Oficial Brasileiro com relação à maioria das drogas vegetais constituídas de sumidades floridas (FARMACOPÉIA, 1977b).

O efeito do armazenamento foi estudado também quanto à concentração dos óleos essenciais nas flores, observada durante o período de 8 meses (Tab. 4). A concentração inicial sofreu um decréscimo de 18% ao final do quarto mês de armazenamento, não havendo variação significativa até o final do período de observação (Fig. 27).

Os valores encontrados para o vegetal armazenado (Tab. 4) mostraram-se superiores aos relatados por BAUER et al. (1979) cujo rendimento em óleo essencial foi de 0,6%. Tal fato pode ser decorrente de fatores como local e época da coleta e/ou condições climáticas durante o desenvolvimento do vegetal.

Esse fato, aliado às observações feitas quanto à perda por dessecação das sumidades floridas (Tab. 3), indica que as diferenças são maiores no início do período de armazenamento, conduzindo, com o tempo, a uma estabilização da droga.

A determinação do teor de extrato, como técnica de con-



trole da matéria-prima, fornece um dado importante. Embora não haja especificidade para os princípios ativos da droga, já que são medidas todas as substâncias solúveis no solvente extrator a conselhado, pode fornecer indicações indiretas quanto à presença do princípio ativo. A validade deste método reside, porém, na manutenção das condições de ensaio.

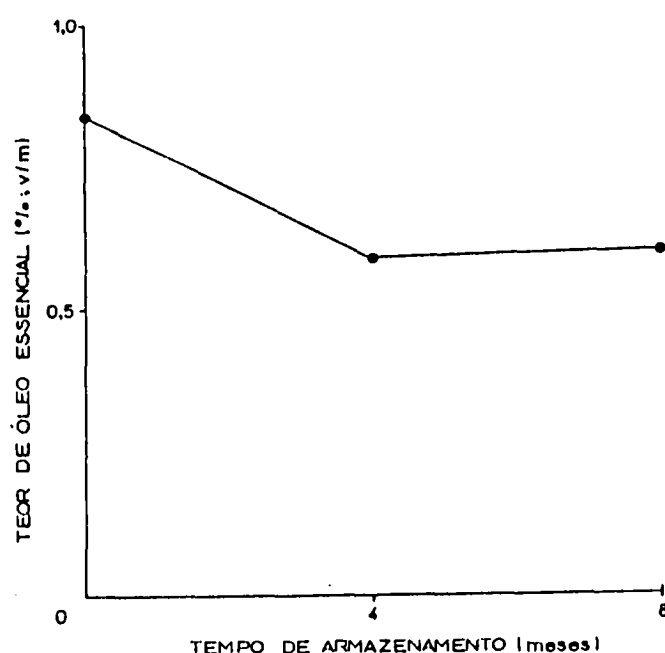


FIGURA 27 - Variação do teor de óleo essencial nas flores de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. em função do tempo de armazenamento do vegetal seco.

Tal observação pode ser constatada quando da determinação do resíduo seco dos diferentes macerados desenvolvidos. A alteração da polaridade do solvente modifica o valor do resíduo seco, havendo proporcionalidade com o teor medido de quercetina (Fig. 28).

Considerando os flavonóides como substâncias de referência para a padronização do extrato das sumidades de *A. satureioides*

des e que a quercetina é um dos componentes majoritários (SIMÕES, 1984) presente nessa classe, foi determinado o teor de flavonóides totais, calculados em relação à quercetina (DAC, 1979a).

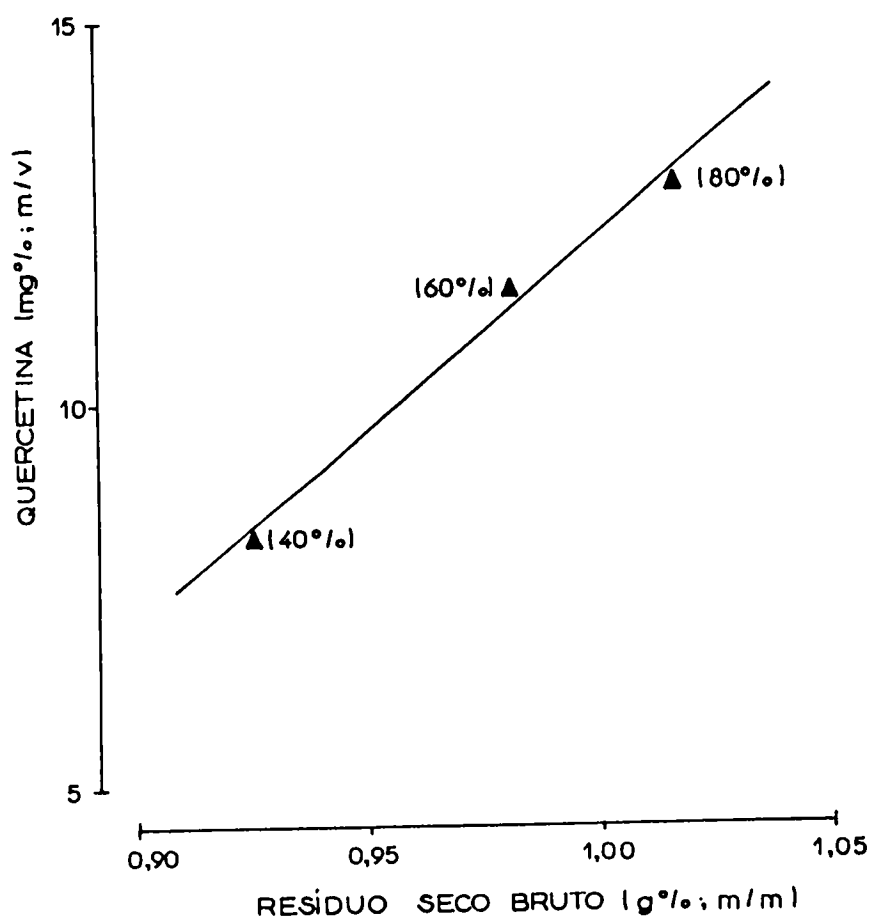


FIGURA 28 - Relação entre concentração de quercetina e resíduo seco bruto (RSB) dos macerados em função da concentração etanólica do líquido extrator (% v/v) (concentração das sumidades floridas = 7,5 %; m/v; tempo de maceração = 8 dias).

Essa técnica, assim como as demais que se alicerçam na quantificação de uma determinada classe de substâncias, não é específica para um dado composto, nem traduz uma concentração real dos componentes da classe, face aos diferentes valores dos máximos de absorvância e padrões de absorvância dos constituintes. No entanto, é um indicativo altamente importante, quando associado às outras técnicas de caracterização, para o asseguramento da qualidade.

A análise cromatográfica é imprescindível para a identificação segura da matéria-prima vegetal. Neste trabalho, para as análises cromatográficas desenvolvidas sobre papel (CP), camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizaram-se como referências soluções metanólicas das agliconas flavonoídicas quercetina (flavonol), 3-O-metilquercetina (flavonol), luteolina (flavona) e um ácido fenólico do tipo cinâmico, o ácido cafeico. Dos flavonóides identificados ou isolados do vegetal em estudo, relatou-se a predominância das agliconas e, dentre estas, os flavonóis quercetina e seu análogo metoxilado (SIMÕES, 1984).

No intuito de obter separação adequada dos componentes polifenólicos acima descritos, presentes nos extratos das sumidades floridas da marcela, foram testados vários sistemas de fase móvel sobre papel de filtro comum e papel Whatman nº 1.

Verificou-se que eluentes ácidos, tais como Forestal (HARBORNE, 1959; MARKHAM, 1975) e soluções contendo concentrações variadas de ácido acético (15 a 60%; v/v) (HARBORNE, 1959; MARKHAM, 1975) apresentaram resultados satisfatórios, sendo que ácido acético a 40% (v/v) proporcionou a melhor resolução (Fig. 5;

sistemas  $Il_1$ ,  $Il_2$  e  $Il_3$ ).

Com o eluente Forestal, observou-se uma sobreposição entre as manchas da luteolina, 3-O-metilquercetina e ácido cafeico, sendo mais acentuada entre as duas últimas (Fig. 5; sistema Ik).

Solventes alcoólicos como BAW (4:1:5; 6:1:2; v/v/v), classicamente utilizados na separação cromatográfica, tanto de glicosídeos como de agliconas flavonoídicas (HARBORNE, 1959), não forneceram bons resultados, constatando-se uma baixa resolução das manchas (Fig. 4; sistemas Ih e Ij).

Outros eluentes, tais como: clorofórmio:metanol:água (60:40:5; 40:60:5 e 10:90:5; v/v/v), clorofórmio:ácido acético:água (50:45:5 e 35:60:5; v/v/v), clorofórmio:metanol:ácido acético:água (10:40:45:5 e 25:25:40:5; v/v/v/v) e água, foram testados sem sucesso (Figs. 3, 4 e 5; sistemas Ia, Ib, Ic, Id, Ie, If, Ig e Im).

Com relação ao suporte utilizado, não se observou diferença entre papel de filtro comum e papel Whatman nº 1, optando-se pelo primeiro devido ao menor custo.

Na separação de compostos flavonoídicos por CCD, a escolha da polaridade do solvente depende muito do grau de metilação nos flavonóides. MARKHAM (1975) descreve uma boa separação de flavonas e flavonóis mais polares (apigenina, luteolina, galangina, campferol, quercetina, miricetina, etc.), em silicagel, com tolueno:clorofórmio:acetona (40:25:35; v/v/v) (EGGER, 1969; MARKHAM, 1975). Os valores de  $R_f$  citados para quercetina e luteolina foram praticamente iguais (0,27 e 0,28, respectivamente).

Utilizando-se o mesmo eluente sobre silicagel G (Fig. 6;

sistema I<sub>1</sub>), obteve-se uma diferença maior entre os valores de R<sub>f</sub>, sendo de 0,19 (Q) e 0,33 (LU). Houve, entretanto, má resolução das manchas, com formação de cauda. Com silicagel HF (Fig. 7; sistema II<sub>1</sub>), praticamente não ocorreu separação das agliconas Q (R<sub>f</sub> = 0,48), MQ (R<sub>f</sub> = 0,50) e LU (R<sub>f</sub> = 0,49).

HÖRHAMMER et al. (1972) separaram misturas de flavonóides com benzeno : piridina : ácido fórmico (36 : 9 : 5; v/v/v). MARKHAN (1975) usou, na separação de flavonas, clorofórmio : metanol (15 : 1; v/v). Utilizando-se os mesmos sistemas (Figs. 6 e 7; sistemas I<sub>2</sub> e II<sub>4</sub>, respectivamente) observou-se fraca resolução entre as agliconas Q, MQ e LU.

Os demais eluentes testados sobre silicagel como acetato de etila : ácido fórmico : água (Fig. 6; sistema I<sub>3</sub>) e modificações do mesmo pelo acréscimo de tolueno em diferentes proporções (Figs. 6, 7 e 8; sistemas I<sub>4</sub>, I<sub>5</sub>, II<sub>2</sub>, II<sub>3</sub> e III) promoveram boa separação das agliconas dos demais componentes, não resolvendo porém as agliconas entre si.

Em trabalhos analíticos, a CCD sobre celulose tem substituído a cromatografia em papel. A maior área de superfície e o pequeno tamanho das partículas na CCD sobre celulose oferecem as vantagens de maior velocidade e maior resolução. Da mesma forma que em CP, os solventes mais favoráveis foram do tipo ácidos e hidroalcoólicos (MARKHAN, 1975).

Assim como EGGER (1969), pôde-se separar convenientemente as agliconas (Q, MQ e LU) com eluente constituído de clorofórmio : ácido acético : água (50 : 45 : 5; v/v/v) (Fig. 8, sistema IV<sub>1</sub>).

Mistura de celulose e poliamida, na proporção de 5 : 1,

respectivamente, e eluição com o mesmo eluente utilizado para celulose (Fig. 8, sistema V<sub>1</sub>) apresentou também bons resultados.

O emprego da CCD em poliamida e eluição com metanol : â-cido acético : â-gua (18 : 1 : 1; v/v/v) (Fig. 8, sistema VI<sub>1</sub>), recomendado por MABRY (1970) na separação de glicosídeos de flavonas e flavonóis, assim como de agliconas, não resultou na separação das geninas em questão. Eluente menos polar como clorofórmio : metanol : butanona (60 : 26 : 14; v/v/v) saturado com â-gua (Fig. 8; sistema VI<sub>2</sub>), indicado na separação de mistura de agliconas e mesmos glicosídeos de diferentes agliconas (MARKHAN, 1975), resultou pouco eficiente.

Embora a CCD possua a diversificação de utilização da cromatografia em coluna e a capacidade de resolução da CP, a reprodutibilidade dos valores de R<sub>f</sub> não é muito boa, não sendo por isso recomendável comparar diretamente um R<sub>f</sub> experimental com o valor da literatura (RIBÉREAU-GAYON, 1968). Por esta razão, resolveu-se utilizar, em cada cromatografia, substâncias de referência.

A visualização dessa classe de compostos nos cromatogramas não constitui maiores dificuldades. A maioria dos flavonóis apresenta fluorescência sob luz ultravioleta de longo comprimento de onda, caracterizando-se pela mudança reversível de cor quando expostos a vapores de amônia, se possuírem grupos hidroxilas livres, devido à formação de ânions fenólicos.

Com cloreto de alumínio, todas as flavonas e flavonóis reagem, formando complexos coloridos sob luz UV e, muitas vezes, no visível, o que nem sempre ocorre com os demais agentes cromogênicos (RIBÉREAU-GAYON, 1968) (Tabs. 5 e 6).

Outro revelador praticamente universal para os compostos com alto nível de insaturação são os vapores de iodo. Embora não ocorra distinção entre os compostos Q, MQ, LU e AC, o iodo pode ser um método auxiliar na detecção dessas substâncias (Tabs. 5 e 6).

Outro método cromatográfico empregado foi o da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Testes preliminares na separação das substâncias dos extratos brutos demonstraram a necessidade de purificação dos mesmos, face à existência de diversas substâncias, além dos flavonóides referência.

Optou-se por um método que permitisse a eliminação dos compostos altamente polares e insolúveis no eluente, o que foi conseguido pela extração do resíduo seco com acetato de etila e subsequente ressuspensão em metanol.

Para o desenvolvimento das condições de separação para CLAE utilizou-se, inicialmente, como fase móvel, misturas de proporções diferentes de metanol e ácido acético a 1% (v/v). A técnica empregada, partindo de três concentrações de metanol (25, 50 e 70%; v/v) e otimizando-se (técnica de ajuste por extremos), não apresentou resultados favoráveis, mesmo com alteração na velocidade de fluxo.

Uma boa resolução, para a maioria dos componentes, foi conseguida com ácido fosfórico a 1% (v/v) : metanol (60 : 40; v/v) e velocidade de fluxo 2 ml/min (Fig. 9).

O padrão ou seqüência de eluição observado permite comparar o efeito da estrutura dos flavonóides sobre os tempos de retenção.

A eluição posterior da 3-O-metilquercetina, em relação à quercetina, pressupõe que a metilação na posição 3 do flavonol favorece a interação hidrofóbica com a fase fixa. PARK et al. (1983) haviam verificado que o acréscimo no número de metoxilas provoca um aumento no tempo de retenção.

A ausência da hidroxila na posição 3 traduz-se por um efeito semelhante ao da metilação desse grupamento, o que explica a sobreposição dos picos da luteolina e 3-O-metilquercetina nesse sistema. O efeito do tipo de flavonóide sobre o tempo de retenção foi estudado por BANKOVA et al. (1982) e PARK et al. (1983), verificando-se um padrão de eluição - flavanona, seguida por flavonol e, finalmente, flavona. Este ordenamento vem de encontro aos resultados obtidos nesta análise, onde se verificou que o tempo de retenção do flavonol quercetina foi inferior ao da flavona luteolina.

Observando-se os cromatogramas da mistura das substâncias referência (Fig. 9(b)) e os resultados da Tabela 7, verificou-se uma boa resolução entre os picos do ácido cafeico, quercetina e mistura 3-O-metilquercetina e luteolina. A utilização de gradiente de fase móvel (eluente), ao contrário da eluição isocrática empregada, provavelmente promoveria a separação dessas duas últimas substâncias.

Foi constatado que ambos os RQ são maiores do que 1, possibilitando, dessa forma, uma diferenciação indubitável dos picos. Um valor de RQ de 1,25 permite já a determinação quantitativa, considerando que a sobreposição das áreas é inferior a 2% (MEYER, 1979). Logo, embora a separação entre Q e MQ+LU, devida à baixa resolução dos picos, traga inconvenientes quanto à determi



nação quantitativa, a resolução entre Q e AC é altamente satisfatória, não influenciando no pico da Q.

A presença de ácido fosfórico no eluente, dificultando a ionização de grupamentos ácidos (MEYER, 1979a), evita que os picos se apresentem anômalos, o que é caracterizado pela sua assimetria com formação de cauda. Este fator levaria à diminuição da resolução e da precisão quantitativa.

Com a utilização dos três métodos cromatográficos anteriormente relatados, foi possível a caracterização e identificação das agliconas flavonoídicas (Q, MQ e LU) e do ácido cafeico, já constatados por SIMÕES (1984), nas sumidades floridas de marcela.

A presença de óleo essencial nas flores de *A. saturoioides* motivou a sua sugestão como fonte de matéria-prima, em vista do elevado teor de pinenos (BAUER et al., 1979). Devido a esta importância, foi empregada a cromatografia gasosa numa tentativa de padronizar a matéria-prima utilizada neste trabalho, através de um perfil cromatográfico do óleo essencial, além de verificar o comportamento qualitativo dos componentes durante o tempo de armazenamento da droga.

Dentre os componentes identificados, foi relatada a presença de  $\alpha$ -pineno (54,80%),  $\beta$ -pineno (8,89%), limoneno (24,30%) e p-cimeno (2,40%), com tempos de retenção respectivamente crescentes (BAUER et al., 1979), além de dihidrocarvona, citronelol, cariofileno (RICCIARDI & CASSANO, 1961; AKISUE, 1971) e cineol (AKISUE, 1971).

Observando-se as Figuras 11, 12 e 13 e Tabelas 9, 10 e 11, pode-se constatar a presença dos componentes  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pi-

nenho e limoneno (picos nº 1, 2 e 4, respectivamente), por comparação com os TR verificados nos padrões correspondentes. Pode-se verificar o desaparecimento do pico nº 6, no 8º mês (Tab. 11) e o surgimento dos picos nº 9, 10 e 11, no 4º mês (Tab. 10) de armazenamento do vegetal seco.

Uma análise quantitativa mais precisa foi preterida, pois objetivou-se, inicialmente, a verificação do comportamento qualitativo dos componentes do óleo essencial das flores de marcela.

Após a verificação das características e estabilidade das sumidades floridas, seguiu-se com a determinação dos fatores que influenciam a qualidade do extrato.

Anteriormente ao desenvolvimento do método de extração, foi realizada uma avaliação preliminar dos extratos mediante variações no pH, graduação alcoólica do líquido extrator e temperatura de armazenamento. Tal ensaio objetivou analisar o comportamento de extratos frente a modificações na metodologia de obtenção e frente a adições posteriores.

Para tanto, foram observadas possíveis alterações na coloração e nos valores de pH e a presença de turvação e/ou sedimentação nos diversos extratos, além de acompanhamento cromatográfico durante o período de armazenamento.

O método de extração eleito foi o da turbolização, por ser este um procedimento utilizado para preparações rápidas e de pequenas quantidades de extratos (DÄRR, 1979; VOIGT & BORNSCHEIN, 1982).

Com o decorrer do tempo de armazenamento, verificou-se acentuação da cor original em todos os extratos (Tabs. 15, 16, 17

e 18), sendo que o escurecimento era mais intenso à medida que diminuía o teor alcoólico e elevava-se a temperatura de armazenamento e o pH do extrato (Fig. 29).

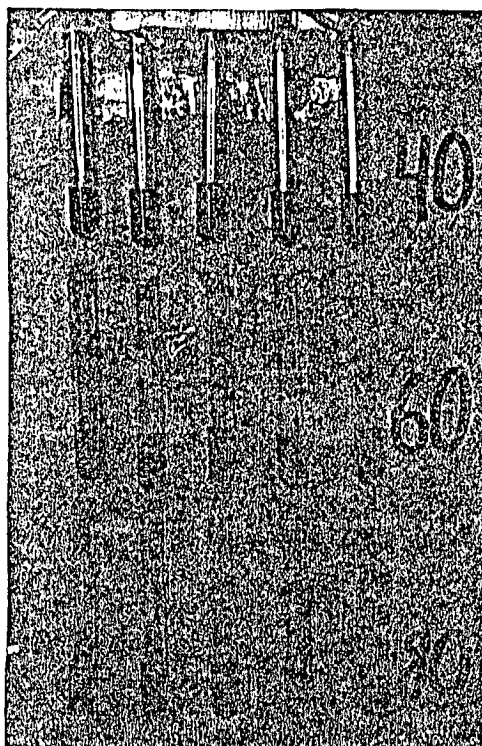


FIGURA 29 - Aspecto geral dos extratos hidroalcoólicos (Ext) obtidos com etanol a 40% (v/v) (40), 60% (v/v) (60) e 80% (v/v) (80) e extratos hidroalcoólicos adicionados (pH↓, pHn, pH↑ e H<sub>2</sub>O), após 7 dias de armazenamento, à temperatura de 60°C.

- . pH↓ = extrato adicionado de tampão ácido
- . pHn = extrato adicionado de tampão neutro
- . pH↑ = extrato adicionado de tampão alcalino
- . H<sub>2</sub>O = extrato adicionado de água destilada
- . Ext = extrato original (não adicionado)

Tratando-se de uma droga vegetal constituída, majoritariamente, de compostos altamente hidroxilados (flavonóides) (HÄNSEL & OHLENDORF, 1971; FERRARO et al., 1981; SIMÕES, 1984), é de se esperar que ocorram modificações cromáticas durante o armazenamento, devidas, principalmente, a oxidações. Estas evidenciam-se mais rapidamente em presença de luz, calor e distanciamento no valor ótimo de pH dos extratos (CARVALHO, 1979).

A cor, portanto, é uma característica importante para a diagnose do estado de conservação de preparações extrativas obtidas a partir das sumidades floridas de marcela.

Diluição dos extratos com água e conservação à baixa temperatura ( $4^{\circ}\text{C}$ ) resultaram no aparecimento de turvações e precipitados (Figs. 16, 17 e 18). Estas alterações foram acentuadas com o decréscimo do grau alcoólico no líquido extrator. A explicação desse fato está na diminuição do coeficiente de solubilidade das substâncias, devida à variação da temperatura e da polaridade do solvente posteriormente à extração.

Analisando-se as Tabelas 19, 20, 21 e 22 e Figuras 30, 31, 32 e 33, observou-se decréscimo nos valores de pH com o decorrer do tempo, salientando-se nos extratos mantidos à temperatura elevada ( $60^{\circ}\text{C}$ ), especialmente nos extratos EpHn e EpHb. Aliando-se ao fato de que a elevação do pH promove escurecimento dos extratos, pode-se presumir que a estabilidade é desfavorecida quando o tamponamento tende a se afastar do pH ácido do extrato original.

A alteração na graduação alcoólica pouco influenciou na diminuição dos valores de pH em função do tempo, exceto quando se elevou a temperatura de armazenamento ( $60^{\circ}\text{C}$ ), causada, pro-

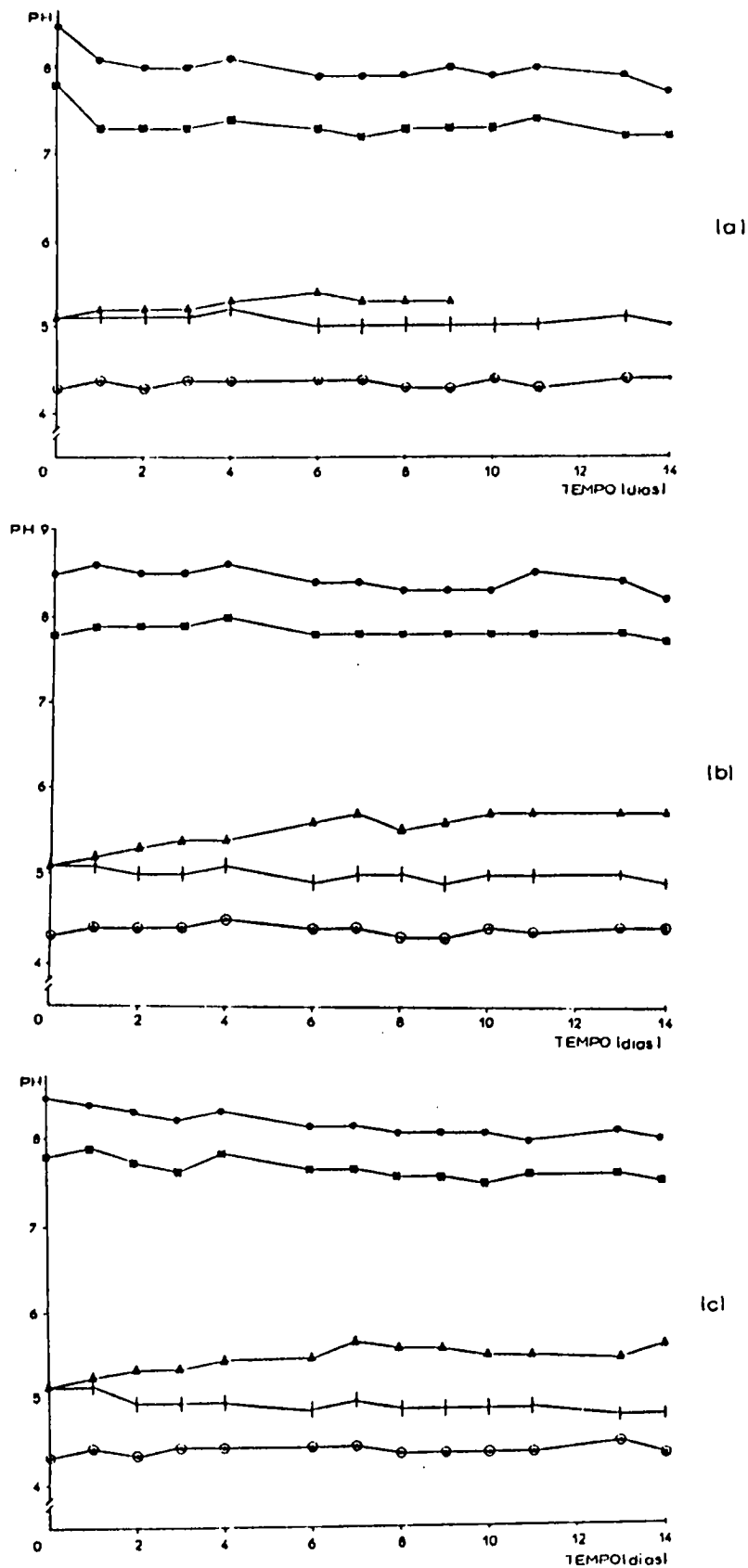


FIGURA 30 - Comportamento do pH nos turbolizados etanólicos adicionados em função da temperatura ((a) = 4°C; (b) = ambiente; (c) = 60°C) e do tempo de armazenamento.

EpHa (|); EpHn (■); EpHb (●); EH<sub>2</sub>O (○);  
EEtOH (▲).

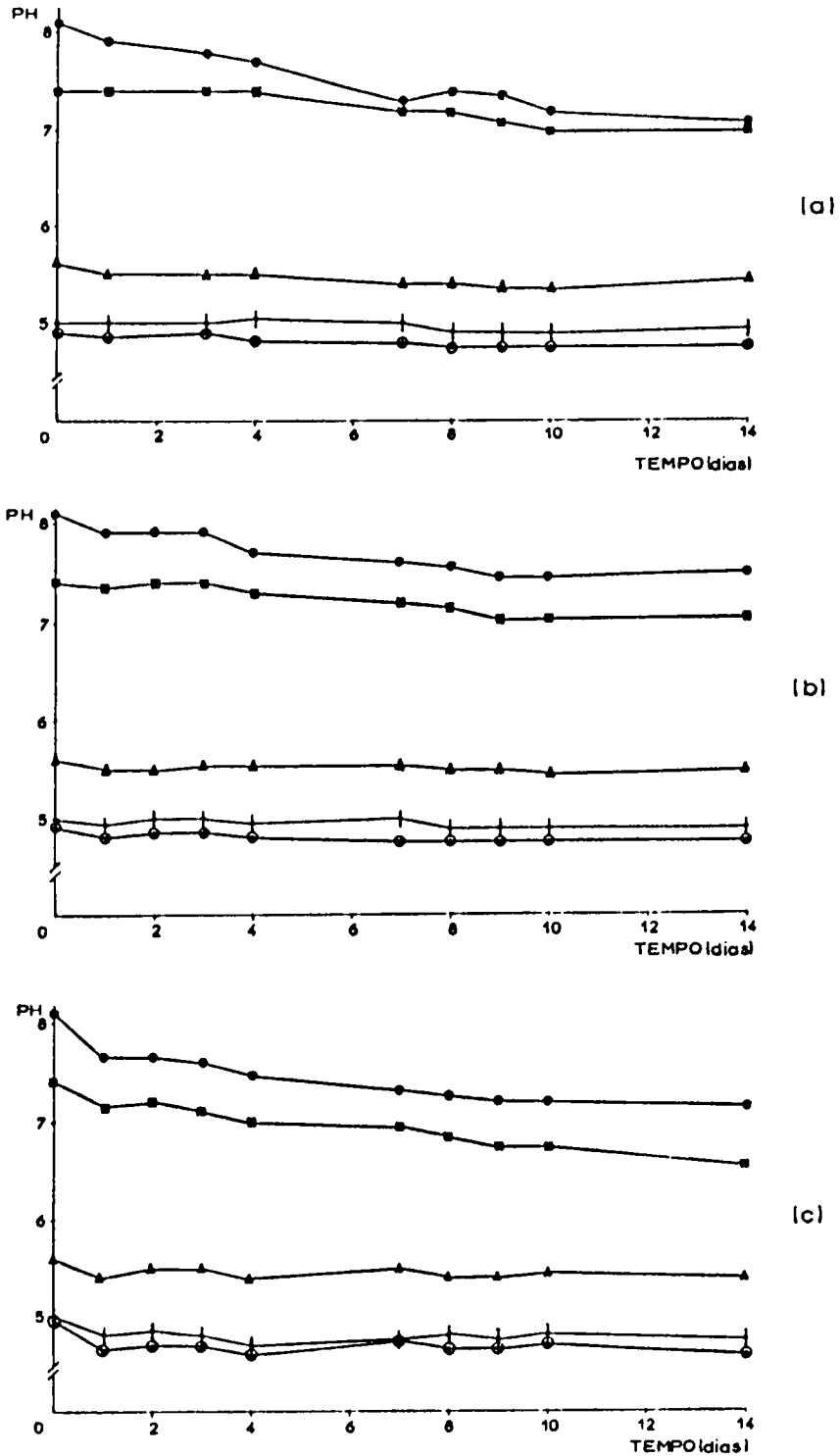


FIGURA 31 - Comportamento do pH no turbolizado e turbolizados a dicionados, obtidos com etanol a 80% (v/v), em função da temperatura ((a) = 4°C; (b) = ambiente; (c) = 60°C) e do tempo de armazenamento.

EpHa (|); EpHn (■); EpHb (●); EH<sub>2</sub>O (○); Ext (▲).

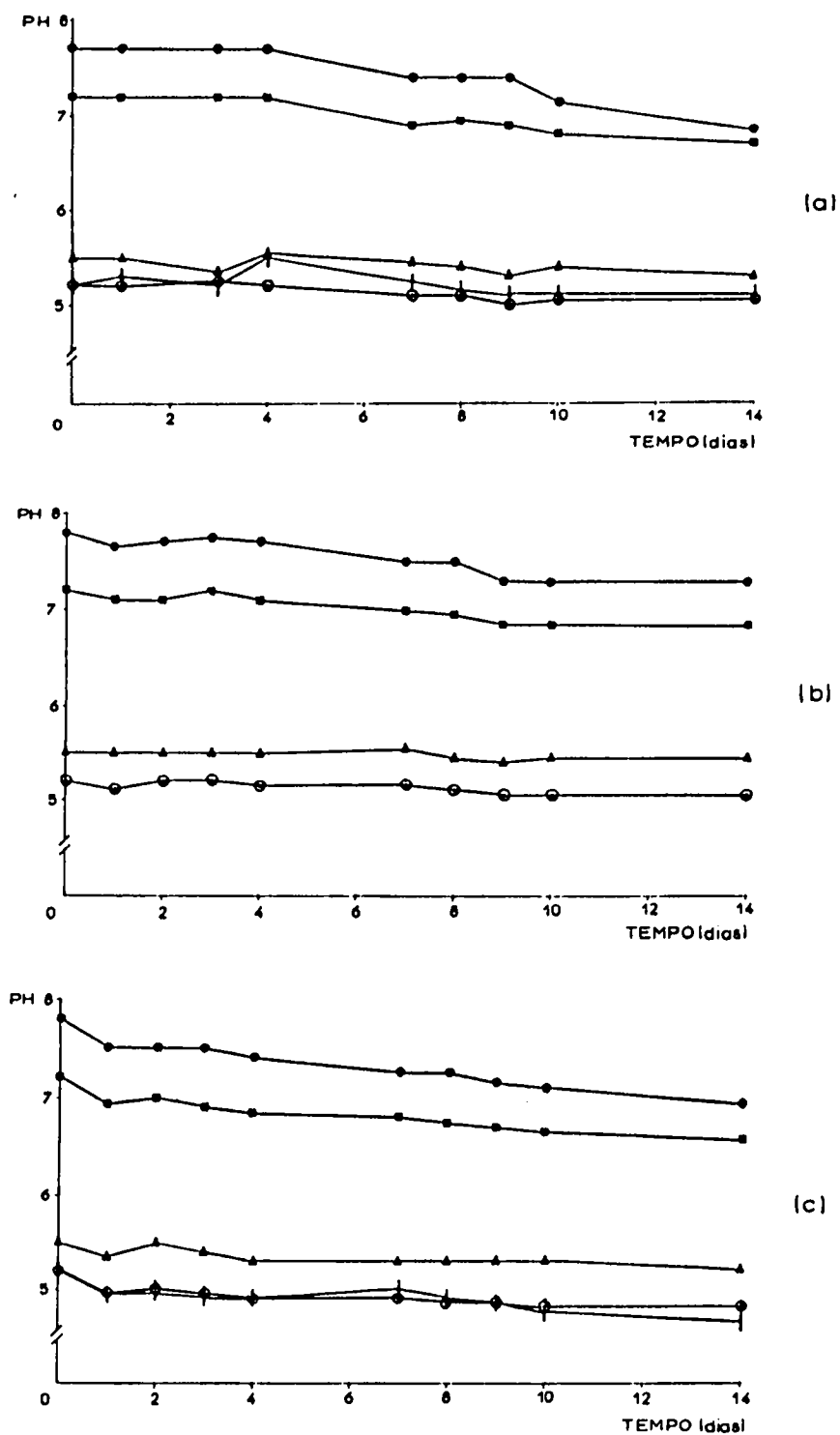


FIGURA 32 - Comportamento do pH no turbolizado e turbolizados a dicionados, obtidos com etanol a 60% (v/v), em função da temperatura ((a) = 4°C; (b) = ambiente; (c) = 60°C) e tempo de armazenamento.

EpHa (|); EpHn (■); EpHb (●); EH<sub>2</sub>O (⊙); Ext (▲).

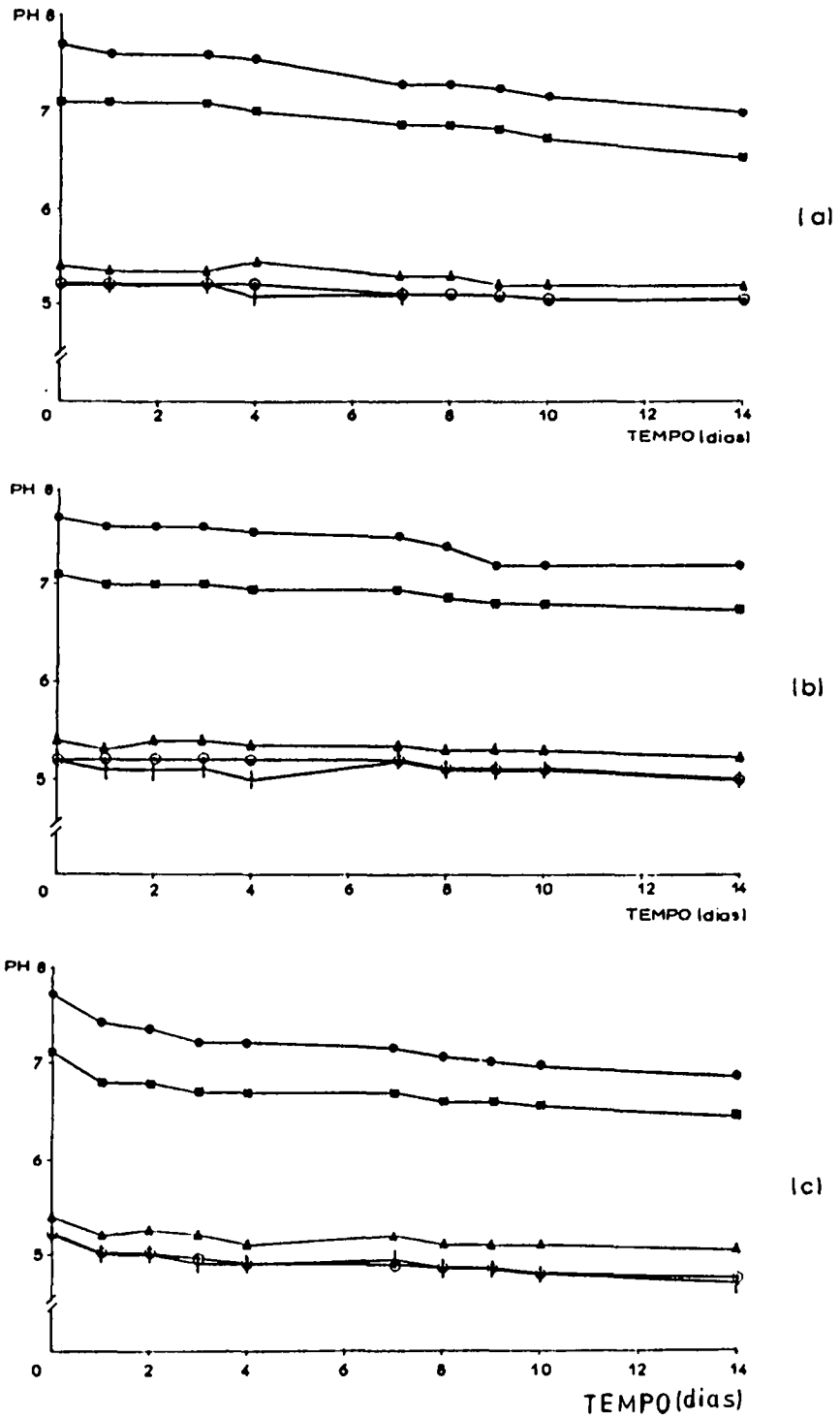


FIGURA 33 - Comportamento do pH no turbolizado e turbolizados a dicionados, obtidos com etanol a 40% (v/v), em função da temperatura ((a) = 4°C; (b) = ambiente; (c) = 60°C) e tempo de armazenamento.  
 EpHa ({}); EpHn (■); EpHb (●); EH<sub>2</sub>O (○); Ext (▲).



velmente, por modificações químicas favorecidas pelo aquecimento.

Embora os testes organolépticos sejam bastante característicos de um dado extrato, esse controle essencialmente subjetivo não é suficiente, o mesmo ocorrendo com os controles físicos (pH, densidade, etc.). É preciso reconhecer que esses testes correspondem mais às características do solvente extrativo e não à análise específica dos princípios ativos extraídos (ROBERT, 1983).

Numa tentativa de se verificar possíveis alterações na constituição química em função da diluição, tamponamento e temperatura de armazenamento dos extratos, cromatografaram-se o extrato etanólico e extratos etanólicos adicionados, no sistema Ie (Fig. 19). Pôde-se constatar a diminuição da intensidade de algumas manchas, especialmente a da quercetina, com a elevação da temperatura e do pH (EpHn e EpHb), verificando-se, novamente, a influência desfavorável do calor e do tamponamento neutro e alcalino dos extratos.

Em resumo, constatou-se que extratos alcoólicos e hidroalcoólicos das sumidades floridas de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. sofrem desestabilização quando o pH da solução afasta-se do valor do extrato original, com a diluição dos extratos posterior à extração, com a diminuição da concentração alcoólica no líquido extrator e com a elevação da temperatura de armazenamento.

Com o propósito de padronizar os extratos das sumidades floridas de marcela, foram empregados dois métodos de quantificação, um indireto (CP/UV) e outro direto (CLAE). Utilizou-se a

quercetina, um dos componentes majoritários, como substância referência, cuja resolução em relação aos demais componentes foi satisfatória em ambos métodos cromatográficos (Figs. 9 e 21).

No método CP/UV, inicialmente, foi isolada a quercetina presente nas amostras por cromatografia em papel. Comprovou-se a identidade da mesma através do ponto de fusão, co-cromatografia com amostra autêntica de quercetina, cromatografia bidimensional e mediante comparação do espectro UV com o de uma amostra autêntica (item 3.3).

A curva padrão do método CP/UV foi determinada a 255 nm e mostrou conformidade com a Lei de Lambert-Beer, na região de 2 a 10  $\mu\text{g/ml}$  (10 a 50  $\mu\text{g}/5\text{ ml}$ ) (Fig. 14).

Com a finalidade de validar a adequabilidade do método anterior, decidiu-se quantificar os extratos através da determinação do teor de quercetina por CLAE. A quantificação foi efetuada por comparação com padrão externo, empregando-se técnica isocrática, coluna de fase reversa e eluente hidrometanólico acidificado. A confiabilidade desse método sobrevém da sua alta sensibilidade, tanto na separação de produtos naturais (WULP & NAGEL, 1976; STRACK & KRAUSE, 1978; KÖSTER et al., 1983; PHILLIPSON, 1984), quanto na precisão dos resultados quantitativos (ROSS & BRAIN, 1977; AKADA et al., 1980; GRACZA, 1980).

A existência de linearidade entre a concentração de quercetina e a área do pico foi constatada pela correlação significativa, a um nível  $< 0,05$ , na faixa de 24 a 48  $\mu\text{g/ml}$  (Fig. 10).

A análise das concentrações de quercetina obtidas pelos dois métodos, quando correlacionados, demonstra haver uma correspondência linear altamente significativa entre os resultados

(Fig. 34), confirmando, deste modo, a viabilidade da determinação indireta por CP/UV.

Os desvios em torno da reta de regressão CP/UV x CLAE com o aumento da concentração (Tabs. 30, 32 e Fig. 34) são devidos, principalmente, a possíveis perdas e erros na aplicação, desenvolvimento, eluição e detecção, inerentes ao método CP/UV (SRI-VASTAVA & KISHORE, 1985).

A fixação dos fatores que envolvem a preparação propriamente dita de extratos é de suma importância quanto à reprodutibilidade química e farmacológica e à estabilidade da forma farmacêutica.

A influência do tamponamento dos extratos, temperatura de armazenamento e grau alcoólico do solvente na estabilidade dos extratos foi avaliada anteriormente na caracterização preliminar (item 3.4 e págs. 115 a 122).

Foram utilizados dois métodos de extração, turbolização e maceração, avaliando-se o comportamento dos extratos perante alterações na graduação alcoólica do líquido extrator, concentração de sumidades floridas utilizadas na extração e tempo de maceração, no que tange aos controles físico-químicos - resíduo seco bruto (RSB) e purificado (RSP) - e à quantificação da substância referência quercetina.

A turbolização foi utilizada como método auxiliar da maceração, servindo como indicativo quanto ao comportamento dos extratos frente a variações na concentração de sumidades floridas e no grau etanólico do líquido extrator.

Embora imperfeita a nível de rendimento, a maceração continua sendo a técnica mais empregada, pois permite, com solven-

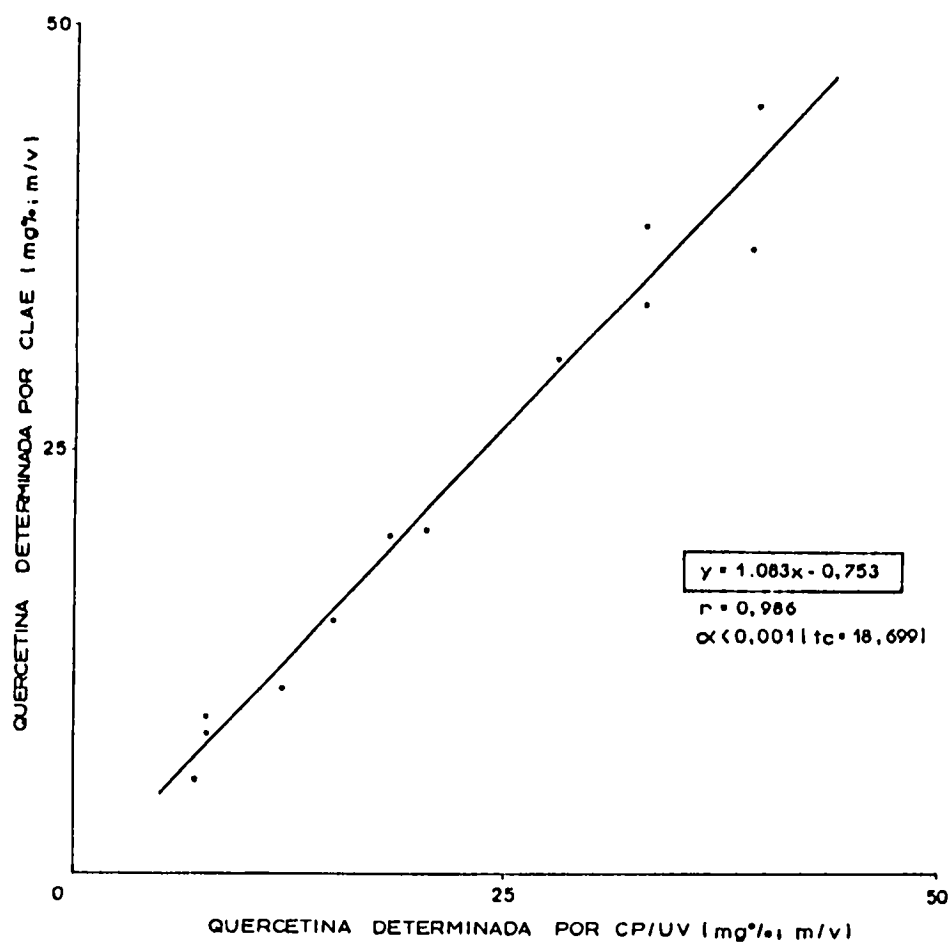


FIGURA 34 - Correlação ( $r$ ) entre os valores de quercetina nos ma cerados obtidos com etanol a 60% (v/v) a partir de 2,5, 5,0, 7,5 e 10,0 % (m/v) de sumidades floridas, durante 4, 8 e 16 dias, pelos métodos CP/UV e CLAE.

tes adequados, solubilizar sem destruir entidades químicas hidro ou lipossolúveis contidas no vegetal (ROBERT, 1983). Soma-se a isso a simplicidade técnica, não exigindo altos investimentos em equipamentos.

O resíduo seco dos extratos brutos (RSB) não é específico para avaliar a extração de um determinado grupo de substâncias. Um indicativo do real teor pode ser conseguido pelo tratamento com um solvente seletivo.

Dessa forma, após a purificação preliminar dos extratos com acetato de etila, ocorre seleção das substâncias flavonoídicas, fazendo com que o resíduo seco purificado (RSP) se constitua num rápido e importante controle. Isso não exclui, evidentemente, a quantificação da substância referência.

Analisando-se a Figura 35, observou-se, para os turbolizados, um máximo no rendimento em RSB no intervalo de 60 a 80% (v/v) de concentração de etanol, declinando com a elevação do grau alcoólico. Após purificação, entretanto, resultou num aumento gradual em resíduo seco (RSP) com o acréscimo do teor alcoólico do líquido extrator, acentuando-se com etanol sem diluição (96° GL).

Os resíduos secos brutos e purificados em função da variação da quantidade de sumidades floridas comportam-se semelhantemente nos dois métodos de extração (Figs. 35 e 36), verificando-se um aumento proporcional. Os valores de RSP dos turbolizados apresentam um platô a partir de 7,5 g% (m/v) de sumidades floridas, tendência essa observada também nos macerados, embora mais discreta.

Esse fato pode ser conseqüência de uma saturação do sol

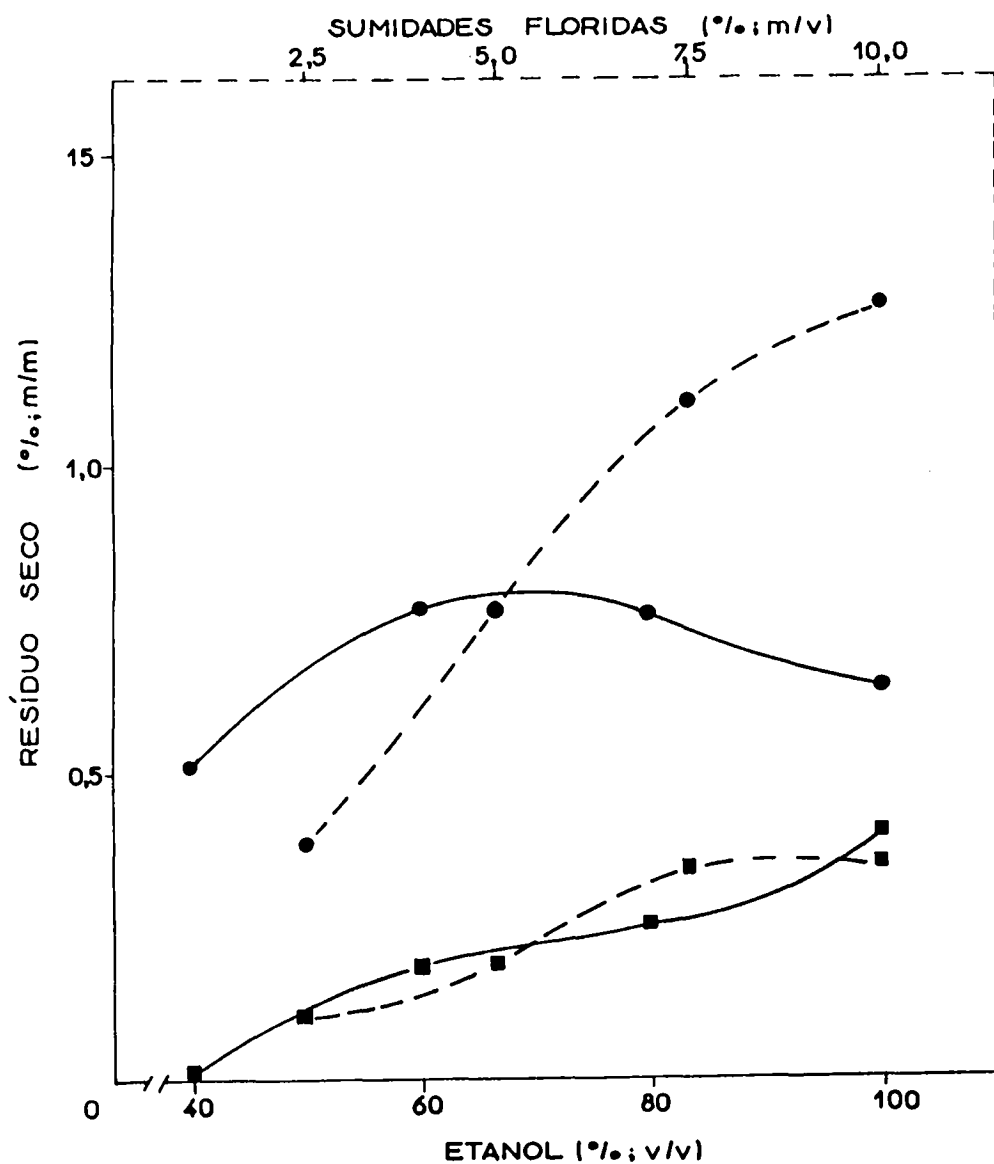


FIGURA 35 - Efeito da concentração de sumidades floridas (-----), (EtOH = 60%; v/v) e da concentração etanólica (—) (sumidades floridas = 5,0 %; m/v) sobre o RSB (●) e RSP (■) dos turbolizados.

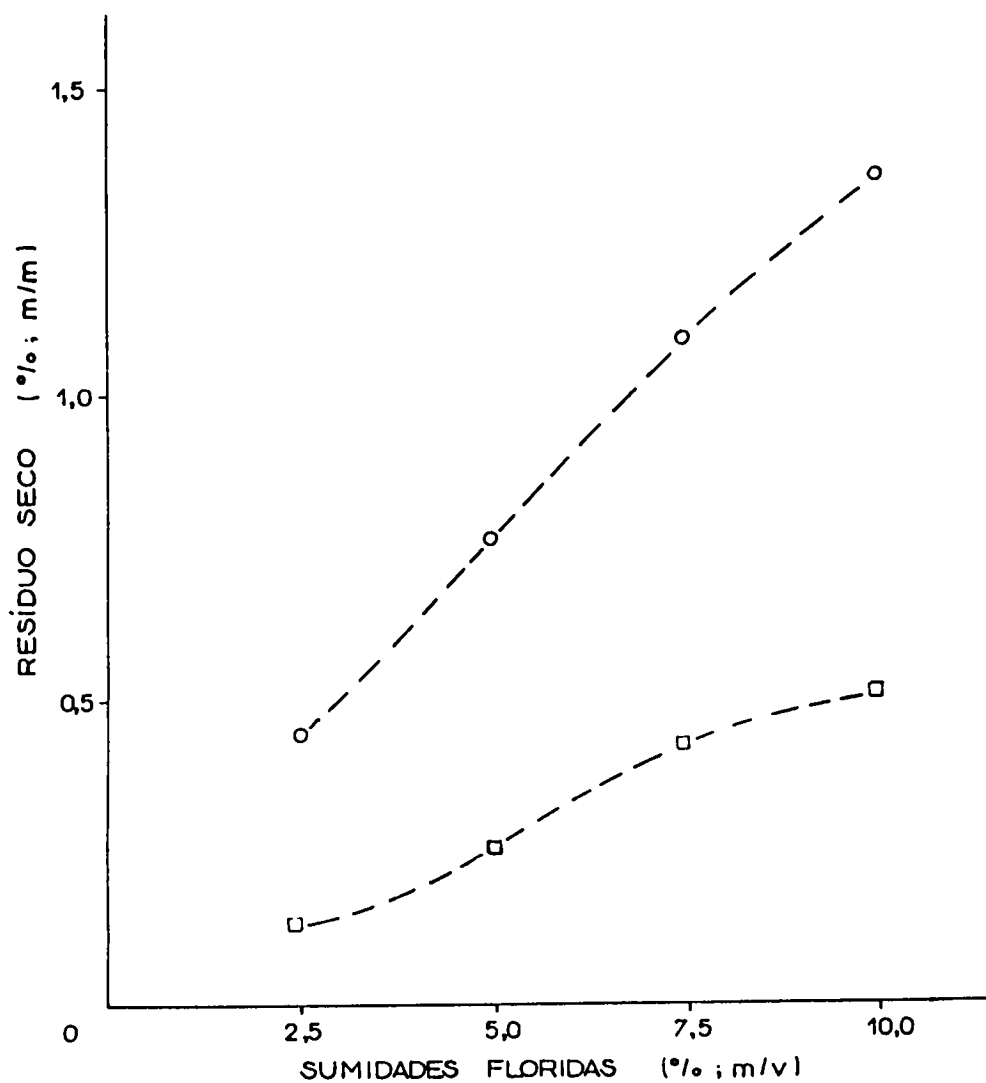


FIGURA 36 - Efeito da concentração de sumidades floridas (EtOH = 60 %; v/v) sobre o RSB (o) e RSP (□) dos macerados (tempo de maceração = 8 dias).

vente (mênstruo) nos dois métodos de extração. Acrescenta-se a isso que na turbolização houve, a 10,0 % (m/v) de sumidades floridas, a formação de uma massa densa. Este fato causou uma movimentação não homogênea da mistura, dificultando o rendimento da extração e impossibilitando a utilização desta técnica para altas concentrações da droga (acima de 7,5 % (m/v)).

Essa observação pode ser melhor visualizada quando da análise da capacidade de extração da substância referência quercetina dos extratos turbolizados (Fig. 37). A extração máxima ocorre com 7,5 % (m/v) de sumidades floridas, declinando subitamente com 10,0 % (m/v), ao contrário dos macerados, onde se verifica gradual aumento no teor de quercetina (Fig. 38).

Com relação à graduação alcoólica do líquido extrator, a concentração de quercetina manteve um aumento proporcional à medida que se elevou a porcentagem de etanol dos turbolizados (Fig. 37). Este comportamento mostrou-se similar àquele observado em função do RSP (Fig. 35), embora os resultados referentes ao RSB indiquem uma extração mais efetiva em resíduo seco com etanol a 60 - 80% (v/v).

Essa constatação reforça a necessidade de controles mais precisos da real presença de substâncias farmacologicamente ativas nas preparações extrativas de origem vegetal, que não apenas organolépticos e físico-químicos inscritos nos métodos farmacopêicos (VAN OS, 1980), pois alterações ocorrem, por exemplo, variando-se o método de extração. É o que se verifica nos dois métodos empregados no presente trabalho, quando da comparação das relações entre o rendimento em quercetina e resíduo seco bruto. Observam-se valores discrepantes entre os extratos obtidos por



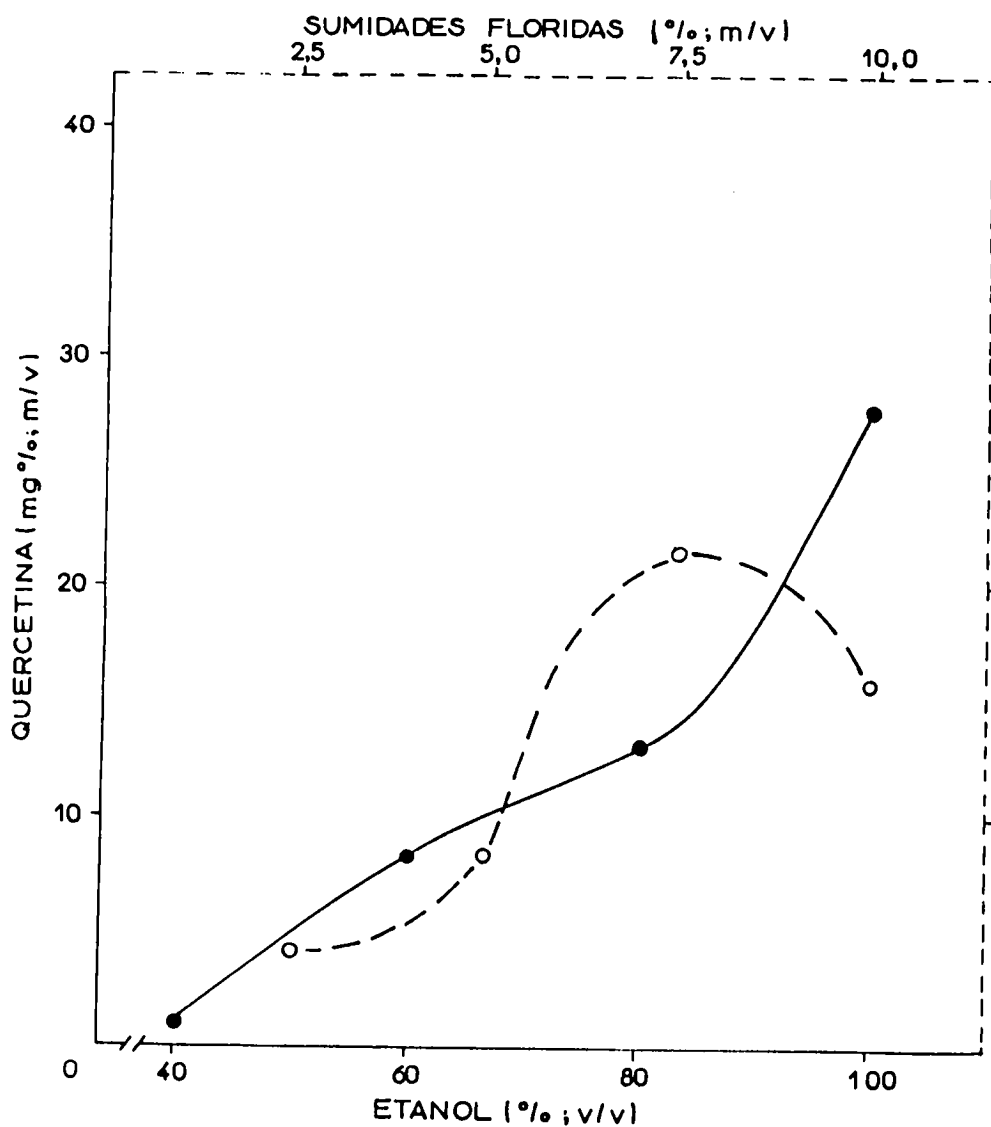


FIGURA 37 - Variação da concentração de quercetina em função da concentração etanólica (—) (sumidades floridas = 5,0 %; m/v) e da concentração de sumidades floridas (---) (EtOH = 60%; v/v) nos extratos obtidos por turbulização.

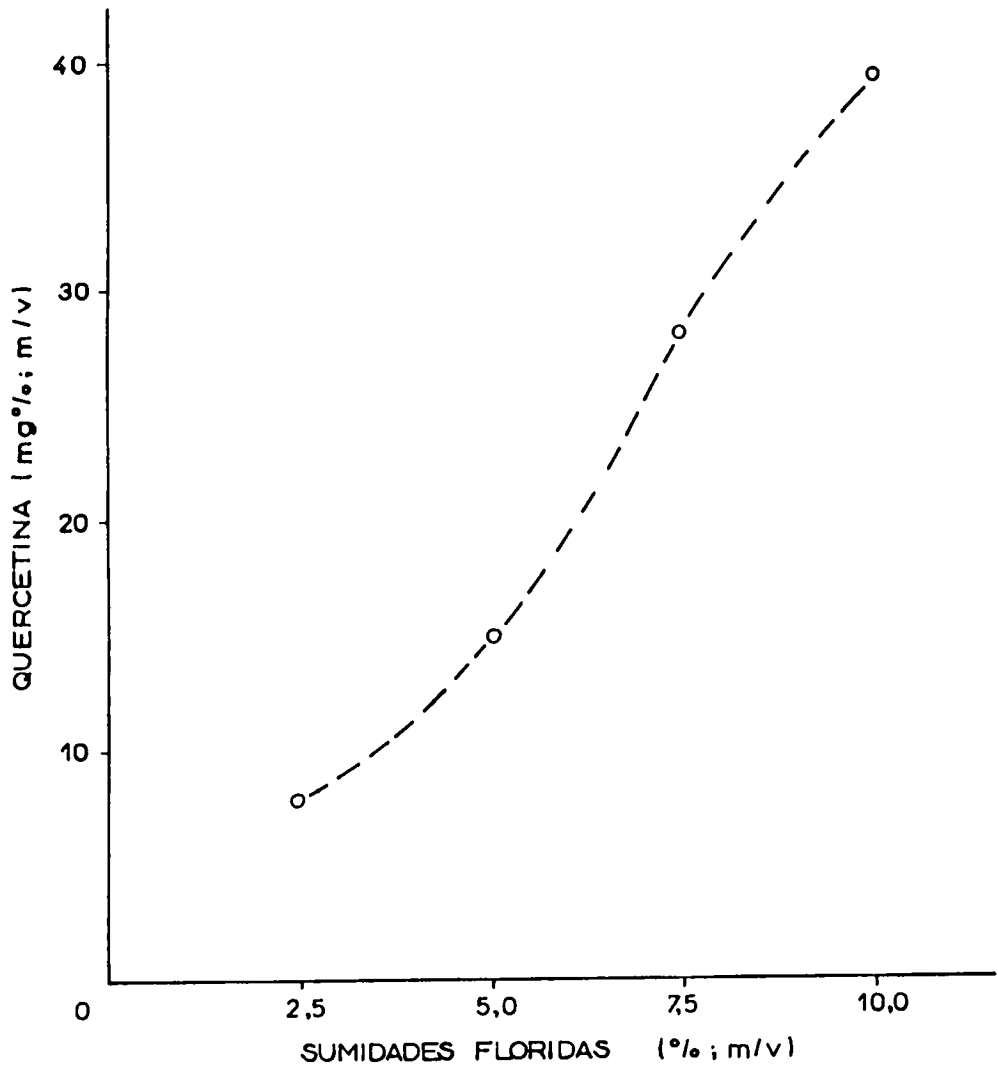


FIGURA 38 - Efeito da variação da concentração de sumidades floridas sobre a concentração de quercetina em extratos obtidos por maceração durante 8 dias. (EtOH = 60%; v/v).

maceração e turbolização (Tab. 43).

TABELA 43 - Relação entre a concentração de quercetina (mg%; m/v) e RSB (%; m/m) nos macerados e turbolizados obtidos a partir de 7,5 % (m/v) de sumidades floridas em função da concentração etanólica.

Concentração etanólica (%; v/v)	Quercetina/Resíduo seco bruto (RSB)	
	Maceração	Turbolização
40	8,97	1,76
60	11,72	11,13
80	12,59	17,12

Para a determinação do tempo ótimo de maceração, analisaram-se extratos obtidos a partir de etanol a 60% (v/v), num período de 16 dias.

Os resultados referentes ao RSB mostram pequena e gradual elevação com o passar do tempo e com o aumento da porcentagem da droga (Fig. 39). Contudo, os resultados da avaliação do RSP mostram uma tendência à estabilização a partir do oitavo dia de maceração e 7,5 % de sumidades floridas (Fig. 40). Com 10,0 %, o equilíbrio parece acontecer desde o quarto dia de maceração, razão pela qual pode-se acreditar numa provável saturação do solvente (mênstruo).

Analisando-se as concentrações de quercetina obtidas por CP/UV e por CLAE (Figs. 41 e 42), também é observada uma tendência ao equilíbrio a partir do oitavo dia, sendo mais nítida aos

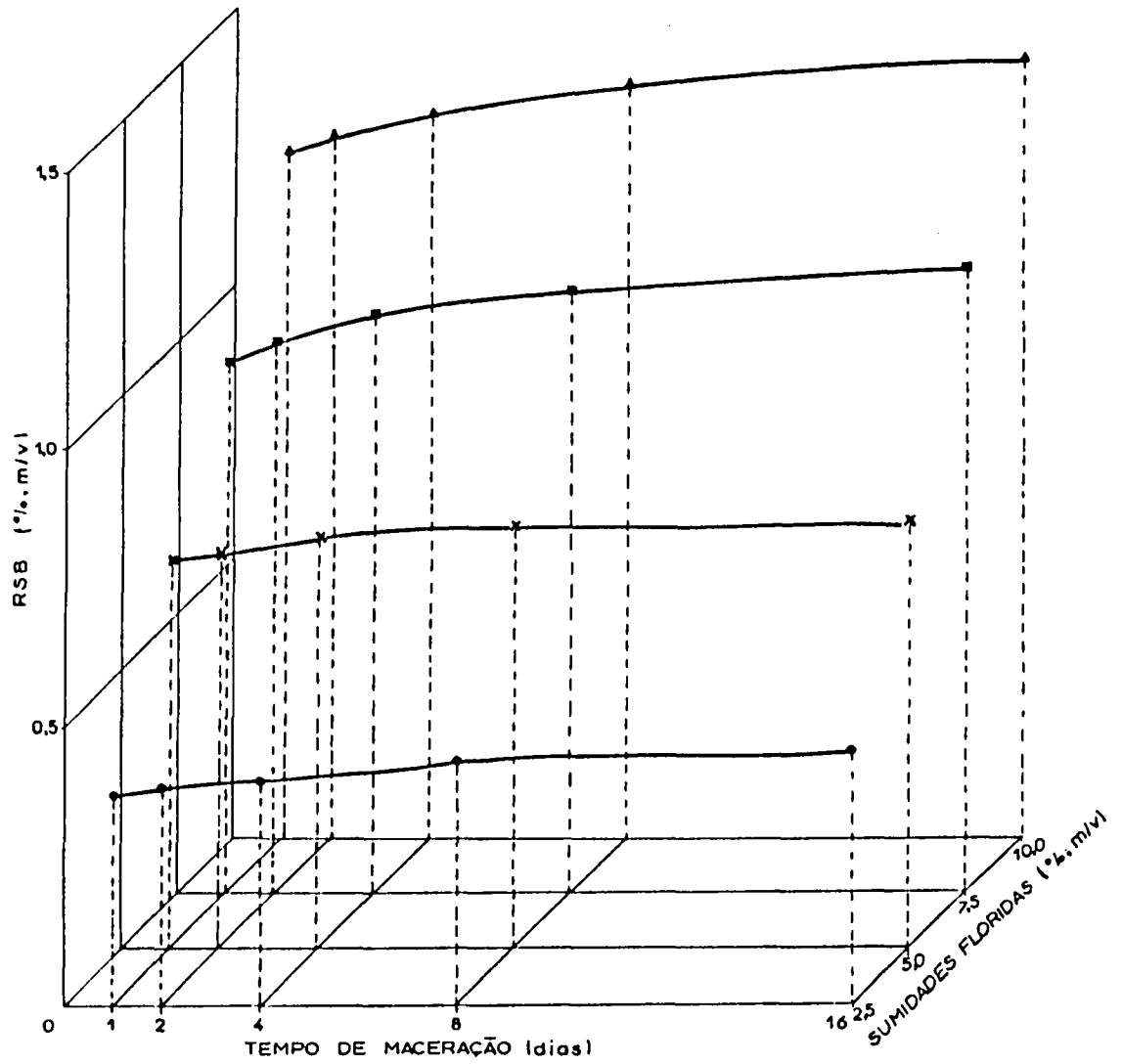


FIGURA 39 - Efeito da concentração de sumidades floridas e do tempo de maceração sobre o valor do resíduo seco bruto (RSB) dos extratos obtidos com etanol a 60% (v/v).

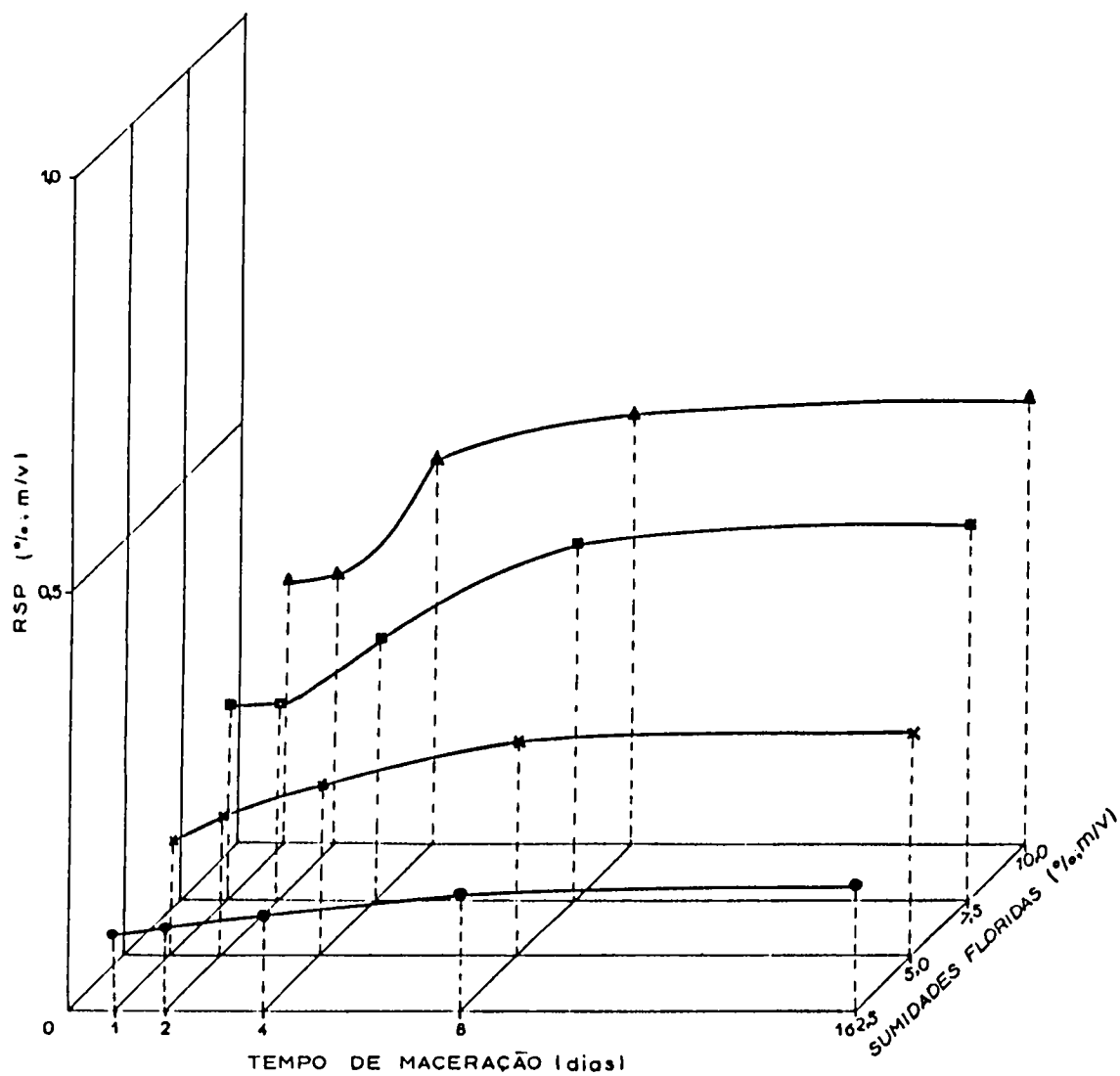


FIGURA 40 - Efeito da concentração de sumidades floridas e do tempo de maceração sobre o valor do resíduo seco purificado (RSP) dos extratos obtidos com etanol a 60% (v/v).

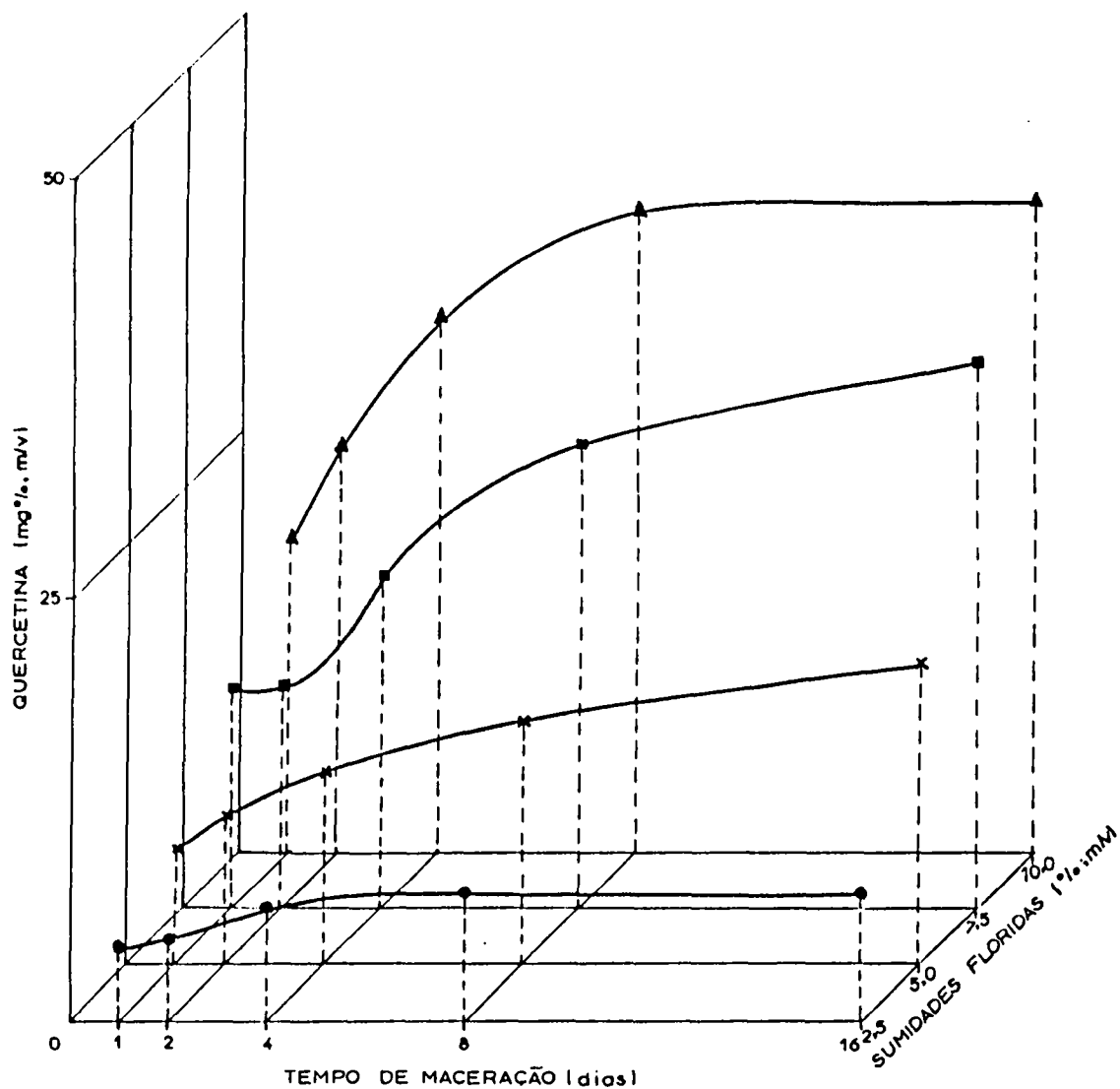


FIGURA 41 - Variação da concentração de quercetina determinada por CP/UV, nos macerados obtidos com etanol a 60 % (v/v), em função do tempo de maceração e da concentração de sumidades floridas.

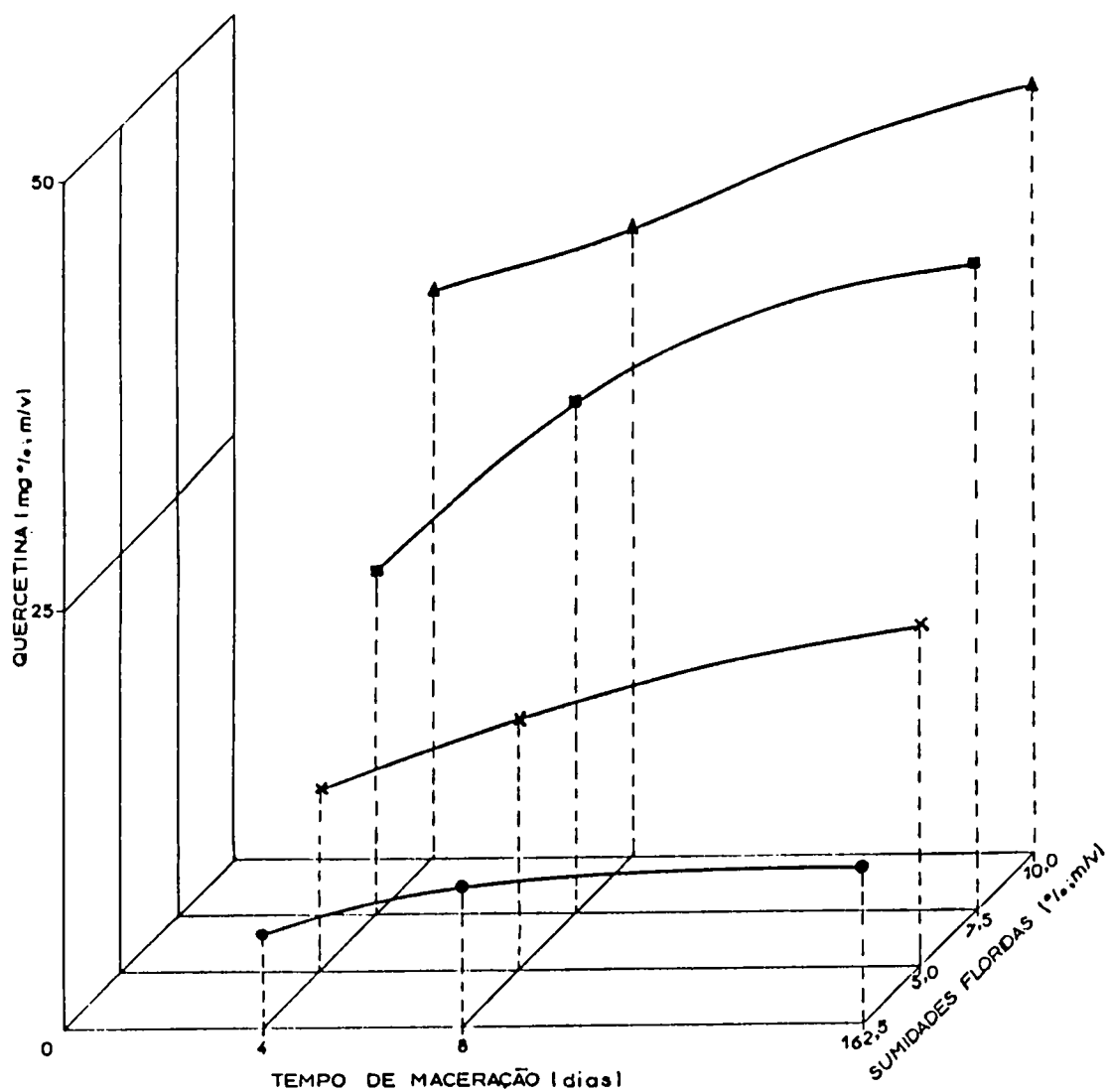


FIGURA 42 - Variação da concentração de quercetina determinada por CLAE, nos macerados obtidos com etanol a 60% (v/v), em função do tempo de maceração e da concentração de sumidades floridas.

10,0 % de sumidades floridas, para o método CP/UV (Fig. 41). No método CLAE (Fig. 42), entretanto, verifica-se que o comportamento do  $E_{10,0}$  é semelhante ao  $E_{7,5}$  no intervalo do oitavo ao décimo sexto dia. Estas discrepâncias quanto ao método de doseamento já foram analisadas anteriormente (pág. 124).

O efeito da concentração da droga sobre o rendimento em quercetina pode ser avaliado pela comparação do índice Q (relação entre o rendimento final em quercetina e a concentração da droga), representado na Figura 43. Os valores crescem com o aumento da concentração até 7,5 %, declinando após.

Uma elevação da concentração de sumidades floridas de 33% ( $E_{7,5}$  a  $E_{10,0}$ ) traduz-se num aumento do rendimento em quercetina de 18%. Já a redução em 33% ( $E_{7,5}$  a  $E_{5,0}$ ) diminui o rendimento em 48%.

O tempo ótimo de extração pode ser também avaliado através da Tabela 44, que apresenta a variação percentual da concentração de quercetina nos diversos intervalos de tempo. Essa variação observada nos quarto, oitavo e décimo sexto dias de maceração informa que a maior quantidade da substância foi extraída nos primeiros quatro dias de contato. Após oito dias, observa-se uma extração relativa em quercetina de 89%, 74% e 79% e 82% para as concentrações de sumidades floridas de 2,5%, 5,0%, 7,5% e 10,0 %, respectivamente.

Estes dados corroboram as observações já feitas de que a concentração mais adequada para a extração é a de 7,5 % de droga e que o tempo que apresenta a melhor relação de rendimento é o de 8 dias. Torna-se, portanto, economicamente desvantajosa a manutenção da extração além do oitavo dia para extratos obti-



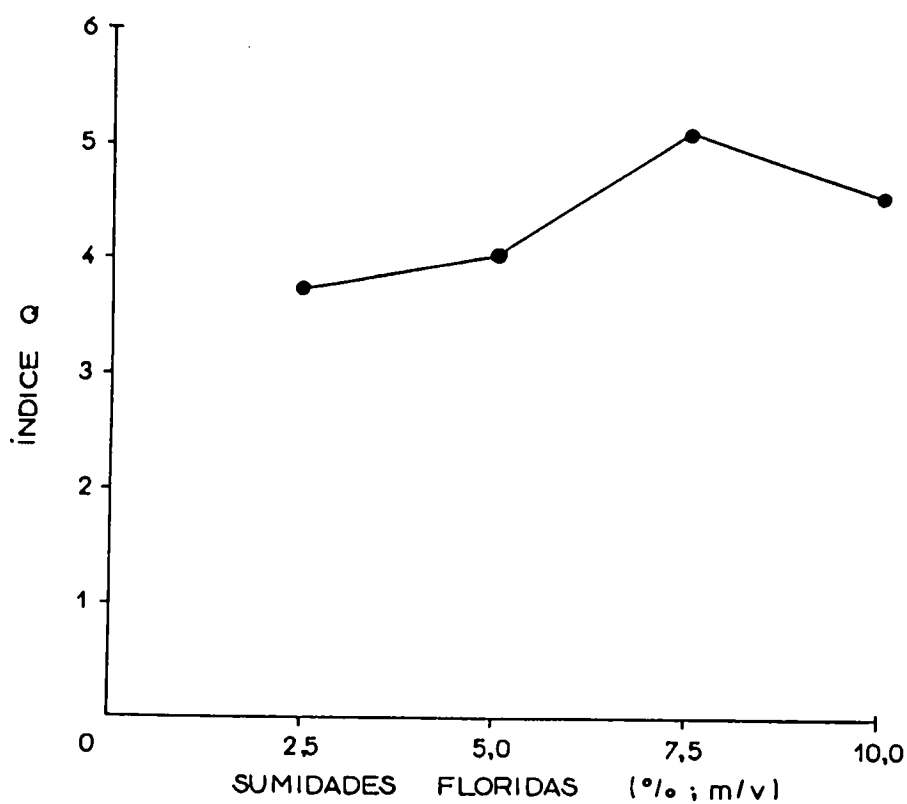


FIGURA 43 - Efeito da concentração de sumidades floridas nos macerados obtidos com etanol a 60% (v/v) sobre a relação entre o rendimento final em quercetina e a concentração da droga (Índice Q). (Tempo de maceração = 8 dias).

dos a partir de elevadas quantidades da droga.

TABELA 44 - Variação percentual da concentração de quercetina nos macerados obtidos com etanol a 60% (v/v) em função do tempo de maceração.

Concentração de sumi- dades floridas (%; m/v)	Variação percentual da concentração de quercetina		
	0 - 4 dias	4 - 8 dias	8 - 16 dias
2,5	59,42	29,44	11,14
5,0	54,30	20,09	25,61
7,5	52,82	25,99	21,19
10,0	74,02	7,70	18,28

O rendimento em quercetina nos macerados, em função do grau alcoólico do líquido extrator, aliado aos resultados observados no estudo preliminar quanto à conservação e estabilidade dos extratos hidroalcoólicos, indica um ótimo de extração com etanol a 80% (v/v), dentro dos parâmetros analisados.

Tendo sido verificado que o extrato etanólico (EtOH 96° GL) obtido por turbolização apresentou o maior rendimento em quercetina, este procedimento poderia servir como uma etapa interme-

diária na obtenção de formas farmacêuticas derivadas, que necessitem de maior concentração dessa substância.

A análise dos diversos fatores que envolveram o desenvolvimento do método de extração e dos fatores que influenciaram na estabilidade, somada aos aspectos econômicos, aponta como extrato otimizado aquele obtido a partir de 7,5 % (m/v) de sumidades floridas de *Achyrocline satureioides* com etanol a 80% (v/v) durante oito dias de maceração.

O extrato otimizado foi caracterizado por seus aspectos organolépticos e físico-químicos, pela análise qualitativa por cromatografia, nos sistemas  $I_{12}$  e  $V_1$ , do extrato bruto e purificado frente aos padrões Q, MQ, LU e AC e pela determinação quantitativa em RSB, RSP e quercetina (itens 3.7.1, 3.7.2 e 3.7.3).

Comparando o valor da concentração de quercetina nos macerados obtidos após 8 dias de contato a partir de 7,5 % de sumidades floridas com etanol a 60%, referentes à etapa de desenvolvimento do extrato (Tab. 35), observou-se uma redução considerável com relação ao valor determinado no início da mesma fase (Tab. 30).

Considerando que o lapso de tempo entre as etapas de desenvolvimento do extrato e a obtenção do macerado otimizado foi de aproximadamente um ano, pode-se sugerir que tal alteração esteja relacionada com o tempo de armazenamento da droga.

No intuito de prever a estabilidade do extrato otimizado, realizou-se o ensaio de envelhecimento acelerado mediante degradação térmica. O extrato foi submetido às temperaturas de 40, 50 e 60°C e avaliado em função da concentração de quercetina, pelo método CP/UV, no segundo, quarto, oitavo, décimo sexto e trigésimo segundo dias de

armazenamento.

Analisando-se a Tabela 41, verifica-se aumento na concentração da substância referência (quercetina), passando de 12,82 mg% (m/v), no tempo zero, para máximos de 19,25 mg% (m/v) e 18,30 mg% (m/v), nas temperaturas de 40°C e 50°C, respectivamente, após 8 dias, e de 18,93 mg% (m/v) na temperatura de 60°C, após 16 dias de armazenamento. Todos os valores de quercetina foram significativamente superiores ao valor encontrado no tempo zero ( $\alpha < 0,05$ ).

Com a finalidade de encontrar uma explicação para o fato, submeteu-se uma solução alcoólica a 80% (v/v) de quercetina padrão às temperaturas de 4°C, ambiente e 60°C. Sua concentração foi determinada no tempo zero, após 16 dias, nas temperaturas ambiente e 60°C e após 32 dias, nas temperaturas de 4°C, ambiente e 60°C (Tab. 42).

Observou-se declínio no teor de quercetina, à medida que se elevou a temperatura e o tempo de armazenamento, acompanhado de gradual escurecimento da solução, fato este observado também no extrato analisado. Essa alteração é própria de modificação química a nível de oxidação, muito suscetível a essa substância altamente hidroxilada.

Ao se verificar os valores de pH do extrato submetido às diversas condições de envelhecimento, constatou-se um comportamento diferente ao da solução hidroalcoólica de quercetina mantida a 60°C. Houve um decréscimo nos valores de pH dos extratos, independente da temperatura, até o oitavo dia, a partir do qual verifica-se uma leve tendência à elevação. Com a solução padrão ocorreu um aumento acentuado, do segundo ao décimo sexto dia, e menos pronunciado no restante do período (Tab. 40 e Fig. 44).

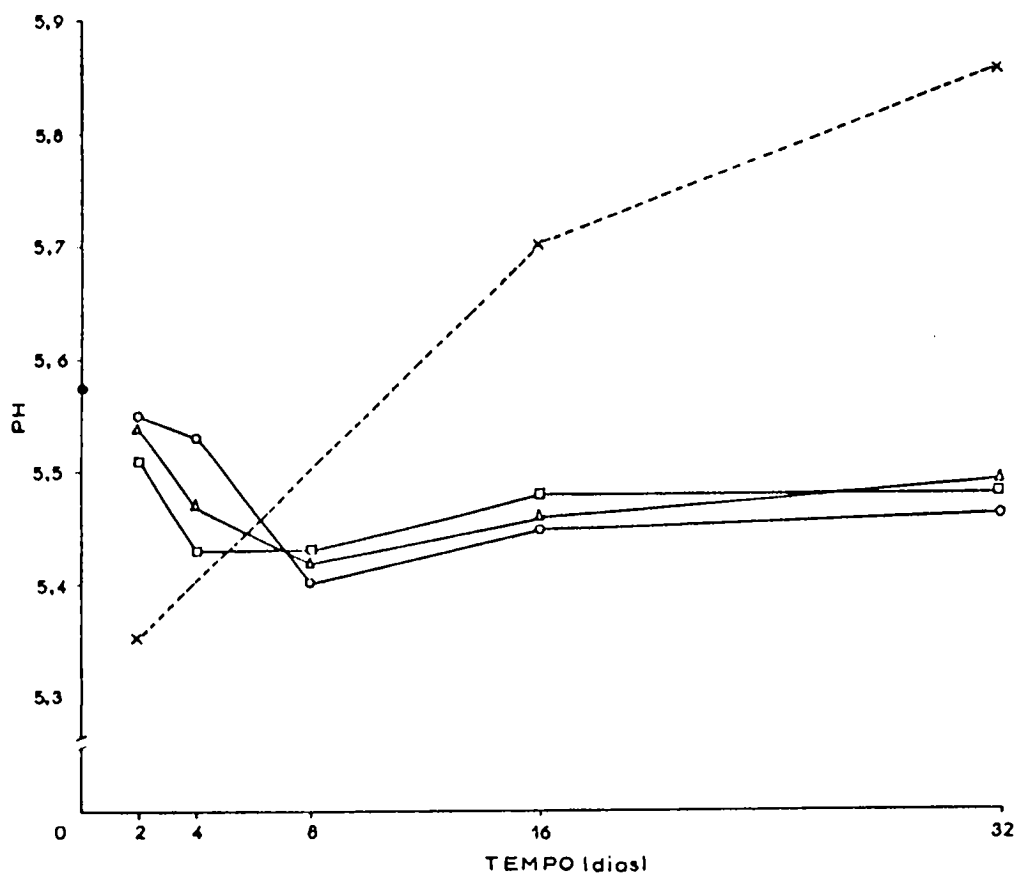


FIGURA 44 - Valores do pH do extrato hidroalcoólico otimizado submetido às temperaturas de 40°C (o), 50°C (Δ) e 60°C (□) e da solução padrão de quercetina a 60°C (--x--), pH inicial do extrato (●).

Com base nesses resultados, poder-se-ia presumir a ocorrência de possíveis hidrólises de glicosídeos da quercetina. Entretanto, até o momento não foi relatada a presença de glicosídeos da quercetina em *A. satureioides*, e sim do seu derivado metoxilado, porém em pequena quantidade (SIMÕES, 1984). Outras alterações químicas podem ter ocorrido, cuja investigação exigiria um estudo mais aprofundado, já que a simples verificação cromatográfica dos diversos extratos submetidos à degradação térmica (Fig. 26) não forneceu subsídios suficientes.

Entretanto, pode-se verificar nesta análise, com o decorrer do período de armazenamento, nas diversas temperaturas, uma gradual diminuição na intensidade das manchas de valores de  $R_f$  intermediários aos da 3-O-metilquercetina e quercetina e inferiores a esta. Esse fato poderia estar relacionado com o aumento nos teores de quercetina, contudo, para sua comprovação, inicialmente, torna-se necessária a identificação segura destas substâncias.

Fica em aberto, portanto, o desenvolvimento de um método alternativo para a elucidação desse inesperado aumento do teor de quercetina no referido extrato.

A padronização de um fitoterápico compreende não somente as análises físico-químicas e organolépticas. Há necessidade também do teste de sua ação biológica.

A atividade antiinflamatória de extratos aquosos a frio e a quente e de extratos alcoólicos de flores de marcela já foi avaliada, assim como a das agliconas flavonoídicas quercetina, 3-O-metilquercetina e luteolina, substâncias relatadas para a espécie em estudo. O extrato aquoso a frio, nas doses de 75 a 150

mg/kg, os extratos aquoso a quente e etanólico a frio, nas doses de 200 e 500 mg/kg e os flavonóides isolados, na dose de 20 mg/kg, administrados via i.p., forneceram resultados positivos, no modelo de inibição do edema das patas dos ratos produzido por carragenina (SIMÕES, 1984).

De posse desses dados, decidiu-se realizar o teste com o extrato hidroalcoólico otimizado das sumidades floridas de *Achyrocline satureioides*, utilizando-se o agente antiinflamatório não esteroidal indometacina como substância referência, nas mesmas condições realizadas por SIMÕES (1984).

Com base nas informações acima descritas, realizou-se um estudo preliminar para escolha de doses do extrato otimizado. A dose de 200 mg/kg (em relação ao resíduo seco) foi a escolhida por ter mostrado resultados semelhantes aos da substância referência indometacina.

Observou-se ação antiinflamatória significativa ( $\alpha < 0,05$ ) a partir de meia hora após a administração de indometacina e da primeira hora após administração do extrato (Tab 37 e Fig. 20). Comparativamente à substância referência, a atividade do extrato não apresentou diferença significativa ( $\alpha > 0,05$ ) (Tab. 38 e Fig.45).

A avaliação da atividade antiinflamatória, nesse modelo, é um teste moroso, que requer um número elevado de animais para se obterem resultados confiáveis. Por outro lado, a necessidade de um teste biológico é imprescindível em extratos vegetais onde não se conhecem as substâncias responsáveis pela ação farmacológica. Portanto, objetivando uma determinação da atividade que não apresentasse a desvantagem acima citada, não abrindo mão, porém, da confiabilidade do resultado, foi realizada a determinação

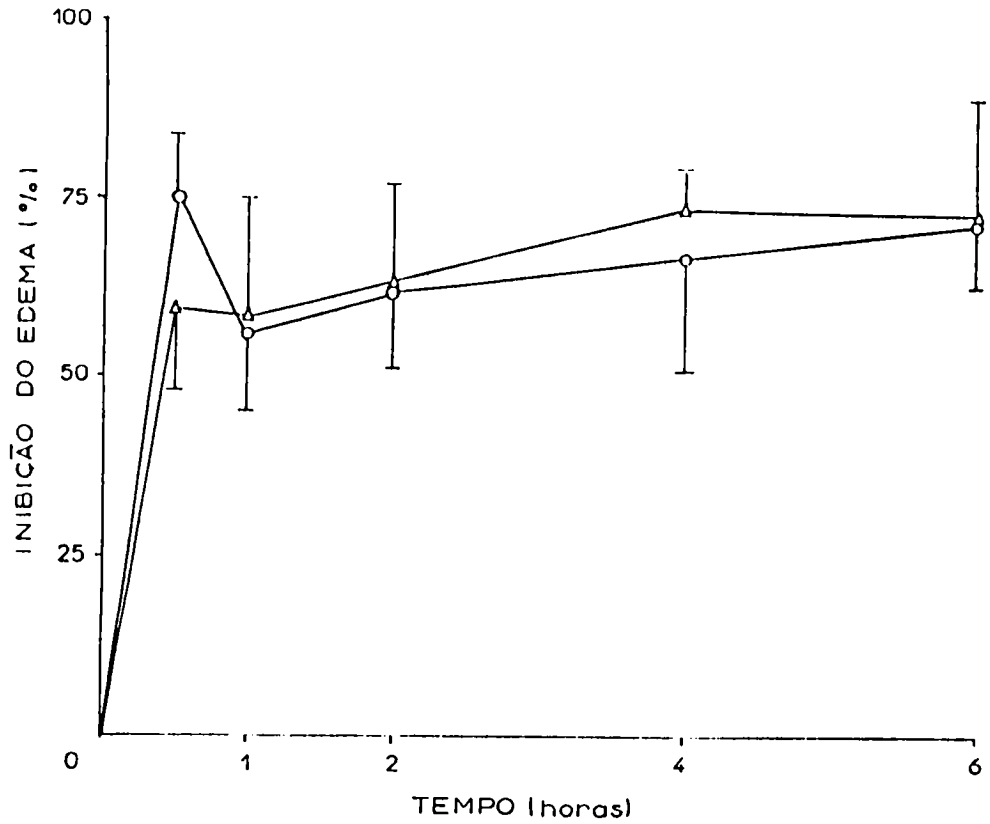


FIGURA 45 - Efeito sobre a inibição do edema das patas de ratos produzido pela injeção local de 0,1 ml de carragenina (0,5 mg/ml) em ratos tratados, intraperitonealmente, com extrato hidroalcoólico otimizado de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC., na dose de 200 mg/kg (Δ), e com indometacina, na dose de 10 mg/kg (o).



do índice de atividade antiinflamatória (iAa). Para a obtenção desse índice, é necessária a avaliação da inibição do edema das patas de ratos, em um tempo determinado, observando-se somente o grupo referência e o grupo teste. Analisando-se a Figura 20(A), observa-se que, a partir da quarta hora da administração do extrato, ocorre uma manutenção da intensidade do efeito. Com isso, os resultados observados neste tempo de ação foram transpostos para a equação (6) (pág. 42), e o iAa calculado. Dessa forma, o extrato otimizado das sumidades floridas de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. apresentou um iAa de 111% em relação à indometacina (item 3.7.5).

Avaliou-se, também, a toxicidade do extrato otimizado e do mesmo extrato submetido à degradação térmica acelerada, à temperatura de 60°C, por 32 dias, na mesma dose e via de administração (200 mg/kg, i.p.) utilizadas no teste de avaliação da atividade antiinflamatória.

Não foram observadas mortes dos animais, entretanto constatou-se irritação cutânea (pruridos) logo após a administração, provocada provavelmente pelo veículo, já que os grupos controles apresentaram a mesma reação. Esta reação perdurou até aproximadamente 4 horas após a injeção, desaparecendo no restante do período de observação.

O mesmo ensaio realizado com extratos aquosos (a frio e a quente) e etanólico de flores da marcela, com veículo diferente (salina + 1% polissorbato 80) e dose 2,5 vezes superior (500 mg/kg), não resultou em mudanças comportamentais nem morte dos animais (SIMÕES, 1984).

O estado de sonolência observado nos camundongos trata-

dos com o extrato poderia ser explicado pela ação sedativa central, no modelo de potenciação do sono barbitúrico induzido pelo pentobarbital sódico, relatada para o extrato aquoso a quente de marcela (SIMÕES, 1984). Embora os dois extratos tenham sido obtidos por métodos diferentes, isso não exclui a possibilidade da presença de mesmas substâncias responsáveis por esta ação.

Dessa forma, pode-se deduzir que o extrato hidroalcoólico obtido a partir de 7,5 % (m/v) de sumidades floridas de marcela com etanol a 80% (v/v) após 8 dias de maceração não apresenta toxicidade nas condições experimentais utilizadas, mesmo após ter sido submetido ao ensaio de degradação pelo calor.

Ficam em aberto, no entanto, estudos adicionais concernentes a efeitos colaterais negativos relacionados aos compostos flavonoídicos presentes na marcela, em especial, estudos mais aprofundados quanto a ausência de toxicidade, aguda e crônica, de extratos hidroalcoólicos das sumidades floridas ou de outras preparações farmacêuticas obtidas a partir desse vegetal.

Até o momento, a literatura registra uma baixa toxicidade para os flavonóides, em contraste com a grande variedade de atividades biológicas destes compostos. Apesar do grande número de comunicações referentes aos efeitos genotóxicos e carcinogênicos (com ou sem ativação) de flavonóides (LE QUESNE et al., 1976; BJELDANES & CHANG, 1977; SUGIMURA et al., 1977; MacGREGOR, 1979; NAGAO et al., 1979; TAKAHASHI et al., 1979; SAHU et al., 1981; UYETA et al., 1981; MAZAKI et al., 1982; ULUBELEN & ÖKSÜZ, 1982; CARVER et al., 1983; CEA et al., 1983; MacGREGOR et al., 1983; OGAWA et al., 1985; MADER & MacDONALD, 1985), essa questão não se encontra definitivamente esclarecida, verificando-se resulta-

dos contraditórios ou insuficientemente assegurados. Além disso, a existência de poucos dados farmacológicos e a inexistência de ensaios epidemiológicos, atualmente, não fornecem indicação ponderável quanto à significância de um risco especial para seres humanos (SCHIMMER, 1986).

Considerando-se a mutagenicidade descrita especificamente para a quercetina (BJELDANES & CHANG, 1977; SUGIMURA et al., 1977; PAMUKCU et al., 1980; MELTZ & MacGREGOR, 1981; SAHU et al., 1981; UYETA et al., 1981; MAZAKI et al., 1982; CARVER et al., 1983; CEA et al., 1983; MacDONALD et al., 1983; OGAWA et al., 1985; MADER & MacDONALD, 1985) é importante que esses ensaios sejam efetuados com extratos de *A. satureioides*. Quanto a esse aspecto, MOTTA et al. (1986 e 1987\*) verificaram atividade mutagênica do tipo "Frameshift" (TA 98), na presença de ativação microssomal, em infuso a 50% (m/v) de marcela, fazendo-se necessário, entretanto, a realização desse teste em extratos alcoólicos e hidroalcoólicos da mesma.

O estudo desenvolvido, referente à determinação dos fatores ligados à preparação e padronização de extratos alcoólicos e hidroalcoólicos, permite a ampliação da forma de utilização da marcela, com nível de qualidade determinável.

Os resultados observados durante o trabalho podem auxiliar na obtenção de formas farmacêuticas derivadas, cuja matéria-prima seja originária de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC., uma

---

\* MOTTA, V.E.O.; VARGAS, V.M.F.; HENRIQUES, I.A.P. *Determinação da atividade mutagênica em espécies utilizadas na medicina popular*. Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências, UFRGS, 1987. Comunicação Pessoal.

das plantas mais utilizadas na medicina popular da região sul do País.

Os aspectos levantados e constatados no decorrer deste trabalho só foram possíveis graças a pesquisas anteriores, concernentes aos aspectos botânicos, identificação química dos componentes e sua relação com certas atividades biológicas fundamentadas, principalmente, no variado uso popular da marcela. Coloca-se em evidência, portanto, a real necessidade de interligação dos estudos botânicos, fitoquímicos, farmacológicos e tecnológicos de drogas vegetais como fator primordial para o desenvolvimento e sedimentação da fitoterapia.

## 5 - CONCLUSÕES

- As sumidades floridas de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. e seus extratos podem ser caracterizados por cromatografia em papel, cromatografia em camada delgada e cromatografia líquida de alta eficiência, através dos constituintes polifenólicos - quer cetina, 3-O-metilquercetina, luteolina e ácido cafeico - e por cromatografia gasosa, através do perfil cromatográfico de seu óleo essencial.
- O componente flavonoídico - quer cetina - é adequado como substância referência na quantificação de extratos alcoólicos e hidroalcoólicos das sumidades floridas de marcela.
- Os métodos de doseamento propostos - cromatografia em papel associada à espectrometria no ultravioleta (CP/UV) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) - demonstraram ser viáveis, apresentando exatidão e reprodutibilidade.
- As condições otimizadas para a obtenção do extrato macerado foram: 7,5 % de sumidades floridas, 80% de etanol no líquido extrator e 8 dias de maceração.

- O extrato hidroalcoólico otimizado apresentou atividade antiin<sub>fl</sub>amatória, no modelo de inibição do edema das patas de ratos produzido por carragenina.
- O extrato pode ser padronizado, biologicamente, através da determinação do índice de atividade antiinflamatória (iAa).
- O estudo da degradação térmica acelerada, nas condições utilizadas, não permitiu inferências a respeito da estabilidade do macerado otimizado.
- O macerado hidroalcoólico não mostrou toxicidade, nas condições experimentais utilizadas, mesmo após ter sido submetido à degradação térmica por até 32 dias, à temperatura de 60°C.

## 6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKADA, Y.; KAWANO, S.; YAMAGISHI, M. High-speed liquid chromatographic analysis of drugs. XIII. Determination of daidzin in *Puerariae radix*. *Yakugaku Zasshi*, 100(10): 1057-60, 1980.
- AKISUE, M.K. Análise do óleo essencial da *Achyrocline satureioides* DC. Compositae. *Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo*, 9(1): 107-14, 1971.
- AMAT, A.G. Taxones de compuestas bonaerenses críticos para la investigación farmacológica. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, 2(1): 23-36, 1983.
- ANDERSEN, A.A. & BERRY, J.A. Effect of flavonols on *Clostridium botulinum*. *Science*, 106: 644-5, 1947.
- ARAÚJO, A.M. *Medicina Rústica*. 3.ed. São Paulo, Nacional, 1979. p.151.
- ARRIGONI-MARTELLI, E. *Inflammation and Antiinflammatories*. New York, Spectrum, 1977. p.114.
- BAKER, J.G. Compositae. In: MARTIUS, C.F.P. von, ed. *Flora Brasiliensis; enumeratio plantarum*. Monaco, R. Oldenburg, 1840-1906. reimpr.: Weinheim, J. Cramer, 1967. v.6, pt.3, p.115-7.
- BANKOVA, V.S.; POPOV, S.S.; MAREKOV, N.L. High-performance liquid chromatographic analysis of flavonoids from propolis. *Journal of Chromatography*, 242: 135-43, 1982.
- BAUER, L.; SILVA, G.A. de A.B. e; SIQUEIRA, N.C.S. de; BACHA, C.T.M.; SANT'ANA, B.M.S. Contribuição à análise dos óleos essenciais de *Eupatorium ligulifolium* H.A. e *Achyrocline satureioides* D.C. do Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira de Farmácia*, 60(7/9): 97-100, 1979.
- BAUER, R. & WAGNER, H. Cucurbitacinhalte Drogen. *Deutsche Apotheker Zeitung*, 123(27): 1313-21, 1983.
- BERNHARD, H. Neuere Aspekte der Arzneipflanzenextraktion. *Schweizerische Apotheker Zeitung*, 118(22): 555-7, 1980.

- BJELDANES, L.F. & CHANG, G.W. Mutagenic activity of quercetin and related compounds. *Science*, 197: 577-8, 1977.
- 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.
- BÖHME, H. & HARTKE, K. *Deutsches Arzneibuch - 8. Ausgabe 1978 - Kommentar*. Stuttgart, Wissenschaftliche, 1981a. p.43-105.
- BRASIL. Ministério da Saúde. *Boas Práticas de Fabricação de Produtos Farmacêuticos*. Brasília, Centro de Documentação, 1982.
- BRASIL. Ministério da Previdência e Assistência Social. CEME. *Relatório de Atividades - 1985*. Brasília, 1985. 12p.
- BRITISH Pharmacopoeia. 13.ed. London, Her Magesty's Stationery Office, 1980. v.2, p.108-11.
- BROWN, J.P. & DIETRICH, P.S. Mutagenicity of plant flavonols in the *Salmonella*/mammalian microsome test. Activation of flavonol glycosides by mixed glycosidases from rat cecal bacteria and other sources. *Mutation Research*, 66: 223-40, 1979.
- BURKART, A. *Flora Ilustrada de Entre Rios (Argentina) - Dicotyledoneas, Metaclamídeas (Gamopétalas), B: Rubiales, Cucurbitales, Campanulales (Incluso Compuestas)*. Buenos Aires, INTA, 1974. v.6, p.314-5.
- CABRERA, A.L. *Flora de la Provincia de Buenos Aires. Compuestas*. Buenos Aires, INTA, 1963. pt.6, p.153-5.
- CABRERA, A.L. *Compositae*. In: BURKART, A. *Flora Ilustrada de Entre Rios*. Buenos Aires, INTA, 1974. t.6, pt.6, p.106-538.
- CABRERA, A.L. *Compositae*. In: CABRERA, A.L. *Flora de la Provincia de Jujuy - Republica Argentina*. Buenos Aires, INTA, 1978. v.13, pt.10.
- CARVALHO, A.R. *A Cura pelas Plantas*. 3.ed. São Paulo, Masucci, 1972. p.254.
- CARVALHO, L.S. *Formulação farmacêutica e biodisponibilidade*. III. Influência dos "excipientes". *Revista Portuguesa de Farmácia*, 29(2): 237-72, 1979.
- CARVER, J.H.; CARRANO, A.V.; MacGREGOR, J.T. Genetic effects of the flavonols quercetin, kaempferol, and galangin on chinese hamster ovary cells in vitro. *Mutation Research*, 113: 45-60, 1983.



- CEA, G.F.A.; ETCHEBERRY, K.F.C.; DULOUT, F.N. Induction of micronuclei in mouse bone-marrow cells by the flavonoid 5, 3', 4'-trihydroxy - 3, 6, 7, 8-tetramethoxyflavone (THTMF). *Mutation Research*, 119: 339-42, 1983.
- CHIRIANI, C.H.B. *La Vuelta de los Vegetales - tratado moderno de fitoterapia*. 6. ed. Buenos Aires, Hachette, 1974. p.159, 234.
- CLAUS, E.P. & TYLER, V.E. General introduction. In: \_\_\_\_\_. *Pharmacognosy*. 5. ed. Philadelphia, Lea & Febiger, 1965. cap. 1.
- DÄRR, A. *Elementos de Tecnología Farmaceutica*. Zaragoza, Acribia, 1979.
- D'AVILA, M.C. *Da flora medicinal do Rio Grande do Sul*. Porto Alegre, Faculdade de Medicina e Pharmacia de Porto Alegre, 1910. These, p.139-40.
- DEUTSCHER Arzneimittel - Codex. 1979. Frankfurt, Govi, 1979. Codex-Probe 12. v.1, t.1, p.14.
- DEUTSCHER Arzneimittel - Codex. 1979. Frankfurt, Govi, 1979a. Holunderblüten. v.2. Ergaenzung, 81. pag. irreg.
- DIMITRI, M.J., ed. *Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardineria*. 3. ed. Buenos Aires, ACME, 1980. v.2, t.1, p.1040.
- EGGER, K. Hydrophilic plant constituents and their derivatives. I. Plant phenol derivatives. In: STAHL, E., ed. *Thin - Layer Chromatography*. 2. ed. Berlin, Springer, 1969. p.692-4.
- ELLIGER, C.A.; HENIKA, P.R.; MacGREGOR, J.T. Mutagenicity of flavones, chromones and acetophenones in *Salmonella tiphimurium*. New structure-activity relationships. *Mutation Research*, 135: 77-86, 1984.
- EUROPEAN Pharmacopoeia. Saint-Ruffine, Maisonneuve, 1969. v.1.
- FARIAS, M.R.; SCHENKEL, E.P.; BERGOLD, A.M.; PETROVICK, P.R. O problema da qualidade de fitoterápicos. *Caderno de Farmácia*, 1(2): 73-82, 1985.
- FARIAS, M.R. *Análise de cucurbitacinas em espécies de Cucurbitaceae conhecidas popularmente como taiuiã*. Porto Alegre, Curso de Pós-Graduação em Farmácia / UFRGS, 1986. 299f. Dissertação de Mestrado.
- FARMACOPÉIA Brasileira. 3. ed. São Paulo, Andrei, 1977. p.934.
- FARMACOPÉIA Brasileira. 3. ed. São Paulo, Andrei, 1977a. p.939-42.

- FARMACOPÉIA Brasileira. 3. ed. São Paulo, Andrei, 1977b. p.793-847.
- FARNSWORTH, N.R.; AKERELE, O.; BINGEL, A.S.; SOEJARTO, D.D.; GUO, Z. Medicinal plants in therapy. *Bulletin of the World Health Organization*, 63(6): 965-81, 1985.
- FERRARO, G.E.; NORBEDO, C.; COUSSIO, J.D. Polyphenols from *Achyrocline satureioides*. *Phytochemistry*, 20(8): 2053-4, 1981.
- FREIDEN, K. Arzneimittel-nach dem Gesetz alle gleich? In: HANKE, G., ed. *Qualitaet pflanzlicher Arzneimittel*. Stuttgart, Wissenschaftliche, 1984. p.31-4.
- FROHNE, D. Qualitative und quantitative analytische Bestimmungsmethoden der Monodrogen. In: HANKE, G. *Qualitaet pflanzlicher Arzneimittel*. Stuttgart, Wissenschaftliche, 1984. p.101-14.
- FUNDAÇÃO NACIONAL DO ÍNDIO. *Levantamento de Ervas Mediciniais Utilizadas pelos Kaingãng*. Curiosidades Culturais - Semana do Índio. Porto Alegre, 1982.
- GIANGUALANI, R.N. Las especies argentinas del género *Achyrocline* (Compositae). *Darwiniana*, 20: 549-76, 1976.
- GOLDFRANK, L.; LEWIN, N.; FLOMENBAUM, N.; HOWLAND, M.A. The pernicious panacea: herbal medicine. *Hospital Physician*, 18: 64-87, Oct. 1982.
- GONZALES, M. & LOMBARDO, A. Historiando las marcelas. *Revista Farmaceutica*, 85(10): 485-8, 1943.
- GONZALES, M. & LOMBARDO, A. Anotaciones de fitoterapia vernacula del Uruguay. *Revista Farmaceutica*, 88(7): 298-309, 1946.
- GRACZA, L. Zur Standardisierung und Haltbarkeit Cumarin-Haltiger Tinkturen. *Deutsche Apotheker Zeitung*, 117(45): 1865-8, 1977.
- GRACZA, L. Bestimmung von Phenylpropanderivaten in Arzneistoffen und Arzneizubereitung durch HPLC. *Deutsche Apotheker Zeitung*, 120(40): 1859-63, 1980.
- GROTTA, A.S. Contribuição ao estudo morfológico e anatômico de *Achyrocline satureioides* D.C. *Anais da Faculdade de Farmácia e Odontologia da Universidade de São Paulo*, 17: 1-16, 1960.
- GUTKIND, G.O.; MARTINO, V.; GRAÑA, N.; COUSSIO, J.D.; TORRES, R.A. de. Screening of South American plants for biological activities. 1. Antibacterial and antifungal activity. *Fitoterapia*, 5: 213-8, 1981.
- HAGER, J. & SEIDEL, J. Verarbeitung von Arzneipflanzen - Von der Arzneidroge zur Tee - Arznei. *Erfahrungsheilkunde*, 28: 26, 1979.

- HALBACH, G. Grenzen der Analytik pflanzlicher Arzneibereitung. *Deutsche Apotheker Zeitung*, 123(14): 668-71, 1983.
- HÄNSEL, R. & OHLENDORF, D. Ein neues im Ring  $\beta$  unsubstituiertes Flavon aus *Achyrocline satureioides*. *Archiv der Pharmazie*, 304(12): 893-6, 1971.
- HARBORNE, J.B. The chromatography of the flavonoid pigments. *Journal of Chromatography*, 2: 581-604, 1959.
- HARDIGREE, A.A. & EPLER, J.L. *Mutation Research*, 58: 231-9, 1978. Apud SCHIMMER, O. Flavonoide: Ihre Rolle als biologisch aktive Naturstoffe. *Deutsche Apotheker Zeitung*, 126(35): 1811-6, 1986.
- HEFENDEHL, F.W. & LANDER, C. Qualitaetssicherung pflanzlicher Arzneimittel-Anforderungen bei der Zulassung. In: HANKE, G., ed. *Qualitaet pflanzlicher Arzneimittel*. Stuttgart, Wissenschaftliche, 1984. p.35-56.
- HEGNAUER, R. *Chemotaxonomie der Pflanzen*. Stuttgart, Birkhaeuser, 1969. v.3, p.653.
- HELMAN, J. *Farmacotecnia Teorica y Practica*. 3. ed. México, Continental, 1982. v.1.
- HERBS hazardous to your health. *American Pharmacy*, NS 24 (3): 20-1, 1984.
- HIRSCHMANN, G.S. The constituents of *Achyrocline satureioides* DC. *Revista Latinoamericana de Quimica*, 15(3): 134-5, 1984.
- HÖHNE, P.C. *Plantas e Substâncias Vegetais Tóxicas e Medicinais*. São Paulo, Graphicars, 1939. p.306.
- HÖRHAMMER, L.; WAGNER, H.; HEIN, K. *Journal of Chromatography*, 13: 235, 1964. Apud MACEK, K., ed. *Pharmaceutical Applications of Thin-layer and Paper Chromathography*. 3. ed. Amsterdam, Elsevier, 1972.
- KALOGA, M.; HÄNSEL, R.; CYBULSKI, E.-M. Isolierung eines Kawapyrons aus *Achyrocline satureioides*. *Planta Medica*, 48: 103-4, 1983.
- KINGSTON, D.G.I. High performance liquid chromatography of natural products. *Journal of Natural Products*, 42(3): 237-60, 1978.
- KÖSTER, J.; STRACK, D.; BARZ, W. High performance liquid chromatographic separation of isoflavones and structural elucidation of isoflavone 7-O-glucoside 6"-malonates from *Cicer arietinum*. *Planta Medica*, 48: 131-5, Jul. 1983.
- LANGELOH, A. & SCHENKEL, E. Atividade anti-espasmódica em extra to hidro-alcoóico de marcela. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FARMACOLOGIA E TERAPEUTICA EXPERIMENTAL, 1, Pirassununga, 3-6 jul. 1982. Resumos... Pirassununga, CIZIP, 1982. p.135.

- LANGELOH, A. & SCHENKEL, E. Efeito antagonista do extrato de marcela (*Achyrocline satureioides*) sobre as contrações produzidas por acetilcolina, histamina e cloreto de bário na musculatura intestinal. In: ENCONTRO ANUAL DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS, 11, Rio Grande, 4-6 nov. 1982. Resumos... Rio Grande, FURG, 1982a. p.40.
- LARKIN, T. Herbs are often more toxic than magical. *FDA Consumer*: 5-10, Oct. 1983.
- LE QUESNE, P.W.; PASTORE, M.P.; RAFFAUF, R.F. The cytotoxic flavonoids of *Lychnophora affinis*. *Lloydia*, 39(6): 391-4, 1976.
- LIFCHITZ, A. *Plantas Medicinales; guia práctico de botánica medicinal*. 5. ed. Buenos Aires, Kier, 1981. p.139.
- LIMA, C. *Contribuição ao estudo das Metaclamídeas medicinais de Ouro Preto*. Ouro Preto, Mineira, 1941. p.112-3.
- LIST, P.H.; SCHMID, W.; WEIL, E. Reinsubstanz oder galenische Zubereitung? *Arzneimittel-Forschung/Drug Research*, 19(2): 181-5, 1969.
- LIST, P.H. & SCHMIDT, P.C. *Technologie pflanzlicher Arzneibereitung*. Stuttgart, Wissenschaftliche, 1984.
- LOMBARDO, A. *Flora Montevidensis*. Tomo 2. Gamopétalas. Montevideo. Intendencia Municipal, 1983.
- MABRY, T.J.; MARKHAM, K.R.; THOMAS, M.B. The two-dimensional paper chromatographic analysis of flavonoids. In: \_\_\_\_\_. *The Systematic Identification of Flavonoids*. Berlin, Springer, 1970. pt.1, cap.1, p.14.
- MABRY, T.J.; MARKHAM, K.R.; THOMAS, M.B. The separation of flavonoids by column and thin layer chromatography. In: \_\_\_\_\_. *The Systematic Identification of Flavonoids*. Berlin, Springer, 1970a. pt.1, cap.2, p.22.
- MacDONALD, I.A.; MADER, J.A.; BUSSARD, R.G. The role of rutin and quercitrin in stimulating flavonol glycosidase activity by cultured cell-free microbial preparations of human feces and saliva. *Mutation Research*, 122: 95-102, 1983.
- MacGREGOR, J.T. Mutagenicity studies of flavonoids *in vivo* and *in vitro*. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 48: A47, 1979.
- MacGREGOR, J.T.; WEHR, C.M.; MANNERS, G.D.; JURD, L.; MINKLER, J.L.; CARRANO, A.V. *In vivo* exposure to plant flavonols. Influence on frequencies of micronuclei in mouse erythrocytes and sister-chromatid exchange in rabbit lymphocytes. *Mutation Research*, 124: 255-70, 1983.

- MacGREGOR, J.T. & JURD, L. *Mutation Research*, 54: 297-309, 1978.  
Apud SCHIMMER, O. Flavonoide: Ihre Rolle als biologisch aktive Naturstoffe. *Deutsche Apotheker Zeitung*, 126(35): 1811-6, 1986.
- MADER, J.A. & MacDONALD, I.A. Effect of bile acids on formation of the mutagen, quercetin, from two flavonol glycoside precursors by human gut bacterial preparations. *Mutation Research*, 155: 99-104, 1985.
- MANFRED, L. *7000 Recetas Botánicas*. Buenos Aires, s.ed., 1958. p.384.
- MARKHAM, K.R. Isolation techniques for flavonoids. In: HARBORNE, J.B.; MABRY, T.J.; MABRY, H. *The Flavonoids*. New York, Academic, 1975. v.1, cap.1, p.1-44.
- MAZAKI, M.; ISHII, T.; UYETA, M. Mutagenicity of hydrolysates of citrus fruit juices. *Mutation Research*, 101: 283-91, 1982.
- MEERE, J. Nevenwerkingen van medicinale planten. *Farmaceutisch Tijdschrift voor België*, 60(1): 5-10, 1983.
- MEIER-BRATSCHI, B. & MEIER-BRATSCHI, A. Wo Arzneipflanzen geerntet werden. *Schweizerische Apotheker-Zeitung*, 117:529, 1979.
- MELTZ, M.L. & MacGREGOR, J.T. Activity of the plant flavonol quercetin in the mouse lymphoma L5178Y TK<sup>+</sup>/<sup>-</sup> mutation, DNA single-strand break, and Balb/c 3T3 chemical transformation assays. *Mutation Research*, 88: 317-24, 1981.
- MENSSEN, H.G. Standardisierung und Zubereitungsformen von Phytopharmaka. *Pharmazeutische Zeitung*, 124(6): 233-6, 1979.
- MENSSEN, H.G. Standardisierung von Phytopharmaka. *Deutsche Apotheker Zeitung*, 121(24): 1255-9, 1981.
- MENSSEN, H.G. Arzneipflanzenstandardisierung am Beispiel der Sennespflanzen *Cassia angustifolia* und *Cassia acutifolia*. *Deutsche Apotheker Zeitung*, 122(45): 2317-20, 1982.
- MEYER, V. *Praxis der Hochleistungs-Fluessigchromatographie*. Frankfurt, Diesterweg, 1979. p.17-8.
- MEYER, V. *Praxis der Hochleistungs-Fluessigchromatographie*. Frankfurt, Diesterweg, 1979a. p.25-6.
- MOLINA, N.A. *A Cura pelas Ervas Mediciniais*. Rio de Janeiro, Espiritualista, 1981. p.96.
- MOTA, T.M.B. *Substâncias antibióticas em vegetais superiores*. Santa Maria, Faculdade de Farmácia, 1963. 60f. Tese de Livre-Docência.

- MOTTA, V.E.P.; VARGAS, V.M.F.; NOSHANG, A.B.; ALICE, C.B.; HENRIQUES, J.A.P. Determinação da atividade mutagênica em espécies de vegetais utilizados na medicina popular. *Ciência e Cultura*, 38(7): 933, 1986. Suplemento.
- MOTTA, V.E.P.; VARGAS, V.M.F.; HENRIQUES, J.A.P. Determinação da atividade mutagênica em espécies de vegetais utilizados na medicina popular. Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências, UFRGS, 1987. Comunicação pessoal.
- MUESI, I. & PRAGAI, B.M. *Experientia*, 41: 930-1, 1985. Apud SCHIMMER, O. Flavonoide: Ihre Rolle als biologisch aktive Naturstoffe. *Deutsche Apotheker Zeitung*, 126(35): 1811-6, 1986.
- MÜNDEL, K.; BÜCHI, J.; SCHULTZ, O.-E. *Galenisches Praktikum*. Stuttgart, Wissenschaftliche, 1959. p.122-3.
- NAGAHSKI, J.; COPLEY, M.J.; COUCH, J.F. The antibacterial action of flavonols. *Journal of Bacteriology*, 54: 34, 1947.
- NAGAO, M.; TAKAHASHI, Y.; YAMANAKA, H.; SUGIMURA, T. Mutagens in coffee and tea. *Mutation Research*, 68: 101-6, 1979.
- NAGAO, M.; MORITA, N.; YAHAGI, T.; SHIMIZU, M.; KUROYANAGI, M.; FUKUOKA, M.; YOSHIHARA, K.; NATORI, S.; FUJINO, T.; SUGIMURA, T. Mutagenicities of 61 flavonoids and 11 related compounds. *Environmental Mutagenesis*, 3: 401-19, 1981.
- NISHINO, H.; IWASHIMA, A.; FUJIKI, H.; SUGIMURA, T. *Gann*, 75: 113-6, 1984. Apud SCHIMMER, O. Flavonoide: Ihre Rolle als biologisch aktive Naturstoffe. *Deutsche Apotheker Zeitung*, 126(35): 1811-6, 1986.
- OGAWA, S.; HIRAYAMA, T.; NOHARA, M.; TOKUDA, M.; HIRAI, K.; FUKUI, S. The effect of quercetin on the mutagenicity of 2-acetylaminofluorene and benzo[a]pyrene in *Salmonella typhimurium* strains. *Mutation Research*, 142: 103-7, 1985.
- ORTH, P.C. *A Flora Medicinal do Herbário Anchieta na Exposição Farrroupilha*. Porto Alegre, Globo, 1937. p.53-4.
- PAMUKCU, J.; HATCHER, J.; TAGUCHI, J.; BRYAN, G.T. Quercetin: an intestinal and bladder carcinogen present in bracken fern (BF). *Proceedings of the American Association for Cancer Research and the American Society of Clinical Oncology*, 21: 94, 1980.
- PARK, G.L.; AVERY, S.M.; BYERS, J.L.; NELSON, D.B. Identification of bioflavonoids from citrus. *Food Technology*: 98-105, Dec. 1983.
- PAVETTI, C.; BASUALDO, I.; ORTIZ, M. Plantas nativas de uso en medicina popular en el Paraguay. (Parte I). In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 7, Belo Horizonte, 1-3 set. 1982. Resumos... Belo Horizonte, UFMG, 1982. p.87.

- PENSO, G. Problemi relativi all'uso delle piante medicinali nel mondo. *Bollettino Chimico Farmaceutico*, 116(9): 506-19, 1977.
- PENSO, G. The role of WHO in the selection and characterization of medicinal plants (vegetable drugs). *Journal of Ethnopharmacology*, 2:133-8, 1980.
- PHARMACOPÉIA dos Estados Unidos do Brasil. São Paulo, Nacional, 1926. p.567-8.
- PHILLIPSON, J.D. Physical methods of analysis - a phytochemist's view. *The Pharmaceutical Journal*, 232(6261): 69-72, 1984.
- RIBÉREAU-GAYON, P. *Les Composés Phénoliques des Végétaux*. Paris, Dunod, 1968.
- RICCIARDI, A.I.A.; CASSANO, A.E.; BURGOS, J.L. Volatile essential oils of the Argentina seacost. *Revista de la Facultad de Ingeniería Química. Universidad Nacional del Litoral*, 36: 27, 1961.
- ROBERT, G.; WAGINAIRE, L.; VIORNERY, M. Bonnes pratiques de fabrication des extraits végétaux. *Labo-Pharma Problemes et Techniques*, (288): 253-5, 1979.
- ROBERT, G. Les extraits vegetaux destine a la cosmetique. *Erde International*, 1: 118-31, 1983.
- ROSA, Z.M. Compostas medicinais. *Natureza em Revista*, 2: 32-7, 1977.
- 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.
- SAHU, R.K.; BASU, R.; SHARMA, A. Genetic toxicological testing of some plant flavonoids by the micronucleus test. *Mutation Research*, 89: 69-74, 1981.
- SCHAPOVAL, E.E.S. (Comissão Permanente de Revisão da Farmacopéia Brasileira. 4.ed.). Comunicação pessoal, 1987.
- SCHENKEL, E.P.; SIMÕES, C.M.O.; MENGUE, S.S.; MENTZ, L.A.; IRGANG, B.; STEHMANN, J.R. O espaço das plantas medicinais e suas formas derivadas na medicina científica. *Caderno de Farmácia*, 1(2): 65-72, 1985.
- SCHIMMER, O. Flavonoide: Ihre Rolle als biologisch aktive Naturstoffe. *Deutsche Apotheker Zeitung*, 126(35): 1811-6, 1986.
- SCHMITZ, S. *A Cura pelo Chã*. Porto Alegre, Escola Superior de Teologia São Lourenço de Brindes, 1981. p.15.
- SCHNIEDERS, B. & WOLFF, U. Welche Qualitaet ist notwendig und wuensenswert? *Acta Pharmaceutica Technologica*: 155-62, 1976. Supplement 2.

- SEIKEL, M.K. Chromatographic methods of separation, isolation and identification of flavonoid compounds. In: GEISSMAN, T. A., ed. *The Chemistry of Flavonoid Compounds*. Oxford, Pergamon, 1962. cap.3, p.34-69.
- SHIBATA, S.; HARADA, M.; BUDIDARMO, W. Constituents of Japanese and Chinese drugs. Antiespasmotic action of flavonoids and antraquinones. *Yakugaku Zasshi*, 80: 620-4, 1960.
- SIEGFRIED, B. *Die Extrakte und Tinkturen der Pharmacopoea Helvetica VI*. Zofingen, Siegfried, 1971.
- SIMÕES, C.M.O. *Investigação químico-farmacológica de Achyrocline satureioides (Lam.) DC., Compositae (marcela)*. Porto Alegre, Curso de Pós-Graduação em Farmácia, UFRGS, 1984. 186f. Dissertação de Mestrado.
- SIMÕES, C.M.O.; RECH, N.; LAPA, A.J. *Investigação farmacológica do extrato aquoso de folhas/caule de Achyrocline satureioides (Lam.) D.C., Compositae (marcela)*. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 8, Manaus, 4-6 set. 1984. Resumos ... Manaus, INTA, 1984. p.45.
- SIMÕES, C.M.O. & RECH, N. Evaluation of antiinflammatory activity of extracts of *Achyrocline satureioides (Lam.) DC., Compositae (Marcela)* after topical application. In: SIMPÓSIO FRANCO BRASILEIRO DE QUÍMICA E FARMACOLOGIA DE SUBSTÂNCIAS NATURAIS: EM INFLAMAÇÃO, ALERGIA E TROMBOSE, Rio de Janeiro, 16-29 nov. 1986. Resumos... p.8.
- SIMÕES, C.M.O.; MENTZ, L.A.; SCHENKEL, E.P.; IRGANG, B.E.; STEHMANN, J.R. *Plantas da Medicina Popular do Rio Grande do Sul*. Porto Alegre, Ed. da Universidade, UFRGS, 1986. p.108-9.
- SORATA, Y.; TAKAHAMA, U.; KIMURA, M. *Biochimica et Biophysica Acta*, 799: 313-7, 1984. Apud SCHIMMER, O. Flavonoide: Ihre Rolle als biologisch aktive Naturstoffe. *Deutsche Apotheker Zeitung*, 126(35): 1811-6, 1986.
- SRIVASTAVA, V.K. & KISHORE, K. *Introduction to Chromatography - theory and practice*. New Delhi, S. Chand, 1985. p.21-2.
- STAHL, E. & SCHILD, W. *Drogenanalyse II: Inhaltsstoffe und Isolierungen*. Stuttgart, Gustav Fischer, 1981. p.118.
- STEINIGEN, M. *Analytik der pflanzlichen Arzneimittel*. In: HANKE, G., ed. *Qualitaet pflanzlicher Arzneimittel*. Stuttgart, Wissenschaftliche, 1984. p.115-25.
- STELLMACH, B. *Herstellung und Standardisierung von Pflanzenextrakten*. *Chemische Industrie*, 32: 165-70, 1980.



- STRACK, O. & KRAUSE, J. Reversed-phase high-performance liquid chromatographic separation of naturally occurring mixtures of flavone derivatives. *Journal of Chromatography*, 166: 359-61, Feb. 1978.
- SUGIMURA, T.; NAGAO, M.; MATSUSHIMA, T.; YAHAGI, T.; SEINO, Y.; SHIRAI, A.; SAWAMURA, M.; NATORI, S.; YOSHIHIRA, K.; FUKUOKA, M.; KUROYANAGI, M. Mutagenicity of flavone derivatives. *Proceedings of the Japan Academy*, 53: 194-7, 1977.
- SWAIN, T. Flavonoids. In: GOODWIN, T.W., ed. *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*. 2.ed. London, Academic, 1976. p.177-8.
- TAKAHAMA, U. *Phytochemistry*, 24: 1443-6, 1985. Apud SCHIMMER, O. Flavonoide: Ihre Rolle als biologisch aktive Naturstoffe. *Deutsche Apotheker Zeitung*, 126(35): 1811-6, 1986.
- TAKAHASHI, Y.; NAGAO, M.; FUJINO, T.; YAMAIZUMI, Z.; SUGIMURA, T. Mutagens in japanese pickle identified as flavonoids. *Mutation Research*, 68: 117-23, 1979.
- ULUBELEN, A. & OKSUZ, S. Cytotoxic flavones from *Centaurea urvillei*. *Lloydia*, 45(3): 373, 1982.
- UYETA, M.; TAUE, S.; MAZAKI, M. Mutagenicity of hydrolysates of tea infusions. *Mutation Research*, 88: 233-40, 1981.
- VAN DEN BERG, M.E. Contribuição à flora medicinal do estado do Mato Grosso. *Ciência e Cultura*, 33:163-70, 1980. Suplemento.
- VAN OS, F.H.L. Le dosage de l'huile essentielle dans les drogues vegetales. *Pharmaceutisch Weekblad*, 100: 377, 1965.
- VAN OS, F.H.L. Standaardisatie van plantaardige geneesmiddelen. *Farmaceutisch Tijdschrift voor België*, 57: 5-24, 1980.
- VOGEL, G. Quo vadis, Pharmacologia? *Deutsche Apotheker Zeitung*, 118(20): 719-23, 1978.
- VOGEL, G. Besonderheiten pflanzlicher Arzneimittel-Mythos oder Wirklichkeit? *Deutsche Apotheker Zeitung*, 119(50): 2029-33, 1979.
- VOGEL, G. Pflanzliche Arzneimittel aus medizinischer und pharmakologischer Sicht. In: HANKE, G. *Qualitaet pflanzlicher Arzneimittel*. Stuttgart, Wissenschaftliche, 1984. p.19-30.
- VOIGT, H.R. & BORNSCHEIN, M. Medicamentos obtenidos por extracción de drogas. In: \_\_\_\_\_. *Tratado de Tecnología Farmaceutica*. Zaragoza, Acribia, 1982. cap.22, p.485-513.

- WAGNER, H.; PROKSCH, A.; RIESS-MAURER, I.; VOLLMAR, A.; ODENTHAL, S.; STUPPNER, H.; JURCIC, K.; LE TURDU, M.; HEUR, Y.H. Immunstimulierend wirkende Polysaccharide (Heteroglikane) aus hoeheren Pflanzen. *Arzneimittel-Forschung/Drug Research*, 34(6): 659-61, 1984.
- WINDER, C.V.; WAX, J.; BEEN, M.A. Rapid foot volume measurements on unanesthetized rats, and the question of a phenylbutazone effect on anaphylactoid edema. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie*, 112: 174-87, 1957.
- WINTER, C.A.; RISLEY, E.A.; NUSS, G.W. Carrageenin-induced oedema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 111: 544-7, 1962.
- 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.