

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Padronização de extrato aquoso e desenvolvimento de  
produto seco por aspensão de  
*Phyllanthus niruri* L. - Euphorbiaceae (Quebra-Pedra)**

Luiz Alberto Lira Soares

Porto Alegre, 1997

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Padronização de extrato aquoso e desenvolvimento de  
produto seco por aspersão de  
*Phyllanthus niruri* L. - Euphorbiaceae (Quebra-Pedra)**

Dissertação apresentada por **Luiz  
Alberto Lira Soares** para obtenção do  
grau de mestre em Ciências  
Farmacêuticas

Prof. Dr. Pedro Ros Petrovick  
Orientador

Porto Alegre, 1997

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 31 de outubro de 1997, perante comissão examinadora constituída por:

Prof. Dr. Haroudo Sátiro Xavier

Universidade Federal de Pernambuco - Recife - PE

Profa. Dra. Valquíria Linck Bassani

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. George González Ortega

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Pedro Ros Petrovick (Orientador)

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

S676p Soares, Luiz Alberto Lira

Padronização de extrato aquoso e desenvolvimento de produto seco por aspersão de *Phyllanthus niruri* L. - Euphorbiaceae (quebra-pedra) / Luiz Alberto Lira Soares - Porto Alegre: UFRGS, 1997. - 94p.: il., graf., tab.

Dissertação (mestrado). UFRGS. Faculdade de Farmácia.

1. Tecnologia Farmacêutica. 2. *Phyllanthus niruri*: Extratos aquosos. 3. Quebra-pedra: Extratos aquosos. 4. Flavonóides. 5. Fitoterápicos: Controle de qualidade. I. Petrovick, Pedro Ros. II. Título.

CDU: 615.451.1

Bibliotecárias responsáveis

Heloísa do Canto Canabarro, CRB 10/1036

Cláudia da Silva Gonçalves CRB 10/1012

**“À**

***Roseli, Matheus, Maria Dulce, Alberto, Edla  
e Concórdia”***

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Professor Dr. Pedro Ros Petrovick pela orientação, compreensão e por seu exemplo de dedicação e de postura profissional.

Ao Prof. Dr. Haroudo Sátiro Xavier, orientador de iniciação científica durante a graduação na UFPE, pelo incentivo no início e no transcorrer desta vida acadêmica, bem como pela amizade e confiança depositadas.

Aos Professores do Laboratório de Desenvolvimento Galênico, Professores Dr. George González Ortega e Dra. Valquíria Linck Bassani, pela amizade, atenção, apoio e contribuições tanto para o meu crescimento profissional quanto pessoal.

Ao Engenheiro Agrônomo Ileo Montanari Jr. do CPQBA/UNICAMP e ao Prof. Dr. José Abreu Matos pelo fornecimento das matérias-primas estudadas.

Aos funcionários da Faculdade de Farmácia da UFRGS, especialmente a Alice Brenner, Leila Brasil, Maribete, Marisa Gaspar, Marco Antônio e Marcos Sobral, pela disponibilidade e amizade.

Às colegas de turma de mestrado Sílvia Lopes e Edna Sayury pela convivência e companheirismo.

De forma especial a Edison e Kellen, pelo estímulo, confiança, apoio, convívio e amizade.

Aos companheiros do Laboratório de Desenvolvimento Galênico, Ana Aboy, Ana Guedes, Ana Lúcia, Angela, Daniele, Edyane, Elsa, Eugênio, Graziela, Helder, Istefani, Márcia, Rafael, Raquel, Tatiane, Wellington, pela amizade e convivência.

Aos meus pais e irmãs pela compreensão, oportunidade, amor, confiança e apoio incondicional também neste momento.

## RESUMO

Constituiu objetivo deste trabalho o desenvolvimento tecnológico de formas farmacêuticas obtidas a partir de *Phyllanthus niruri* L. (Euphorbiaceae), incluso no Projeto de Pesquisa de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos. Para tanto, foram desenvolvidas metodologias analíticas capazes de avaliar a qualidade da matéria-prima, das ações de transformação, dos produtos intermediários e do produto final. Estudaram-se técnicas de preparação de soluções extrativas e de produto seco por aspersão. O estudo da metodologia adaptada para quantificação de flavonóides na matéria-prima, demonstrou desvio da linearidade de resposta com o aumento da massa da amostra, limitando o seu emprego às condições fixadas neste trabalho. O teor de flavonóides totais do material vegetal foi de 0,80 g % (m/m). A solução extrativa empregada no desenvolvimento do produto seco foi selecionada através da realização do planejamento fatorial  $2^3$ , onde foram avaliados os fatores: método de extração (decoção e infusão), relação droga solvente (2,5 e 7,5:100) e tempo de extração (5 e 15 min), utilizando como parâmetro de decisão o teor de flavonóides totais. A solução extrativa selecionada foi obtida através de decoção durante 15 minutos das partes aéreas moídas na proporção 7,5:100 (m/V). O emprego da mesma metodologia quantitativa aplicada à matéria-prima e ao produto intermediário mostrou a existência de erro sistemático proporcional com o aumento da concentração das amostras. Entretanto, alcançou-se comportamento linear, com ausência de erros sistemáticos, empregando-se amostras de menor concentração. O produto seco por aspersão foi obtido em torre de secagem, a partir da solução extrativa selecionada, adicionada de dióxido de silício coloidal a 30 % do resíduo seco. Tanto a operação de secagem quanto a adição de dióxido de silício coloidal não causaram interferência nas análises qualitativas e quantitativas, obtendo-se uma taxa de recuperação, calculado como flavonóides totais, de 99%.

**Palavras-chave:** *Phyllanthus niruri*, quebra-pedra, produto seco por aspersão, flavonóides, controle de qualidade, fitoterápico.

## ABSTRACT

*Phyllanthus niruri* L. is a medicinal plant used in Brazil mainly against genitourinary disorders. Despite of its wide use in the folk medicine and in the pharmaceutical industry no attempts were done to provide technological knowledge in order to obtain pharmaceutical dosage forms with adequate and constant quality. The governmental program on medicinal, managed by the Brazilian Drug Agency CEME, developed pharmacological, chemical and botanical studies for this plant in a feasible dosage form, the technological development spray-dried product starting from *Phyllanthus niruri* was the aim of this work. For such purpose quality control and production methods for the plant raw material, aqueous extracts and spray-dried product were proposed and studied. The total flavonoid assay method for the plant raw material showed a lack of linearity at extremes high and low concentration, but, however, linear at the middle values. The extractive solution was selected through a  $2^3$  factorial design, considering the extraction method (decoction and infusion), plant to solvent proportion (2.5 and 7.5:100 w/v) and extraction time (5 and 15 minutes). The total flavonoids content was employed as decision parameter. The chose extractive solution was obtained by 15 min decoction of a plant to solvent ratio of 7.5 :100 (w/v). The assay method was not influenced by the amount of the plant used in the extract, but by the aliquot size. The spray dried product was prepared using colloidal silicon dioxide as drying excipient. The spray drying process and the excipient did not interfere on the qualitative and quantitative profile of the product. The total flavonoid recovery was around 99 % (w/w). The final product showed a low residual humidity content, but limited stability when exposed to high moisture atmospheres.

**Keywords:** *Phyllanthus niruri*, spray drying, herbal drug, flavonoids assay, quality control.

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	18
<b>3. MATERIAIS</b> .....	19
3.1. Material Vegetal.....	19
3.2. Adjuvante.....	19
3.3. Reagentes, soluções, substâncias-referências e outras matérias-primas.....	19
3.4. Aparelhos e equipamentos.....	20
<b>4. METODOLOGIA</b> .....	22
4.1. Material vegetal.....	22
4.1.1. Caracterização química.....	22
4.1.2. Determinação da perda por dessecação.....	25
4.1.3. Determinação do teor de extrativos.....	26
4.1.4. Análise granulométria.....	26
4.1.5. Determinação do teor de flavonóides totais.....	27
4.1.6. Estudo da linearidade para a metodologia de determinação do teor de flavonóides totais na matéria-prima vegetal.....	29
4.2. Solução extrativa.....	29
4.2.1. Desenvolvimento de metodologia analítica.....	29
4.2.1.1. Seleção do comprimento de onda para leitura.....	29
4.2.1.2. Determinação do teor de flavonóides totais.....	30
4.2.2. Estudo da relação planta:solvente e da alíquota tomada sobre a quantificação espectrofotométrica de flavonóides totais.....	31
4.2.3. Estudo preliminar da influência do tempo de extração sobre o rendimento da extração de flavonóides.....	33
4.2.4. Planejamento fatorial.....	33
4.2.4.1. Análise da variância do planejamento fatorial.....	36

4.2.5. Determinação do resíduo seco.....	36
4.2.6. Determinação da densidade relativa.....	37
4.2.7. Determinação do pH.....	37
4.3. Produto seco por aspersão (PSA).....	37
4.3.1. Avaliação da viabilidade tecnológica de produtos secos por aspersão a partir de partes aéreas de <i>Phyllanthus niruri</i> L.....	37
4.3.2. Preparação do produto seco por aspersão.....	39
4.4. Caracterização do produto seco por aspersão.....	39
4.4.1. Determinação do teor de flavonóides totais.....	39
4.4.2. Recuperação de flavonóides no produto seco por aspersão.....	40
4.4.3. Rendimento da operação de secagem.....	40
4.4.4. Perda por dessecação.....	40
4.4.5. Determinação do pH.....	41
4.4.6. Análise granulométrica por microscopia óptica.....	41
4.4.6.1. Determinação do tamanho médio de partícula.....	41
4.4.7. Análise por microscopia eletrônica de varredura.....	41
4.4.8. Avaliação da influência de atmosfera úmida controlada sobre o produto seco por aspersão.....	41
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>43</b>
5.1. Matéria-prima vegetal.....	43
5.2. Solução extrativa.....	56
5.3 Produto seco por aspersão (PSA).....	70
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>81</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>84</b>

## LISTA DE FIGURAS

		Página
<b>Figura 1</b>	Aspectos botânicos de <i>Phyllanthus niruri</i> L.....	11
<b>Figura 2</b>	Flavonóides relatados para <i>Phyllanthus niruri</i> L.....	12
<b>Figura 3</b>	Alcalóides relatados para <i>Phyllanthus niruri</i> L.....	13
<b>Figura 4</b>	Lignanas relatadas para <i>Phyllanthus niruri</i> L.....	14
<b>Figura 5</b>	Representação esquemática dos ensaios cromatográficos preliminares para alcalóides em soluções extrativas aquosas de <i>Phyllanthus niruri</i> L.....	24
<b>Figura 6</b>	Representação esquemática da técnica de quantificação de flavonóides na droga seca de <i>Phyllanthus niruri</i> L.....	28
<b>Figura 7</b>	Representação esquemática da preparação das curvas para soluções extrativas aquosas de <i>Phyllanthus niruri</i> L.....	32
<b>Figura 8</b>	Representação do cromatograma comparativo entre <i>Phyllanthus niruri</i> e <i>Phyllanthus amarus</i> .....	44
<b>Figura 9</b>	Representação dos cromatogramas obtidos para solução extrativa aquosa de <i>Phyllanthus niruri</i> L., quercetina, isoquercitrina e rutina.....	47
<b>Figura 10</b>	Representação gráfica da perda por dessecação do material vegetal de <i>Phyllanthus niruri</i> L. em função do tempo de armazenamento.....	49
<b>Figura 11</b>	Representação gráfica da distribuição granulométrica da droga vegetal seca e moída de <i>Phyllanthus niruri</i> L.....	51
<b>Figura 12</b>	Curva cumulativa de retenção e passagem após tamisação da droga vegetal seca e moída de <i>Phyllanthus niruri</i> L.....	51
<b>Figura 13</b>	Representação do espectro de varredura do complexo quercetina-AlCl <sub>3</sub> .....	53

<b>Figura 14</b>	Representação do espectro de varredura da solução amostra obtida através da metodologia de quantificação de flavonóides na matéria-prima vegetal de <i>P. niruri</i> L.....	54
<b>Figura 15</b>	Relação entre a quantidade de droga seca vegetal de <i>Phyllanthus niruri</i> L. e o teor de flavonóides totais.....	56
<b>Figura 16</b>	Representação do espectro de varredura da solução extrativa aquosa de <i>Phyllanthus niruri</i> L. após hidrólise e complexação dos flavonóides com $AlCl_3$ .....	57
<b>Figura 17</b>	Curvas obtidas a partir da absorvância lida do complexo $AlCl_3$ -flavonóide em soluções extrativas aquosas de <i>P. niruri</i> L. em diferentes proporções planta/solvente, utilizando alíquota de 20, 30 e 40 ml da solução mãe.....	58
<b>Figura 18</b>	Representação gráfica em rede de probabilidade normal dos efeitos estimados a partir da forma padrão do planejamento fatorial sobre o teor de flavonóides totais em soluções extrativas aquosas de <i>Phyllanthus niruri</i> L.....	65
<b>Figura 19</b>	Representação gráfica para interação AB para o desenho fatorial $2^3$ .....	67
<b>Figura 20</b>	Representação gráfica em rede de probabilidade normal para análise dos resíduos do planejamento fatorial.....	68
<b>Figura 21</b>	Representação do cromatograma obtido para a solução extrativa aquosa, produto seco por aspersão sem adjuvante, produto seco por aspersão com 20 % de adjuvante e produto seco por aspersão com 30 % de adjuvante.....	72
<b>Figura 22</b>	Representação gráfica da distribuição granulométrica do produto seco por aspersão de <i>Phyllanthus niruri</i> L.....	75
<b>Figura 23</b>	Representação gráfica da distribuição granulométrica do produto seco por aspersão, em função da frequência acumulada percentual.....	76
<b>Figura 24:</b>	Análise da granulometria do produto seco por aspersão de <i>Phyllanthus niruri</i> L. através da rede de distribuição RRSB.....	77
<b>Figura 25</b>	Fotomicrografia do produto seco por aspersão obtida através de microscopia eletrônica de varredura com aumento de 1000x.....	78

<b>Figura 26</b>	Fotomicrografia do produto seco por aspersão obtida através de microscopia eletrônica de varredura com aumento de 6000x.....	79
<b>Figura 27</b>	Perfil de higroscopicidade do produto seco por aspersão de <i>Phyllanthus niruri</i> L. em atmosfera controlada de umidade relativa de 63 %.....	80

## LISTA DE TABELAS

		Página
<b>Tabela 1</b>	Fatores e níveis para realização de delineamento fatorial.....	34
<b>Tabela 2</b>	Combinação dos fatores para realização dos experimentos.....	34
<b>Tabela 3</b>	Avaliação padrão dos efeitos principais e interações em um projeto fatorial 2 <sup>3</sup> .....	35
<b>Tabela 4</b>	Equações para avaliação de experimentos do tipo 2 <sup>3</sup> .....	36
<b>Tabela 5</b>	Condições de operação para preparação do produto seco por aspersão a partir de solução extrativa aquosa de <i>Phyllanthus niruri</i> L.....	38
<b>Tabela 6</b>	Ensaio preliminar para detecção de alcalóides na matéria-prima vegetal de <i>Phyllanthus niruri</i> L.....	45
<b>Tabela 7</b>	Resultados obtidos para perda por dessecação do material vegetal seco e moído de <i>Phyllanthus niruri</i> L. em função do tempo de armazenamento .....	48
<b>Tabela 8</b>	Teor de extrativos da matéria-prima vegetal de <i>Phyllanthus niruri</i> L.....	49
<b>Tabela 9</b>	Granulometria da matéria-prima vegetal seca e moída de <i>Phyllanthus niruri</i> L.....	50
<b>Tabela 10</b>	Variação do teor de flavonóides totais em função da quantidade de amostra de droga vegetal de <i>Phyllanthus niruri</i> L.....	55
<b>Tabela 11</b>	Dados da análise estatística da correlação entre a concentração de droga na solução extrativa e a absorvância do complexo flavonóide-AlCl <sub>3</sub> , segundo equação de primeira ordem ( $y = a + bx$ ), considerando a alíquota da solução mãe.....	58
<b>Tabela 12</b>	Avaliação do erro sistemático constante para curva de calibração com alíquotas de 40 ml da solução mãe.....	59

<b>Tabela 13</b>	Influência do tempo de extração sobre o teor de flavonóides totais em decoctos aquosos de <i>Phyllanthus niruri</i> L. na relação planta:solvente de 7,5: 100 (m/V).....	60
<b>Tabela 14</b>	Teor de flavonóides totais para soluções extrativas aquosas de <i>Phyllanthus niruri</i> L.....	61
<b>Tabela 15</b>	Análise da variância dos resultados do experimento fatorial empregando ANOVA.....	61
<b>Tabela 16</b>	Resultado da comparação das médias do teor de flavonóides totais através do teste de Student-Newman-Keuls.....	62
<b>Tabela 17</b>	Efeitos e interações calculados a partir da forma padrão do projeto fatorial sobre o teor de flavonóides totais em soluções extrativas aquosas de <i>Phyllanthus niruri</i> L.....	63
<b>Tabela 18</b>	Dados para determinação dos efeitos e interações não importantes.....	65
<b>Tabela 19</b>	Análise da variância dos efeitos e interações para o teor de flavonóides totais obtidos em soluções extrativas aquosas de <i>Phyllanthus niruri</i> L.....	66
<b>Tabela 20</b>	Resíduos para o projeto fatorial 2 <sup>3</sup> empregando soluções extrativas de <i>Phyllanthus niruri</i> L.....	68
<b>Tabela 21</b>	Densidade e pH da solução extrativa aquosa de <i>Phyllanthus niruri</i> L. na proporção droga:solvente de 7,5:100 (m/V).....	70
<b>Tabela 22</b>	Rendimento em flavonóides no produto seco por aspersão de <i>Phyllanthus niruri</i> L. em relação à solução extrativa.....	73
<b>Tabela 23</b>	Rendimento da operação de secagem do produto seco por aspersão com adjuvante de secagem de modo a perfazer 30% do produto seco.....	74
<b>Tabela 24</b>	Granulometria do produto seco por aspersão de <i>Phyllanthus niruri</i> L.....	75

## 1. INTRODUÇÃO

---

---

O desenvolvimento da medicina científica no início do século XX, respaldado por notáveis contribuições da farmacologia, fisiologia e química, fez com que o uso de plantas medicinais ficasse restrito à fonte de obtenção de substâncias ativas purificadas ou seus derivados semi-sintéticos, perdendo sua abordagem e inserção sócio-culturais. Ao mesmo tempo, a descoberta de novas substâncias medicamentosas sintéticas praticamente selaram o uso de plantas medicinais na terapêutica, limitando sua utilização, principalmente, às faixas populacionais urbanas de poucos recursos financeiros ou à população rural, alheia ao desenvolvimento dos grandes centros. No Brasil, este momento é marcado pela fase de desnacionalização dos laboratórios farmacêuticos durante a década de 50. Estes laboratórios, que empregavam plantas medicinais em seus produtos, ao serem absorvidos pelo capital estrangeiro, passaram a introduzir uma grande gama de produtos sintéticos, desenvolvidos no exterior, compostos por matérias-primas importadas (XAVIER, 1991).

Entretanto, apesar das expectativas exageradas em torno das fármacos sintéticos, os avanços obtidos não permitiram atingir uma terapia totalmente segura. Os efeitos indesejáveis e os prejuízos causados tanto pelo uso correto quanto pelo uso abusivo ou extensivo destes fármacos, fizeram com que, nas últimas décadas, houvesse uma busca de alternativas terapêuticas. A partir de então, percebe-se o ressurgimento da utilização de plantas medicinais, bem como, o aumento do interesse da comunidade científica, por produtos fitofarmacêuticos (SCHENKEL, *et al.*, 1985; XAVIER, 1991).

Diante das perspectivas da importância de plantas medicinais na terapêutica, destacou-se na reunião da Organização Mundial da Saúde (OMS) de 1978 a contribuição das mesmas e de preparações galênicas derivadas, como agentes terapêuticos válidos para as mais diversas patologias, recomendando, em nível mundial, a difusão dos conhecimentos necessários à sua prática (FARNSWORTH, 1980). Para tanto, através da resolução WHA31.33 desta mesma reunião, foi solicitado ao diretor geral da OMS que

direcionasse os esforços de seus membros, no intuito de desenvolver critérios científicos e métodos que garantissem a segurança e a eficácia de produtos fitoterápicos, especialmente formas farmacêuticas derivadas, bem como, de desenvolver padrões internacionais e especificações de identidade, pureza e eficácia destes produtos, preparações e práticas de preparação (ZHI-CHEN, 1980).

Durante a década de 80, as discussões a respeito das plantas medicinais e de suas preparações farmacêuticas derivadas abordaram questões tais como a garantia da manutenção da qualidade, segurança, inocuidade e eficiência do uso proposto (MENßEN, 1981, 1982; STELLMACH, 1980; FARIAS, 1985; PETROVICK, 1988). Estas culminaram na definição de critérios básicos na VI Conferência Internacional da Organização Mundial da Saúde (OTTAWA, 1991), enfocando os fitoterápicos na sua real dimensão de medicamento (WORLD, 1991). Tais critérios, determinados pela OMS, podem ser encontrados na legislação de países como a França e a Alemanha e o Brasil (NAGEL, 1987; ARTIGUES, 1991; KELLER, 1991, 1992; BAUER, 1993, PETROVICK, 1996)

No Brasil, a primeira menção do ponto de vista de legislação a respeito do emprego de fitoterápicos como medicamentos só aconteceu em 1967 (BRASIL, 1967). A partir de então, apenas em 1981 houveram novas alterações legais quanto a produtos fitoterápicos. Entretanto, a abordagem de produto fitoterápico como "produto natural", permitiu a disseminação de um pensamento errôneo quanto ao uso destes, que se estende ainda nos dias de hoje (BRASIL, 1981). Até a inclusão dos produtos fitoterápicos no Sistema Oficial de Saúde em 1988, estes não eram precisamente caracterizados como medicamentos e figuravam, as vezes, entre as terapias alternativas (BRASIL, 1988). Com a proibição do emprego de *Sumphytum officinale* (confrei) como matéria-prima terapêutica em 1992 (BRASIL, 1992), desencadeou-se um processo de regulamentação dos produtos fitoterápicos como medicamentos. Para tanto, o Ministério da Saúde, através da portaria 546, instituiu o Grupo Consultor Técnico-Científico (GCTC) em 21 de maio de 1993. Constituído por

representantes de instituições de ensino e pesquisa, órgãos da saúde pública e organizações ligadas ao estudo de plantas medicinais, o GCTC, foi incumbido de estabelecer a normatização sobre o controle de serviços, a produção, a armazenagem e a utilização de substâncias e produtos naturais. Assim, foi elaborada a portaria 123/SVS, que continha uma proposta de regulamentação de registro de produtos fitoterápicos, com um prazo para apresentação de sugestões por todos os setores da sociedade (BRASIL, 1994). Após avaliação das contribuições recebidas foi então redigida a portaria 6/SVS (BRASIL, 1995).

A portaria 6/SVS, publicada em 31 de janeiro de 1995, trata das definições, de ensaios comprobatórios da qualidade em todas as etapas do processamento, dos critérios de registro destes produtos junto aos órgãos de Vigilância Sanitária no País e, de ensaios biológicos e de toxicidade a fim de estabelecer a segurança e a eficácia do produto (BRASIL, 1995). As especificações dos ensaios toxicológicos e de eficácia foram abordadas mais profundamente na portaria 116/SVS (BRASIL, 1996).

Sintonizada com as perspectivas do emprego de plantas medicinais como recurso terapêutico, a CEME (Central de Medicamentos) do Ministério da Saúde, implantou no Brasil o Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais - PPPM. Este programa tinha o intuito de promover a investigação científica de plantas usadas com fins terapêuticos pela população. Desde seu início, em 1983, propiciou o desenvolvimento de estudos pré-clínicos e clínicos, assim como de cultivo de diversas plantas medicinais brasileiras (LAPA, 1996). Mais recentemente o PPPM financiou, de forma inédita no Brasil, o desenvolvimento tecnológico de produtos fitoterápicos dando ênfase à qualidade total, utilizando matérias-primas nacionais tais como *Maytenus ilicifolia* (espinheira-santa); *Mikania glomerata* (guaco); *Cecropia glazioui* (embaúba) e *Phyllanthus niruri* L. (quebra-pedra) (PETROVICK, 1996).

O estabelecimento e a manutenção da qualidade de produtos farmacêuticos de origem vegetal apresentam grandes problemas ligados à insuficiência de dados fitoquímicos sobre muitas matérias-primas vegetais, bem como o desconhecimento das substâncias responsáveis pelas atividades terapêuticas relatadas. Por outro lado, existem determinadas limitações metodológicas e aparativas, que dificultam o controle de qualidade de produtos constituídos por extratos vegetais. Para garantir a qualidade no desenvolvimento de um produto é necessário o monitoramento da constituição química e da ação farmacológica, durante todo o processamento. Para tanto, freqüentemente é utilizada a substância ou o grupo de substâncias responsável pela atividade biológica. No caso de desconhecimento das substâncias responsáveis pela atividade farmacológica, podem ainda ser utilizadas substâncias referência, ou grupo delas, que sejam as mais típicas possíveis para a droga vegetal, majoritárias, providas ou não de ação farmacológica e que sejam extraídas no extrato primário. Neste caso, a identidade da matéria-prima vegetal deve ser inequivocamente assegurada (SONAGLIO, 1987; MELO, 1989; FRANCO, 1990, DE PAULA, 1997).

Dentre as técnicas de controle do processo extrativo encontram-se as técnicas cromatográficas, com as quais torna-se possível realizar avaliações tanto qualitativa quanto quantitativas. A análise da composição da droga vegetal e de preparações extrativas derivadas pode ser direta, através de cromatografia líquida de alta eficiência ou cromatografia gasosa, ou indireta, com o emprego de cromatografia em camada delgada de alta eficiência, cromatografia em camada delgada ou cromatografia em papel, seguidas de extração do componentes e determinação por análise química quantitativa ou físico-química tais como volumetria, espectrofotometria, fotocolorimetria ou densitometria (MELO, 1989, KNORST, 1991).

Para realização de estudos qualitativos, tanto em drogas vegetais quanto em soluções extrativas obtidas a partir das mesmas, a cromatografia em camada delgada é o método mais amplamente empregado entre os testes descritos em Farmacopéias, formulários ou outros textos oficiais (WAGNER,

1996). Em estudos quantitativos destaca-se a cromatografia líquida de alta eficiência, técnica que possui emprego intensivo, pois permite, facilmente, quantificar substâncias presentes em soluções extrativas.

Pode-se, ainda, encontrar na literatura metodologias físico-químicas, que permitem a quantificação de grupos de substâncias diretamente em soluções extrativas vegetais, que constituem metodologias menos complexas e que, normalmente, empregam menor aparato. Entretanto, muitas destas metodologias não têm apresentado resultados coerentes quando empregadas a diferentes famílias, gêneros e até espécies de plantas, que apresentem em sua composição os mesmos grupos de substâncias. Assim, a realização de estudos para validação destas técnicas para cada espécie vegetal é necessária para garantir a confiabilidade nos resultados obtidos (SCHMIDT e GONZÁLEZ ORTEGA, 1993; DE SOUZA, 1997).

Para que se possa desenvolver um produto fitoterápico, ou seja, um medicamento cujas propriedades sejam conhecidas e sua qualidade garantida, e que este possa ser produzido industrialmente, é necessário que a matéria-prima vegetal, seja abundante e com qualidade conhecida. É sabido que alguns fatores tais como estágio de desenvolvimento da planta e as condições edafoclimáticas influenciam suas propriedades. Assim, o cultivo de plantas medicinais que possam ser empregadas no desenvolvimento de fitoterápicos constitui uma das etapas mais importantes para padronização dos mesmos. Entretanto, a literatura demonstra que as plantas medicinais tiveram sua tecnologia de produção melhor equacionada em alguns países da Europa, especialmente França e Espanha. Mais recentemente dos Estados Unidos, com algumas exceções para culturas específicas, como é a cultura da menta, no Paraguai e Brasil (MATTOS, 1996).

A maior parte das espécies vegetais nativas, ou aclimatadas no Brasil, é colhida por procedimento extrativistas, sem que haja fiscalização eficiente por parte dos órgãos responsáveis. Com isto, além de diversas espécies tais como o jaborandi (*Pilocarpus microphyllum*), espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*) e

poaia (*Cephaelis ipecacuanha*) correrem o risco de extinção, o material colhido do ponto de vista quantitativo é bastante heterogêneo e muitas vezes de baixa qualidade (FURLAN, 1996).

Outra etapa importante na preparação de um medicamento de origem vegetal é a operação de extração. Frequentemente são empregadas misturas de solventes, tais como etanol, metanol ou acetona com água, com o objetivo de aumentar o rendimento na extração das substâncias de interesse, baseando-se, principalmente, na sua solubilidade e estabilidade (VOIGT, 1993). Entretanto, quando não se sabe qual grupo de substâncias é responsável pela atividade biológica, tanto a escolha do solvente quanto a escolha do método de extração, pode basear-se em estudos etnofarmacológicos e clínicos. Boa parte das preparações extrativas empregadas na medicina tradicional utilizam, principalmente, a água como líquido extrator, destacando-se a decocção e a infusão como métodos de extração.

O desenvolvimento de uma solução extrativa padronizada requer o conhecimento de suas propriedades tecnológicas e/ou físico-químicas e de fatores que influenciam as mesmas, criando condições para avaliar a manutenção e reprodutibilidade de sua qualidade. Assim, é necessário detectar e estudar os efeitos de tais fatores, os quais podem ser estimados através da realização de uma análise fatorial ou planejamento fatorial (MONTGOMERY, 1991)

Os projetos fatoriais são, em geral, os mais eficientes para a determinação do efeito de dois ou mais fatores sobre propriedades específicas relacionadas a uma determinada operação. Através de seu emprego pode se estabelecer todas as possíveis combinações dos níveis de cada fator, e assim determinar qual ou quais fatores causa ou causam compatibilidade ou incompatibilidade. A realização de uma análise fatorial com objetivo de otimizar formulações farmacêuticas emprega modelos estatísticos que permitem assegurar o resultado, diminuindo a possibilidade de erros aleatórios (MONTGOMERY, 1991).

Com a finalidade de estabelecer parâmetros que assegurem a qualidade do produto obtido após a otimização da operação de extração, a solução extrativa é caracterizada pela determinação de suas propriedades, como o valor do pH, densidade, resíduo seco, perfil qualitativo e quantitativo de constituintes químicos, entre outros.

A transformação de soluções extrativas em produtos secos, tem sido amplamente realizada no desenvolvimento tecnológico de fitoterápicos. Os objetivos desta operação têm sido normalmente a obtenção de produtos com maior concentração de constituintes químicos e com melhores características tecnológicas. Os produtos secos têm apresentado vantagens relacionadas com a homogeneidade de distribuição dos constituintes da preparação, estabilidade, simplicidade e precisão na realização de operações de pesagem, bem como com sua utilização como produto intermediário na obtenção de outras formas farmacêuticas como comprimidos, cápsulas, granulados e pomadas, entre outros. Entre as técnicas de secagem mais empregadas encontram-se a liofilização e a secagem por aspersão (LIST e SCHMIDT, 1989; GAUDY, 1991).

O emprego de secagem por aspersão no desenvolvimento de fitoterápicos tem sido amplamente estudada, podendo ser encontrados diversos relatos na literatura (JACOB, 1976, 1984; SOERTANO, 1980; GAUDY, 1987; CASADEBAIG, 1989; PUECH, 1991; BASSANI, 1990; GONZÁLEZ ORTEGA, 1993). A técnica de secagem por aspersão bem como o desenvolvimento de formas farmacêuticas a partir de produtos secos, também tem sido objeto de estudo do Laboratório de Desenvolvimento do Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS, onde já foram concluídos diversos trabalhos nesta área (LEMMOS SENNA, 1997; CAMPOS, 1996; DE PAULA, 1996; TEIXEIRA, 1996; DE SOUZA, 1997)

A preferência na utilização desta técnica de secagem na produção de fitoterápicos deve-se, especialmente, aos baixos custos e baixos riscos de degradação dos constituintes químicos durante a operação, devendo-se o último ao curto tempo de contato entre o produto a ser seco e a fonte de calor,

sendo esta uma das principais vantagens do processo de secagem por aspersão quando comparado com outros métodos que empregam o calor (MASTERS, 1976; BROADHEAD, 1992).

Estudos realizados sobre o emprego de adjuvantes de secagem têm demonstrado uma melhora nas propriedades físico-químicas, bem como, proporcionado um aumento no rendimento da operação, além de influir positivamente sobre a recomposição em água do produto e a estabilidade frente à umidade (GAUDY, 1987; PUECH, 1991; MOURA, 1996). Adjuvantes tais como o amido, dióxido de silício coloidal, fosfato tricálcico, glicose, goma arábica e lactose, entre outros, tem sido amplamente empregados neste procedimento.

O dióxido de silício coloidal tem se destacado devido a propriedades tais como: elevada pureza, inércia química e inocuidade. O produto seco obtido com a adição de dióxido de silício coloidal apresenta boa fluidez, decorrente do baixo diâmetro de sua partículas (16  $\mu\text{m}$ ), bem como, possui melhor estabilidade frente à umidade, como consequência de sua elevada superfície específica (200  $\text{m}^2/\text{g}$ ). Este último fator é importante para manutenção da qualidade dos produtos, principalmente tratando-se de produtos obtidos a partir de extratos vegetais, altamente higroscópicos (WADE e WELLER, 1994).

## ***Phyllanthus niruri* L.**

### ASPECTOS BOTÂNICOS E AGRONÔMICOS

#### Descrição botânica

O gênero *Phyllanthus*, com aproximadamente 750 espécies distribuídas em mais de 50 seções, corresponde ao maior e mais diversificado gênero das *Euphorbiaceae*, subfamília *Phyllanthoideae*, onde a grande maioria das espécies é estritamente tropical (WEBSTER, 1970).

No Brasil, espécies pertencentes ao gênero *Phyllanthus* L. são encontradas do Norte até o Sul do País. Entretanto, três espécies muito semelhantes recebem o nome de "quebra-pedra". Nos Estados Amazônicos a espécie corresponde principalmente a *Phyllanthus urinaria*, no Nordeste a *Phyllanthus amarus* e nos Estados do Centro e Centro Sul a *Phyllanthus niruri*, sendo esta a mais conhecida (MATOS, 1989). Outras espécies também são relatadas como quebra-pedra, como *Euphorbia prostrata* (PETROVICK, 1975), *Phyllanthus sellowianus* (CALIXTO, 1984), *Phyllanthus tenellus* e *Phyllanthus corcovadenses* (BACCHI e DE OLIVEIRA, 1983).

A literatura revisada fornece poucos elementos que permitam assegurar inequivocamente a identidade do vegetal, possibilitando sua substituição por outras espécies vegetais assemelhadas e comumente utilizadas com o mesmo objetivo, especialmente *Phyllanthus urinaria* e *Phyllanthus amarus*. (WEBSTER, 1970). A semelhança morfológica entre espécies de *Phyllanthus* fez com que fossem realizados diversos relatos errôneos, especialmente em levantamentos etnobotânicos. As principais trocas de espécies têm sido entre *Phyllanthus niruri* e *Phyllanthus amarus* (UNANDER *et al.*, 1991).

O *Phyllanthus niruri* L. é uma erva anual de 3 a 6 decímetros de altura, glabra; o caule com folhas reduzidas a escamas, ramos finíssimos com folhas

umbricadas e assim semelhantes a folhas compostas, apresentando-se oblongo-elípticas, arredondadas e aguçadas pelo ápice, assimétricas e levemente cordadas na base, 6 a 14 mm de comprimento, nervuras laterais evidentes na face dorsal; estípulas linear-lanceoladas, intensas, assoveladas, com 1,5 mm de comprimento, e pecíolo de 0,5 a 1 mm.

As flores desta espécie de planta são monóicas, dispostas em fascículos unissexuais. As partes florais masculinas, 1 a 2, se fixam nas axilas e perto dos ápices dos ramos; seus pedicelos medem 2 mm de comprimento; sépalos em número de 5, largo-ovados, obtusos, distribuídos livremente; normalmente são compostos por três estames; com cinco glândulas; filamentos livres acima do meio; anteras deiscentes por uma linha horizontal. Os pedicelos femininos possuem de 4 a 5 mm; cinco sépalos, obovalados, com nervuras distintas mas sem margens brancas; disco plano, levemente ondulado; ovário liso; estiletos bipartidos. Os frutos do *P. niruri* apresentam cápsula deprimida, com tamanho de 2 a 5 mm de diâmetro; as sementes medem cerca de 1,5 mm, com muitos pontos em linha regulares (fig. 1) (WEBSTER, 1970).

### Estudos agronômicos

O estudo de propagação realizado demonstrou que o *P. niruri* L. se reproduz facilmente através de sementes, porém a longevidade destas é curta, perdendo rapidamente o poder germinativo quando armazenadas. Em campo, a longevidade das sementes é bem maior, entretanto, o processo de coleta e secagem acelera a perda do poder germinativo. A secagem é realizada ao sol ou em estufa, e tem o objetivo de desprendimento das sementes. O material assim colhido apresenta 50 % de impurezas, com germinação inicial de 85 %, caindo significativamente nos meses seguintes. Devido à abundância de plantas nas épocas chuvosas, é possível realizar a coleta de mudas para transplante direto no campo. Quando as mudas são formadas por sementes, o tempo de formação das mudas em casa de vegetação é de 20 a 30 dias (CPQBA/UNICAMP, 1990).

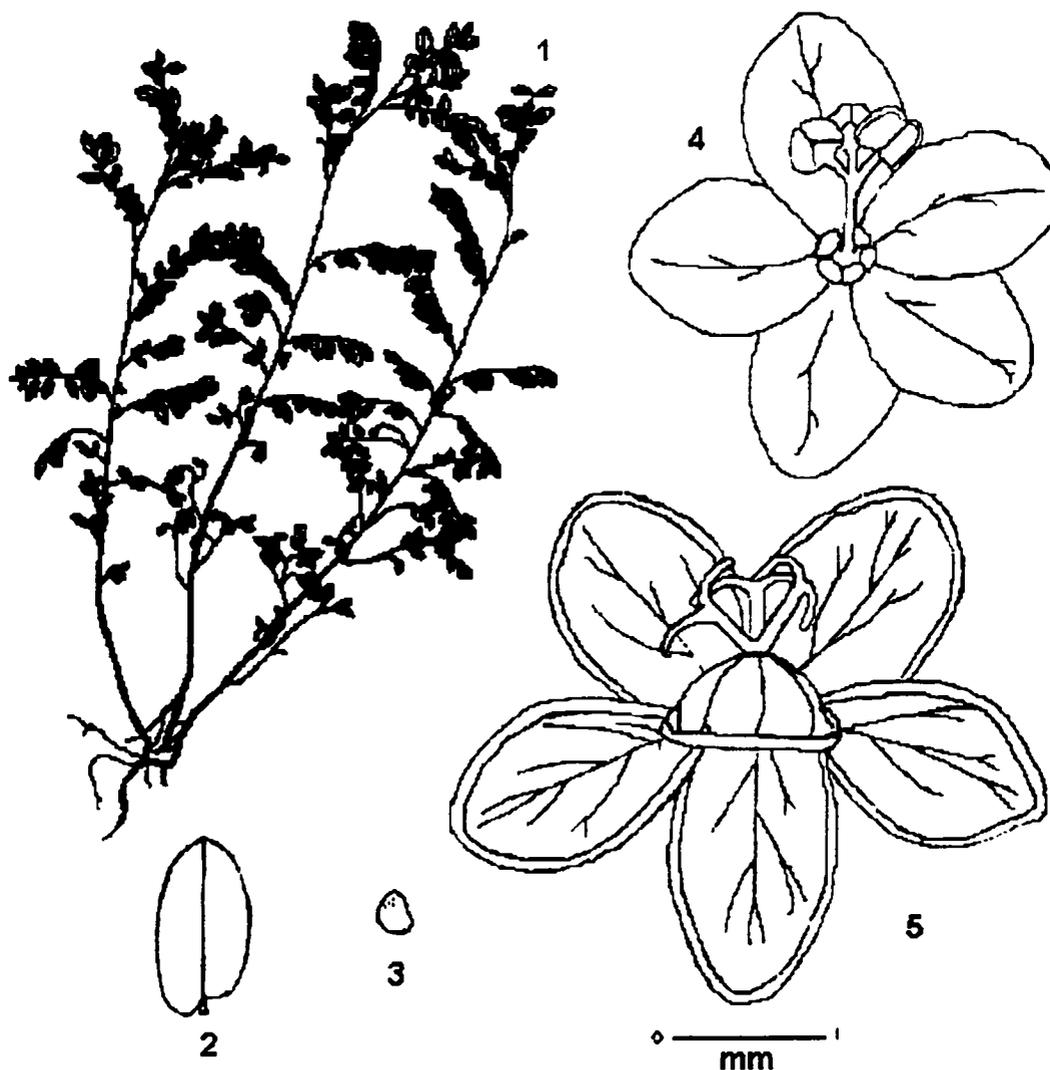


Figura 1. Aspectos botânicos de *Phyllanthus niruri* L.: 1 - ramos; 2 - folha; 3 - semente; 4 - flor masculina; 5 - flor feminina (WEBSTER, 1970)

Os estudos sobre o estabelecimento da cultura em campo demonstraram que o vegetal requer alta umidade do solo nos primeiros dias após o transplante. Exige também condições de baixa radiação, que são favoráveis, embora não imprescindíveis. Foram realizados também cultivos a pleno, sob ripados de bambu, e em diferentes espaçamentos. Também foi possível a realização do plantio direto, obtendo-se resultados satisfatórios. O desenvolvimento vegetativo numa cultura é contínuo, isto é, são plantas anuais de ciclo curto, que florescem após 30 a 60 dias no campo. Plantas novas e perfilhos se desenvolvem, porém, em grande número, continuamente, formando

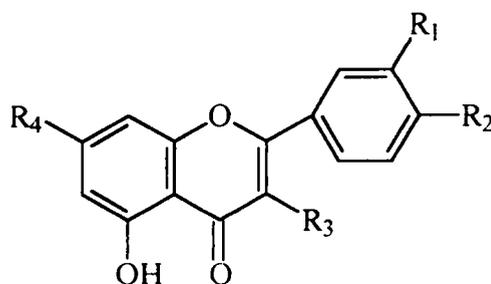
touceiras do vegetal, por tempo bem maior. Torna-se difícil portanto, precisar o momento ideal da colheita. Para o cultivo isolado de *Phyllanthus niruri* L. foi relatado severo ataque de formigas e pragas, sendo portanto, recomendado o cultivo consorciado com outras ervas (CPQBA/UNICAMP, 1990; SCHEFFER, 1990).

## ASPECTOS FITOQUÍMICOS

Quanto à composição química, foi relatada pela literatura, entre outros componentes, a presença de flavonóides, alcalóides e lignanas

### Flavonóides

Os flavonóides são uma classe de substâncias amplamente distribuída no reino vegetal e com reconhecida atividade biológica. Em *Phyllanthus niruri* L. foram relatados vários compostos deste grupo de substâncias (fig. 2).



Flavonóide	R1	R2	R3	R4
Quercetina	OH	OH	OH	OH
Quercetrina	OH	OH	O - ramnose	OH
Rutina	OH	OH	O - rutinosídeo	OH
Canferol	H	OH	OH	OH
Astragalina	H	OH	O - glicose	OH

Figura 2. Principais flavonóides relatados para *Phyllanthus niruri* L.

STANISLAS *et al.* (1967) separaram a fração flavonoídica e identificaram a quercetina. Em 1977 NARA *et al.* separaram, das partes aéreas do vegetal, quercetina, quercetrina, isoquercetrina, astragalina e rutina, tendo sido a rutina o componente de maior concentração. CHAUAN *et al.* (1977) isolaram e identificaram canferol-4'-O- $\alpha$ -L-(-)ramnopiranosídeo e eriodictiol-7-O- $\alpha$ -L-(-)ramnopiranosídeo. GUPTA e AHMED (1984) descrevem a presença de 5,6,7,4'-tetra-hidroxi-8-(3-metilbut-2-enil)flavone-5-O-rutinosídeo nesta espécie de planta.

### Alcalóides

Na literatura revisada para *Phyllanthus niruri* L. foram encontrados relatos da presença de diversos alcalóides derivados da securinina (fig. 3). Entre estes destacam-se a 4-metoxi-nor-securinina, nor-securinina, entnorsecurinina, nirurina e filocrisina (STANISLAS *et al.*, 1967; ROUFFIAC e PARELLO, 1969; MULCHANDINI *et al.*, 1984; JOSHI *et al.*, 1986; PETCHNAREE e BUNYAPRATHATSARA, 1986).

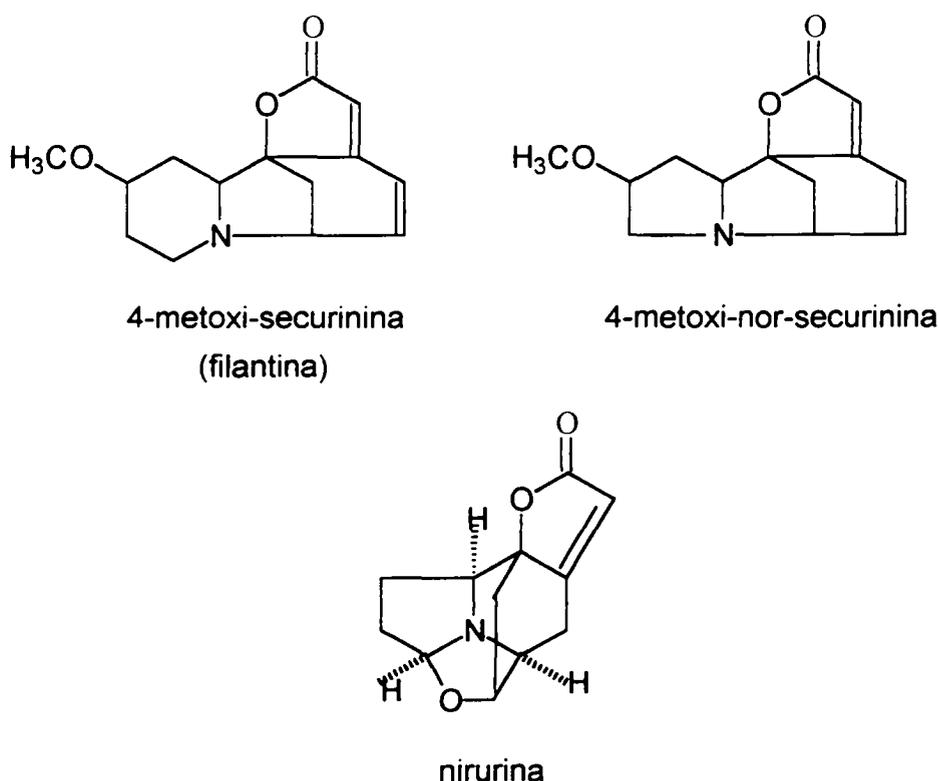


Figura 3. Alcalóides relatados para *Phyllanthus niruri* L.

## Lignanas

A maioria das lignanas relatadas na literatura para *P. niruri* L possuem estrutura do tipo ariltetralina. A este grupo pertencem quatro compostos já isolados nesta espécie: hipofilantina, nirtetralina, filtetralina e lintetralina. Também foram relatadas as presenças de filantina, nirfilina, nirantina e hidroxinirantina, lignanas pertencentes a classe diarilbutano. Outra lignana também relatada é a filnirurina (fig. 4) (STANISLAS *et al*, 1967; RAO e BRAMLEY, 1971; ANJANEYULU *et al*, 1973; KARD *et al*, 1979; BHADBHADE *et al*, 1980; GANESHPURE *et al*, 1981; SATYANARAYANA *et al*, 1988; SINGH *et al*, 1986; 1989)

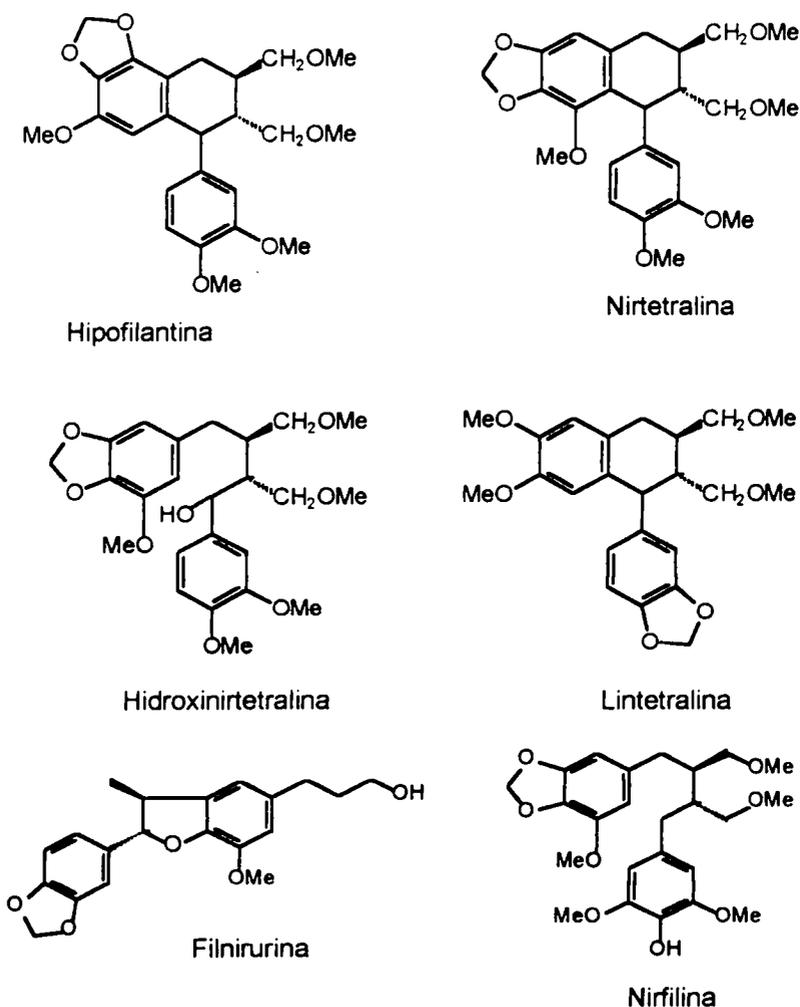


Figura 4. Lignanas relatadas para *Phyllanthus niruri* L.

## ASPECTOS ETNOFARMACOLÓGICOS E FARMACOLÓGICOS

O *Phyllanthus niruri* L. é comumente conhecido como quebra-pedra ou erva pombinha e tem sido empregado na medicina popular sob a forma de infuso ou decocto das partes aéreas, principalmente, visando o auxílio a eliminação de cálculos renais (urolitíase), sendo ainda utilizado, no tratamento de nefrites, cistites, pielites, hepatites do tipo B, largamente usado nas hidropsias, bem como em afecções renais e das vias urinárias (COIMBRA, 1958; CRUZ, 1985; VENKATESWARAN, 1987; MATOS, 1988, 1989; UNANDER, 1991; VIEIRA, 1992; SIMÕES, 1995)

Os estudos farmacológicos desenvolvidos com diversas espécies do gênero *Phyllanthus* foram direcionados para seu emprego no tratamento da hepatite do tipo B, afecções geniturinárias e no auxílio a eliminação de cálculos renais.

MILMAN (1986), VENKATESWARAN *et al* (1987; 1988) comprovaram a propriedade de extratos aquosos de partes aéreas de *Phyllanthus niruri* L. em inibir a DNA polimerase endógena do vírus da hepatite do tipo B *in vitro*. Os mesmos autores também relataram atividade significativa contra o vírus da hepatite do tipo B, quando o extrato foi administrado por via i.p. em cobaias, não ocorrendo o mesmo com a administração subcutânea.

UENO *et al.* (1988) comprovaram que o tanino geraniina, isolado a partir de *P. niruri*, possui atividade inibitória da enzima de conversão da angiotensina.

O infuso aquoso das partes aéreas de *Phyllanthus niruri* demonstrou ainda, efeito uricosúrico e de aumento na filtração glomerular (SANTOS, 1990).

## ASPECTOS TOXICOLÓGICOS, PRÉ-CLÍNICOS E CLÍNICOS (SANTOS, 1990)

O uso de doses crescentes e sucessivas do chá de *Phyllanthus niruri* L. em seis voluntários, não demonstrou alterações tóxicas agudas. Não foram

detectadas alterações no exame físico, inclusive da pressão arterial dos pacientes.

Os testes psicomotores realizados (tempo de reação e teste de coordenação) não detectaram qualquer alteração com o uso do chá nas doses empregadas, mostrando ausência de potencial de toxicidade neurológica do chá.

Os efeitos de toxicidade cardíaca foram avaliados através da realização de eletrocardiograma e análise da frequência cardíaca, não sendo identificado qualquer efeito deletério.

Através da realização de hemograma completo (hematócrito, hemoglobina, leucograma) bilirrubina total, direta e indireta e transaminase glutâmico-pirúvica, avaliou-se a toxicidade sangüínea e possível efeito hepatotóxico, não sendo detectada qualquer alteração nos parâmetro analisados.

O estudo crônico realizado em trinta pacientes portadores de calculose renal confirmada por estudo radiobiológico e/ou ultrasonográfico, demonstrou que o uso do chá por um período de 3 meses não apresentou efeito toxicológico, não modificando o volume urinário e nem os parâmetros de bioquímica sangüínea analisados.

Com doses maiores do chá houve diminuição do nível de creatinina plasmática e aumento de sua depuração. O uso prolongado do chá de *Phyllanthus niruri* L. propiciou maior eliminação de cálculos no período de acompanhamento.

Estudo paralelo realizado em ratos, com o modelo de cálculo vesical por oxalato de cálcio, demonstrou que o uso do chá de *Phyllanthus niruri* acarretou um aumento no volume e nas concentrações de creatina e sódio urinários, bem

como uma redução significativa no crescimento do cálculo vesical (SANTOS, 1990).

A revisão bibliográfica evidenciou um grande número de estudos abordando aspectos farmacológicos e fitoquímicos para *Phyllanthus niruri* L. e espécies semelhantes. Por outro lado, pôde-se observar a escassez de trabalhos que abordem aspectos de desenvolvimento de formas farmacêuticas empregando *P. niruri*. Desta forma, o desenvolvimento de um produto seco padronizado representa um passo primeiro passo na obtenção de uma forma farmacêutica intermediária ou ainda de uma forma farmacêutica final de reconstituição instantânea.

### 3. MATERIAIS

---

---

#### 3.1 Material vegetal

As partes aéreas de *Phyllanthus niruri* L. foram fornecidas pelo Centro Distribuidor da CEME (CPQBA/UNICAMP), onde foram coletadas no dia 16 de janeiro de 1996 e identificadas. Espécime do vegetal foi depositada no Herbário do Departamento de Botânica da UFRGS sob o número de registro ICN 111765

O material vegetal foi seco em estufa de ar circulante a 45 °C durante sete dias, sendo em seguida selecionado manualmente e moído em de moinho de facas.

A droga vegetal moída foi utilizada como matéria-prima no desenvolvimento deste trabalho.

As partes aéreas de *Phyllanthus amarus* foram gentilmente fornecidas pelo Prof. Dr. José A. Matos (Universidade Federal do Ceará), em meados de 1996. O material foi recebido moído e identificado como tal.

#### 3.2 Adjuvante

Dióxido de silício coloidal (Aerosil 200<sup>®</sup>) (Degussa/São Paulo) foi gentilmente cedido pela Fundação Estadual de Pesquisa e Proteção em Saúde. Este adjuvante foi utilizado sem tratamentos prévios.

### 3.3 Reagentes, soluções, substâncias-referências e outras matérias-primas

Todos os reagentes utilizados, quando não indicada outra fonte, são de procedência da Merck e possuíam grau de pureza pró-análise ou encontravam-se inscritos na FARMACOPÉIA BRASILEIRA IV (1988).

ácido acético glacial;

ácido clorídrico R;

ácido fórmico;

acetato de etila;

acetona;

cloreto de alumínio hexahidratado;

clorofórmio;

cromatofolhas de gel de sílica GF<sub>254</sub> (art. 5626)

cromatofolhas de gel de sílica GF<sub>254</sub> (Whatmam, art. 4420-222)

éter etílico;

hidróxido de amônio;

hexametilenotetramina;

isoquercitina;

luteolina (Extrasynthèse);

metanol;

metiletilcetona;

*n*-butanol;

nitrito de sódio;

quercetina (art. 7456);

reagente de Dragendorff (STAHL, 1969);

rutina (Rothchrom CHR, art. 71761 - C. Roth);

solução metanólica de ácido acético a 5% (V/V);

solução metanólica de difenilboriloxietilamina a 0,5% (m/v) (Rotichrom CH, art. 35315843 - C. Roth);

### 3.4 Aparelhos e equipamentos

agitador magnético Fisatom 725 A;  
aparelho de tamisação Retsch 30;  
balança analítica Mettler AB204;  
balança semi-analítica Mettler PM 200;  
balança analítica Sartorius 2402;  
banho de água Biomatic 869;  
espectrofotômetro UV/VIS Unicam 8625;  
espectrofotômetro de varredura Shimadzu UV - 190;  
estufa de ar circulante Memmert Tv 60 uL;  
estufa termostaticada Fabbe 119;  
evaporador rotatório Büchi RV-02;  
higrômetro de fio de cabelo;  
manta aquecedora Fisatom 52;  
metalizador Jeol Jee 4B - modelo JVG - IN  
microscópio eletrônico de varredura Phillips - série XL 20 - tipo PW 6620/00;  
microscópio óptico Jena;  
moinho de facas Retsch SK1;  
potenciômetro Knick pH-mV-Meter 520;  
regulador de temperatura Fisatom 402;  
secador da ar quente portátil - Arno MTA - 0080;  
tamises DIN 12791 série 4188;  
torre de secagem por aspensão BÜCHI MSD 190;

## 4. METODOLOGIA

---

---

### 4.1 Material vegetal

#### 4.1.1 Caracterização química

Para avaliação da presença de compostos alcaloídicos, foi tomado cerca de 1 g da droga seca e moída, adicionado de 10 ml de HCl 2 N e levado à fervura em banho-maria sob refluxo. Após resfriamento a mistura foi filtrada. O filtrado foi transferido para funil de separação, alcalinizado com amônia diluída e extraído três vezes com 10 ml de uma solução de éter:clorofórmio (3:1). As frações orgânicas foram reunidas em funil de separação e extraídas com 10 ml de HCl 2 N. A solução ácida obtida foi distribuída em quatro tubos de ensaio e adicionada dos reagentes de caracterização Bouchardat; Mayer; Dragendorff e Bertrand. A formação de precipitados indica a presença de alcalóides (COSTA, 1972).

Foi desenvolvido estudo preliminar para alcalóides e flavonóides por cromatografia de camada delgada utilizando cromatoplasmas prontas de gel de sílica GF<sub>254</sub>. Para o estudo de flavonóides foram utilizadas, como substâncias referência, quercetina, isoquercitrina e rutina (NARA *et al*, 1977; STANISLAS *et al*, 1967).

#### Preparação das amostras

##### Estudo preliminar para flavonóides

###### Solução-amostra:

Foi utilizada uma amostra de solução extrativa aquosa obtida sob refluxo durante 15 minutos das partes aéreas de *Phyllanthus niruri* L. na proporção planta/solvente de 7,5:100 (m/V).

Sistemas de eluição:

- I - *n*-butanol:ácido acético:água (4:1:5 V/V) (STAHL, 1969);
- II - acetato de etila:metanol:ácido fórmico:água (80:1:8:10 V/V) (DE SOUZA, 1997), e
- III - acetato de etila:metiletilcetona:ácido fórmico:água (5:3:1:1 V/V) (STAHL, 1969).

Os cromatogramas foram desenvolvidos de forma ascendente, em cubas saturadas, até a altura de aproximadamente 10 cm. Após secagem à temperatura ambiente, procedeu-se a observação sob luz UV em 366 nm, antes e depois de borrifar as placas com solução metanólica de difenilboriloxietilamina a 0,5 % (m/V).

Estudo preliminar para alcalóides:

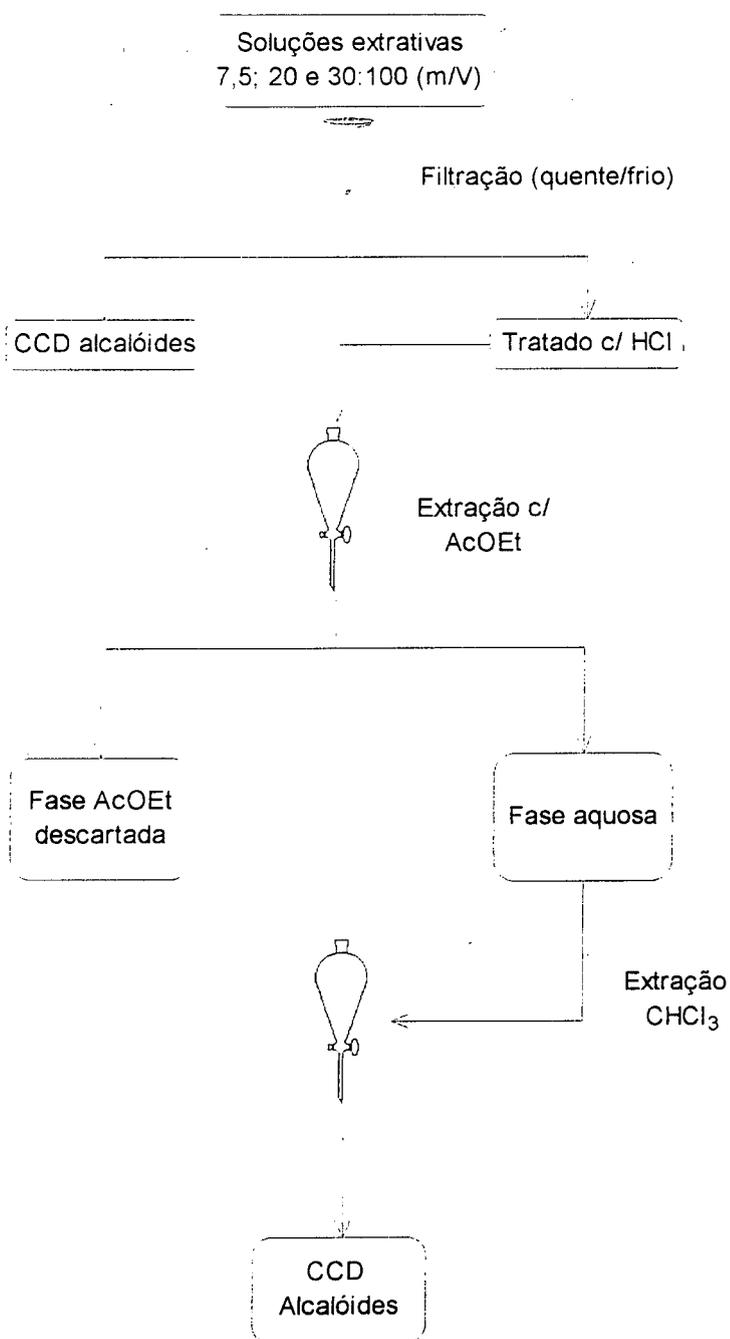
Soluções-amostra:

Foram utilizadas como amostras soluções extrativas aquosas obtidas pelo aquecimento durante 15 minutos, sob refluxo, das partes aéreas moídas, nas proporções planta/solvente 7,5:100, 20:100 e 30:100 (m/V) após filtração a vácuo. As amostras foram tratadas conforme representado na figura 5.

Sistema de eluição:

- I - *n*-butanol:ácido acético:água (4:1:5 V/V) (STAHL, 1969);

Os cromatogramas foram desenvolvidos de forma ascendente, em cubas saturadas, até altura aproximada de 10 cm. Após secagem à temperatura ambiente, procedeu-se a observação sob luz UV em 366 nm, antes e depois de serem borrifadas com reagente de Dragendorff.



**Figura 5.** Representação esquemática dos ensaios cromatográficos preliminares para alcalóides em soluções extrativas de *Phyllanthus niruri* L.

### Estudo cromatográfico comparativo entre *P. niruri* e *P. amarus*

De cada espécie foram pesados cerca de 2 g da droga seca e moída e transferidos para balão de fundo redondo. As amostras foram extraídas, sob refluxo, durante 45 minutos com 20,0 mL de etanol 80 % (V/V). As soluções foram transferidas para funis de separação e extraídas por 3 vezes com porções de 10,0 ml de acetato de etila. As frações acetato de etila foram reunidas em copo becker e evaporadas em banho de água. O resíduo foi retomado em 5 mL de metanol e aplicado em placa de gel de sílica GF<sub>254</sub>. Foram empregadas como padrões soluções metanólicas de rutina, isoquercetrina, quercetina e ácido cafeico.

O cromatograma foi desenvolvido de forma ascendente, em cuba saturada, até a altura de aproximadamente 10 cm, utilizando o sistema de eluição III. Após secagem à temperatura ambiente, procedeu-se a observação sob luz UV em 366 nm, antes e depois de borrifar as placas com solução metanólica de difenilboriloxietilamina a 0,5 % (m/V).

#### **4.1.2 Determinação da perda por dessecação (HARTKE, MUTSCHLER, 1987)**

Foram pesados, exatamente, cerca de 2,0 g da droga em pesa-filtro (d.i. 27 mm x 55 mm), previamente tarado. O pesa-filtro contendo a droga foi colocado em estufa a 100-105 °C por 2 horas, resfriado em dessecador e pesado. Em seguida foi recolocado em estufa por mais 30 minutos, repetindo-se o procedimento até peso constante. As determinações foram também realizadas aos 1, 2, 3, 5, 7, 9, e 12 meses

de armazenamento. Os resultados expressam a média de três determinações.

#### 4.1.3 Determinação do Teor de Extrativos (BUNDESVEREINIGUNG, 1986a):

Cerca de 1,0 g da droga, exatamente pesado, foi aquecido até fervura com 100 g de água durante 10 minutos. Após resfriamento, reconstituiu-se o peso inicial com acréscimo de água e procedeu-se a filtração, desprezando-se os 20 mL iniciais. Do restante do filtrado foram pesados, exatamente, cerca de 20,0 g em pesa-filtro (d.i. 27 mm x 55 mm) previamente tarado. O filtrado foi evaporado sob movimentação constante, em banho de água. Após completa evaporação, o pesa-filtro foi colocado em estufa a 100-105 °C por 2 horas, resfriado em dessecador e pesado. Em seguida, foi recolocado em estufa por mais 30 minutos, repetindo-se o procedimento até peso constante. Os resultados foram expressos pela média de seis determinações com três repetições.

$$TE = \frac{g \cdot 500}{m}$$

Onde: TE = teor de extrativos (m/m), g = massa do resíduo seco em gramas e m = massa da amostra em gramas

#### 4.1.4 Análise granulométrica (VOIGT, 1993)

Cerca de 100 g de partes aéreas secas e moídas foram submetidos a passagem através de tamises previamente tarados com aberturas de malha de 0,800; 0,630; 0,315; 0,200; 0,125 e 0,071 mm. A operação foi realizada a 60 vibrações por segundo durante 15 minutos. Para avaliação da distribuição granulométrica foi utilizada a média de três determinações.

#### 4.1.5 Determinação do teor de flavonóides totais na matéria-prima vegetal (BUNDESVEREINIGUNG, 1986b)

Pesou-se exatamente cerca de 0,400 g da droga e transferiu-se para balão de fundo redondo de 100 mL, acrescentando-se 1,0 mL de solução aquosa de hexametilenotetramina 0,5 % (m/V), 20,0 mL de acetona R e 2,0 mL de ácido clorídrico R. A mistura foi aquecida em banho de água, sob refluxo, durante 30 minutos e filtrada, após resfriamento à temperatura ambiente, para balão volumétrico de 100 mL através de pequena quantidade de algodão. O resíduo da droga e o algodão foram lavados com duas porções de 20,0 mL de acetona, aquecendo-se até fervura, sob refluxo, durante 10 minutos. Após resfriamento à temperatura ambiente, as soluções foram filtradas, através de algodão, para o balão volumétrico, completando-se o volume com acetona (Solução mãe, **SM**). Em funil de separação, 20,0 mL de **SM** foram adicionados de 20 mL de água e tratados com 15,0 mL de acetato de etila R. Este procedimento foi repetido, por três vezes, com porções 10,0 mL de acetato de etila. As fases acetato de etila, após serem reunidas e lavadas em funil de separação com duas porções de 50,0 mL de água, foram transferidas para balão volumétrico de 50 mL, completando-se o volume com o mesmo solvente (solução estoque, **SE**). A 10,0 mL da **SE** foram adicionados 2,0 mL de cloreto de alumínio 2 %, diluindo-se a 25,0 mL com solução metanólica de ácido acético 0,5 % (V/V) (solução amostra, **SA**). Paralelamente, 10,0 mL de **SE** foram diluídos a 25,0 mL com solução metanólica de ácido acético 0,5 % (V/V) (solução comparativa, **SC**). Após 30 minutos, procedeu-se a leitura de **SA** contra **SC** em espectrofotômetro em 420 nm (fig. 6).

Os resultados foram expressos em percentual de flavonóides totais, calculados como quercetina, pela média de seis determinações com três repetições, utilizando a fórmula abaixo:

$$C = \frac{A \cdot FD}{E_{1cm}^{1\%} \cdot (m - t)}$$



#### **4.1.6 Estudo da linearidade para a metodologia de determinação do teor de flavonóides totais na matéria-prima vegetal.**

Amostras de 0,400; 0,755; 1,125; 1,500 e 1,850 g da droga vegetal foram exatamente pesadas e o teor de flavonóides totais em g % de quercetina, foi determinado segundo a metodologia descrita no item 4.1.5.

Os resultados obtidos experimentalmente para o teor de flavonóides foram comparados com os valores calculados, estabelecendo-se qual faixa a quantidade de amostra de material vegetal apresentou comportamento linear.

### **4.2 Solução extrativa**

#### **4.2.1 Desenvolvimento da metodologia analítica**

##### **4.2.1.1 Seleção do comprimento de onda para leitura**

###### Espectro de varredura para rutina após hidrólise ácida

Pesou-se exatamente cerca de 0,050 g de rutina e transferiu-se para balão de fundo redondo de 100 mL acrescentando-se 1,0 mL de solução aquosa de hexametilenotetramina 0,5 % (m/V), 20,0 mL de acetona R e 2,0 mL de ácido clorídrico R. A mistura foi aquecida em banho de água, sob refluxo, durante 30 minutos e transferida para balão volumétrico de 50 mL, completando-se o volume com acetona (Solução mãe - **SM**). Em funil de separação, 20,0 mL de **SM** foram adicionados de 20,0 mL de água e tratados com 15,0 mL de acetato de etila R. Este procedimento foi repetido, por três vezes, com porções 10,0 mL de acetato de etila. As fases acetato de etila, após serem reunidas e lavadas em funil de separação com

duas porções de 50,0 mL de água, foram transferidas para balão volumétrico de 50 mL, completando-se o volume com o mesmo solvente (solução estoque - **SE**). A 2,0 mL de **SE** foram adicionados 2,0 mL de cloreto de alumínio 2 %, diluindo-se a 25,0 mL com solução metanólica de ácido acético 0,5 % (V/V) (solução amostra - **SA**). Ao mesmo tempo, 2,0 mL de **SE** foram diluídos a 25,0 mL com solução metanólica de ácido acético 0,5 % (V/V) (solução de compensação - **SC**). Após 30 minutos **SA** foi submetida a espectro de varredura (200 - 500 nm) utilizando **SC** como solução de compensação.

#### Espectro de varredura para solução extrativa após hidrólise

O espectro obtido foi comparado com o espectro de varredura de 200 a 500 nm da amostra resultante do tratamento de uma solução extrativa das partes aéreas obtida por decocção durante 15 minutos com proporção droga solvente igual a 7,5:100 (m/V) utilizando água com líquido extrator, submetida à metodologia descrita no item 4.2.1.2.

#### **4.2.1.2. Determinação do teor de flavonóides totais na solução extrativa**

Cerca de 15,0 g da solução extrativa em análise foram exatamente pesados e transferidos para balão de fundo redondo, adicionados 20,0 mL de acetona R, 2,0 mL de HCl R, 1,0 mL de solução aquosa de hexametilenotetramina 0,5 % (m/V) e submetidos a aquecimento sob refluxo em banho-maria, por 30 minutos. Após resfriamento, a solução foi transferida para balão volumétrico de 50 mL e seu volume completado com acetona R (Solução Mãe, **SM**). Foram transferidos 20,0 mL de **SM** para funil de separação, adicionados de 20,0 mL de água destilada e extraídos com 15,0 mL de acetato de etila, repetindo-se o procedimento por mais três vezes com 10,0 mL do mesmo

reagente. As fases acetato de etila foram reunidas e transferidas para balão volumétrico de 50 mL completando seu volume com o mesmo solvente (solução Estoque, **SE**). De **SE** foram retiradas duas alíquotas de 10,0 mL e, de forma independente, foram transferidas para balões de 25 mL. À primeira foram adicionados 2,0 mL de solução etanólica de cloreto de alumínio 2 % (m/V) e completado o volume com solução metanólica de ácido acético 5% (V/V)(solução amostra, **SA**). A segunda foi diluída diretamente a 25,0 mL com solução metanólica de ácido acético 5 % (solução comparativa, **SC**). Após 30 minutos procedeu-se a leitura de **SA** contra **SC** em comprimento de onda de 420 nm.

Os resultados foram expressos em percentual de flavonóides totais calculados como quercetina pela média de seis determinações, com três repetições, utilizando a fórmula abaixo:

$$C = \frac{A \cdot FD}{E_{1cm}^{1\%} \cdot m}$$

onde: A = absorvância lida; FD = fator de diluição; m = massa do extrato;  $E_{1cm}^{1\%}$  = absorção específica do complexo  $AlCl_3$ -quercetina (500).

#### 4.2.2 Efeito da relação planta:solvente e da alíquota tomada sobre a quantificação espectrofotométrica de flavonóides totais

Para obtenção da curva de calibração, seguiram-se os seguintes passos:

1. De forma separada foram preparadas soluções extrativas aquosas obtidas por decocção das partes aéreas durante 15 minutos, nas proporções planta/solvente de 2,5; 5; 7,5 e 10:100 (m/V).
2. De cada solução extrativa foram exatamente pesados cerca de 15,0 g e submetidos independentemente à metodologia descrita no item 4.2.1.2. Os experimentos foram realizados em três níveis (fig. 7):

Nível 1 - utilizando alíquota de 20 mL da solução extrativa em acetona obtida após hidrólise ácida (**SM**);

Nível 2 - utilizando alíquota de 30 mL da solução extrativa em acetona obtida após hidrólise ácida (**SM**);

Nível 3 - utilizando alíquota de 40 mL da solução extrativa em acetona obtida após hidrólise ácida (**SM**).

Os três níveis foram empregados para todas as soluções extrativas, independentemente da proporção planta/solvente. Os resultados foram expressos pela média de três determinações.

Sol. Extrativa 2,5:100 (m/V)	Sol. Extrativa 5:100 (m/V)	Sol. Extrativa 7,5:100 (m/V)	Sol. Extrativa 10:100 (m/V)	
15 g de Sol. Ext. + HCl R, acetona R,metenamina	15 g de Sol. Ext. + HCl R, acetona R,metenamina	15 g de Sol. Ext. + HCl R, acetona R,metenamina	15 g de Sol. Ext. + HCl R, acetona R,metenamina	
Refluxo	Refluxo	Refluxo	Refluxo	
				Em balão volumétrico 50 mL, completar o volume com acetona ( <b>SM</b> - Sol. Mãe)
20, 30 ou 40 mL de <b>SM</b> + 20 mL de Água	20, 30 ou 40 mL de <b>SM</b> + 20 mL de Água	20, 30 ou 40 mL de <b>SM</b> + 20 mL de Água	20, 30 ou 40 mL de <b>SM</b> + 20 mL de Água	n = 3

Em funil de separação extração com AcOEt para cada solução como descrito 4.2.1..2

**Figura 7.** Representação esquemática da preparação das curvas segundo o item 4.2.2 obtidas para soluções extrativas de *Phyllanthus niruri* L.

### Avaliação estatísticas das curvas

A determinação dos coeficientes de regressão e equação da reta, foram calculados mediante o método dos mínimos quadrados. Os limites de confiança do ponto de interseção e do ângulo de inclinação da reta foram estabelecidos segundo as equações (FUNK *et al.*, 1992):

$$L_a = a \pm (t_{\alpha [gl]} s_y)$$

$$L_b = b \pm (t_{\alpha [gl]} s_y)$$

onde:

$L_a$  = limites de confiança para interseção

$L_b$  = Limites de confiança para inclinação

$a$  = interseção obtida a partir da regressão

$b$  = inclinação obtida a partir da regressão

$s_y$  = desvio padrão

$t_{\alpha [gl]}$  = "t" tabelado,  $\alpha = 0.05$  e  $gl = n-1$

#### 4.2.3 Estudo preliminar da influência do tempo de extração sobre o rendimento da extração de flavonóides

Foram preparadas soluções extrativas com proporção planta/solvente de 7,5:100 (m/V) utilizando água destilada como líquido extrator, através de decocção durante 10, 20 e 30 minutos.

A influência do tempo foi avaliada através do teor de flavonóides totais nas soluções extrativas, determinado segundo metodologia descrita no item 4.2.1.2.

#### 4.2.4 Planejamento fatorial (MONTGOMERY, 1991)

Para avaliar a influência de fatores específicos sobre propriedades da solução extrativa foi realizado delineamento fatorial do tipo  $2^3$  onde foram estudados três fatores em dois níveis (tab. 1). Os experimentos

foram ordenados ao acaso e sem reposição (tab. 2). A influência dos fatores foi avaliada através do teor de flavonóides totais.

**Tabela 1:** Fatores e níveis para realização do delineamento fatorial

FATORES	NÍVEIS	
A: Método de extração	+	decocção
	-	infusão
B: Relação planta solvente (m:V)	+	7,5:100
	-	2,5:100
C: Tempo de extração (min)	+	15
	-	5

**Tabela 2:** Combinação dos fatores para realização dos experimentos

Experimento (n°)	Combinações	Fator e nível		
		A	B	C
1	(1)	-	-	-
2	a	+	-	-
3	b	-	+	-
4	c	-	-	+
5	ab	+	+	-
6	ac	+	-	+
7	bc	-	+	+
8	abc	+	+	+

O resultado dos efeitos de um ou mais fatores e das interações entre os fatores sobre o teor de flavonóides totais na solução extrativa foi calculado empregando-se a forma padrão do delineamento fatorial (tab. 3).



**Tabela 4:** Equações para avaliação de experimentos do tipo  $2^3$ 

Efeitos/ interações	Equações	
$E_A$	1	$1/4(y_2 + y_4 + y_6 + y_8) - 1/4(y_1 + y_3 + y_5 + y_7)$
$E_B$	2	$1/4(y_3 + y_4 + y_7 + y_8) - 1/4(y_1 + y_2 + y_5 + y_6)$
$E_C$	3	$1/4(y_5 + y_6 + y_7 + y_8) - 1/4(y_1 + y_2 + y_3 + y_5)$
$I_{AB}$	4	$1/8(y_1 + y_4 + y_5 + y_8) - (y_2 + y_3 + y_6 + y_7)$
$I_{AC}$	5	$1/8(y_1 + y_3 + y_6 + y_8) - (y_2 + y_4 + y_5 + y_7)$
$I_{BC}$	6	$1/8(y_1 + y_2 + y_7 + y_8) - (y_3 + y_4 + y_5 + y_6)$
$I_{ABC}$	7	$1/8(y_2 + y_3 + y_5 + y_8) - (y_1 + y_4 + y_6 + y_7)$

#### 4.2.4.1 Análise da variância do planejamento fatorial

Para análise estatística do planejamento fatorial foi empregado o método de YATES (1937), seguido do método proposto por DANIEL (1959) para planejamentos fatoriais não replicados (MONTGOMERY, 1991).

#### 4.2.5 Determinação do resíduo seco (BÖHME; HARTKE, 1981)

Pesaram-se exatamente cerca de 20,0 g da solução extrativa em pesa-filtro (d.i. 27 mm x 55 mm) previamente tarado, evaporando-se em banho de água, sob movimentação constante. Após evaporação, o pesa-filtro foi colocado em estufa a 100-105 °C por 2 horas, deixou-se esfriar em dessecador e pesou-se. O resultado foi calculado em relação a 100 g da solução extrativa, pela média de quatro determinações, expresso em percentagem ponderal.

#### **4.2.6 Determinação da densidade relativa (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988).**

Empregou-se picnômetro de 25 ml, previamente calibrado pela determinação de seu peso e o peso de água recentemente destilada, nele contida a 25 °C. A solução extrativa a 20 °C foi transferida para o picnômetro e sua temperatura ajustada a 25 °C. O conjunto foi pesado após remoção do excesso de líquido. A densidade foi calculada através da divisão entre massa da solução extrativa e a massa de água (n = 3).

#### **4.2.7 Determinação do pH**

O pH da solução extrativa foi determinado a 25 °C em potenciômetro calibrado com soluções tampão de fosfato e acetato, pH 7,0 e 4,0, respectivamente. O resultado foi calculado pela média de cinco determinações.

### **4.3 Produto seco por aspersão (PSA) (SENNA, 1993; CAMPOS, 1996; TEIXEIRA, 1996; DE SOUZA, 1997).**

#### **4.3.1 Avaliação da viabilidade tecnológica de produtos secos por aspersão a partir de partes aéreas de *Phyllanthus niruri* L. (SOARES, 1996)**

A influência da técnica de secagem, da adição de adjuvante e de sua concentração foram avaliadas, através da comparação do perfil cromatográfico, entre produtos secos e solução extrativa. As características macroscópicas dos produtos secos também foram observadas e comparadas quanto sua coloração e formação de aglomerados.

### Preparação das amostras

1. Solução extrativa: Foi preparada solução extrativa aquosa na proporção droga/solvente 7,5:100 (m/V), sob refluxo, durante 15 minutos.

2. Produtos secos por aspersão (PSA): Foram preparados três produtos nas condições descritas na tabela 5, onde: o PSA 1 foi obtido através da secagem direta da solução extrativa. Os PSA 2 e PSA 3 foram preparados a partir da solução extrativa adicionada de dióxido de silício coloidal (Aerosil 200<sup>®</sup>) como adjuvante de secagem de modo a perfazer respectivamente, 20 e 30 % do total de sólidos do produto seco obtido.

Para análise qualitativa foram pesados, exatamente, cerca de 500,0 mg de cada um dos produtos secos (PSA) e retomados em 15 ml de água destilada.

**Tabela 5:** Condições de operação para preparação do produto seco por aspersão a partir de solução extrativa aquosa de *P. niruri* L.

Parâmetro	Valor
Temperatura de entrada do ar de secagem (°C)	145 ± 2
Temperatura de saída do ar de secagem (°C)	105 ± 2
Fluxo de alimentação da solução extrativa (mL/min)	3,0
Pressão de ar comprimido (kPa)	200
Diâmetro de abertura do bocal de aspersão (mm)	0,7

### Avaliação cromatográfica

A cromatografia em camada delgada foi desenvolvida em cuba saturada utilizando cromatofolhas prontas de gel de sílica GF<sub>254</sub>. Como sistema de eluição, AcOEt:MeOH:HCOOH:H<sub>2</sub>O na proporção de 80:1:8:10 (V/V)(DE SOUZA, 1997). As amostras foram aplicadas em igual volume e, como substâncias referências, foram empregadas soluções metanólicas de isoquercitrina e rutina. As manchas foram observadas em 366 nm, após terem sido borrifadas com solução metanólica de difenilboriloxietilamina a 0,5 % (m/V).

#### 4.3.2 Preparação do produto seco por aspersão (PSA)

O produto seco por aspersão utilizado no trabalho foi preparado em torre de secagem por aspersão a partir da solução extrativa aquosa, obtida por decocção, na proporção planta/solvente 7,5:100 adicionada de dióxido de silício coloidal como adjuvante de secagem, de modo a perfazer 30 % do total de sólidos do produtos seco obtido.

As condições de operação da torre de secagem estão descritas na tabela 5.

O produto seco obtido foi acondicionado em frasco âmbar e armazenado em dessecador para posterior caracterização.

#### 4.4 Caracterização do produto seco por aspersão (PSA)

##### 4.4.1 Determinação do teor de flavonóides totais

A determinação do teor de flavonóides totais foi realizada segundo metodologia descrita no item 4.1.5, pesando-se exatamente cerca de 500,0 mg de PSA e transferindo para balão de fundo redondo,

juntamente com 20,0 mL de acetona R, 1,0 mL de hexametilenotetramina e 2 mL de HCl R. Os resultados foram expressos em percentual de quercetina por 100 g de produto seco por aspersão representado pela média de seis determinações.

$$C = \frac{A \cdot FD}{E_{1cm}^{1\%} \cdot m}$$

onde: A = absorvância lida; FD = fator de diluição; m = massa de PSA; t = perda por dessecação de PSA;  $E_{1cm}^{1\%}$  = absorção específica do complexo AlCl<sub>3</sub>-quercetina (500).

#### 4.4.2 Recuperação de flavonóides no produto seco por aspersão

O rendimento em flavonóides no produto seco por aspersão, foi determinado através da diferença entre a quantidade total de flavonóides esperada para o volume de solução extrativa submetida à secagem e a quantidade de flavonóides total do produto seco por aspersão.

#### 4.4.3 Rendimento da operação de secagem

O rendimento bruto foi determinado através da diferença entre a massa teórica esperada do total de sólidos presentes e a massa do PSA obtido. Para o rendimento corrigido considerou-se a perda por dessecação do PSA.

#### 4.4.4 Perda por dessecação

Foram exatamente pesadas três amostras de cerca de 500,0 mg do produto seco por aspersão e submetidas a metodologia descrita no item 4.1.2.

#### **4.4.5 Determinação do pH**

Cerca de 500,0 mg do produto seco por aspersão foram pesados e dispersos em 15,0 mL de água destilada. O pH foi determinado em potenciômetro calibrado com soluções tampão pH 4,0 e 7,0 a 25 °C. Os resultados foram expressos pela média de cinco determinações.

#### **4.4.6 Análise granulométrica por microscopia óptica (LANTZ, 1990)**

A análise granulométrica do produto seco por aspersão foi realizada através da determinação do diâmetro de Feret, medindo-se 640 partículas dispersas em vaselina líquida sobre lâmina de vidro, com microscópio óptico com ocular dotada de nônio e calibrado com escala de 1 mm com 100 divisões.

##### **4.4.6.1 Determinação do tamanho médio de partícula**

Para a determinação do tamanho médio de partícula foram utilizadas as metodologias de análise gráfica (LANTZ, 1990) e da rede de distribuição RRSB (DIN 66145).

#### **4.4.7 Análise por microscopia eletrônica de varredura**

A forma e superfície das partículas do produto seco por aspersão foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura. As fotomicrografias foram obtidas com aumentos de 1000 e 6000 vezes.

#### **4.4.8 Avaliação da influência de atmosfera úmida controlada sobre o produto seco por aspersão (GAUDY, 1987; CASADEBAIG, 1987)**

A atmosfera de umidade relativa de 63 % foi obtida utilizando aproximadamente 500 mL de solução aquosa saturada de nitrito de sódio (62,3 %, m/V), em dessecador com capacidade para 5 litros e mantida à

temperatura constante de  $25 \pm 2$  °C. A umidade relativa foi aferida e sua variação foi monitorada por higrômetro de fio de cabelo.

Em pesa-filtros (d.i. 33 mm x 48 mm) previamente tarados, foram exatamente pesados 500.0 mg de do produto seco por aspersão, e colocados abertos no dessecador (n=5). Pesa-filtros vazios foram utilizados como controle (n=3). A avaliação da sorção de água foi realizada por gravimetria, pesando-se após 24 e 48 horas e, a partir de então, a cada 48 horas perfazendo um total de 14 dias de experimento. Os resultados são expressos em percentual ponderal.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

---

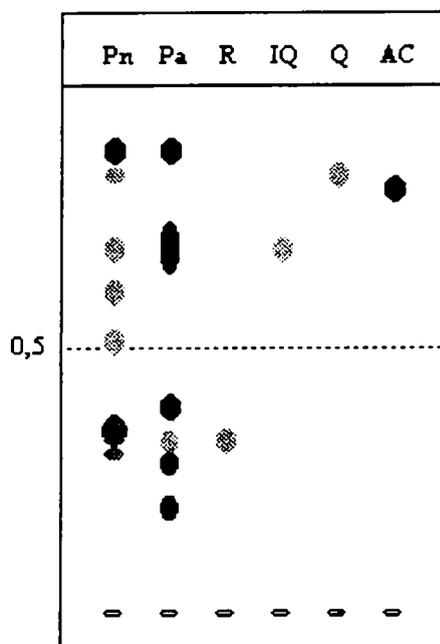
### 5.1 Matéria-prima vegetal

A caracterização da matéria-prima vegetal foi iniciada pela identificação botânica das partes aéreas de *Phyllanthus niruri* L., realizada pelo próprio centro produtor e distribuidor (Centro de Pluridisciplinar de Pesquisa Químicas Biológicas e Agrícolas - UNICAMP)<sup>1</sup>. Entretanto, sabe-se que somente a identificação botânica não é suficiente para a descrição da qualidade de uma matéria-prima vegetal. Há necessidade de verificar, entre outros quesitos, a presença de marcadores químicos característicos para a mesma.

A realização de estudos cromatográficos comparativos entre as diversas espécies de *Phyllanthus* permite estabelecer critérios mais específicos para diferenciação das espécies. A representação esquemática do cromatograma comparativo entre *Phyllanthus niruri* e *Phyllanthus amarus* empregando o sistema de eluição AcOEt:MeOH:ácido fórmico:H<sub>2</sub>O (5:3:1:1 V/V)(fig. 8) mostra um perfil cromatográfico distinto para cada uma das espécies. A principal característica encontrada para o *Phyllanthus niruri* foi a presença de uma mancha esverdeada em seu cromatograma correspondente, provavelmente, ao canferol-4'-O- $\alpha$ -L-(-)-ramnopiranosídeo (CHAUAN *et al.*, 1977), e das manchas alaranjadas correspondentes à isoquercetrina e à quercetina, enquanto que o *Phyllanthus amarus*, além da ausência das manchas relatadas para a outra espécie, apresentou diversas manchas azuis abaixo e acima da mancha correspondente à rutina. Os resultados obtidos constituem um característica adicional na identificação e, principalmente, na distinção das espécies estudadas.

---

<sup>1</sup> O Autor agradece ao Eng. Agron. Ilio Montanari Jr do CPQBA/UNICAMP



**Figura 8.** Representação do cromatograma comparativo entre *P. niruri* (Pn) e *P. amarus* (Pa), utilizando como padrões a rutina (R), isoquercetrina (IQ), quercetina (Q) e ácido cafeico (AC), e, como sistema de desenvolvimento, AcOEt : metiletilcetona : HCOOH : H<sub>2</sub>O (5:3:1:1 V/V) sobre gel de sílica GF<sub>254</sub> após revelação com solução metanólica de difenilboriloxietilamina 0,5 % (m/V).

O cromatograma foi revelado com difeniloxiletilamina 0,5 % (m/V) e observado sob luz UV em 366 nm. Para o *Phyllanthus amarus* foram detectadas seis manchas principais. Sendo uma de cor laranja e Rf de 0,33, quatro azuladas com Rf de 0,2; 0,27; 0,39 e 0,68, respectivamente, e uma mancha vermelha com Rf de 0,87. Enquanto que, para *P. niruri*, foram detectadas nove manchas. Destas, quatro manchas alaranjadas com Rf de 0,53; 0,6; 0,67 e 0,82, duas amareladas com Rf 0,73 e 0,78, uma amarelo-laranjada com Rf de 0,3, uma amarelo-esverdeada com Rf de 0,35, e por fim uma mancha vermelha com Rf de 0,87. Os padrões apresentaram valores de Rf de 0,33 para rutina, 0,6 para isoquercetrina, 0,8 para o ácido cafeico, e 0,82 para quercetina.

O relato da presença de alcalóides nas partes aéreas de *Phyllanthus niruri* L. é encontrado, seguidamente, na literatura fitoquímica, podendo conduzir à aceitação desta classe de compostos como marcador químico

(STANISLAS *et al*, 1967; ROUFFIAC e PARELLO, 1969; MULCHANDINI *et al*, 1984; JOSHI *et al*, 1986; PETCHNAREE e BUNYAPRATHATSARA, 1986). No entanto, a pesquisa de alcalóides na matéria-prima vegetal apresentou resultado negativo. Soluções extrativas obtidas com diferentes proporções do material vegetal (7,5; 20 ou 30:100 m/V), apresentaram, com o sistema cromatográfico descrito no item 4.1.1, manchas que não se alteraram quando borrifadas com o reagente de Dragendorff. Mesmo quando estes extratos foram submetidos à metodologia de extração de alcalóides (fig. 5 - p. 24) e adicionados dos reagentes de Dragendorff, Mayer, Bertrand e Bouchardt, não forneceram resultados positivos (tab. 6). É importante salientar que os dados existentes na literatura devem ser analisados com o maior cuidado, especialmente levando em conta a finalidade de seu uso. Assim, nem sempre resultados de análises fitoquímicas são relevantes para a caracterização de uma matéria-prima vegetal, pois o objetivo daqueles é, fundamentalmente, o isolamento e a identificação de compostos, sejam majoritários ou não, tenham ou não interesse farmacológico. Isto poderia ser contornado pela extração seletiva, partindo de maior quantidade do vegetal. Tal procedimento, no entanto, além de apresentar custo de análise mais elevado, necessitaria de maior número de passos analíticos, o que pode conduzir a erros adicionais.

**Tabela 6.** Ensaio preliminar para detecção de alcalóides na matéria-prima vegetal de *P. niruri* L.

Reagentes	Matéria-prima	Decoctos (m/V)		
		7,5:100	20:100	30:100
Dragendorff	NEG	NEG	NEG	NEG
Mayer	NEG	NEG	NEG	NEG
Bertrand	NEG	NEG	NEG	NEG
Bouchardat	NEG	NEG	NEG	NEG

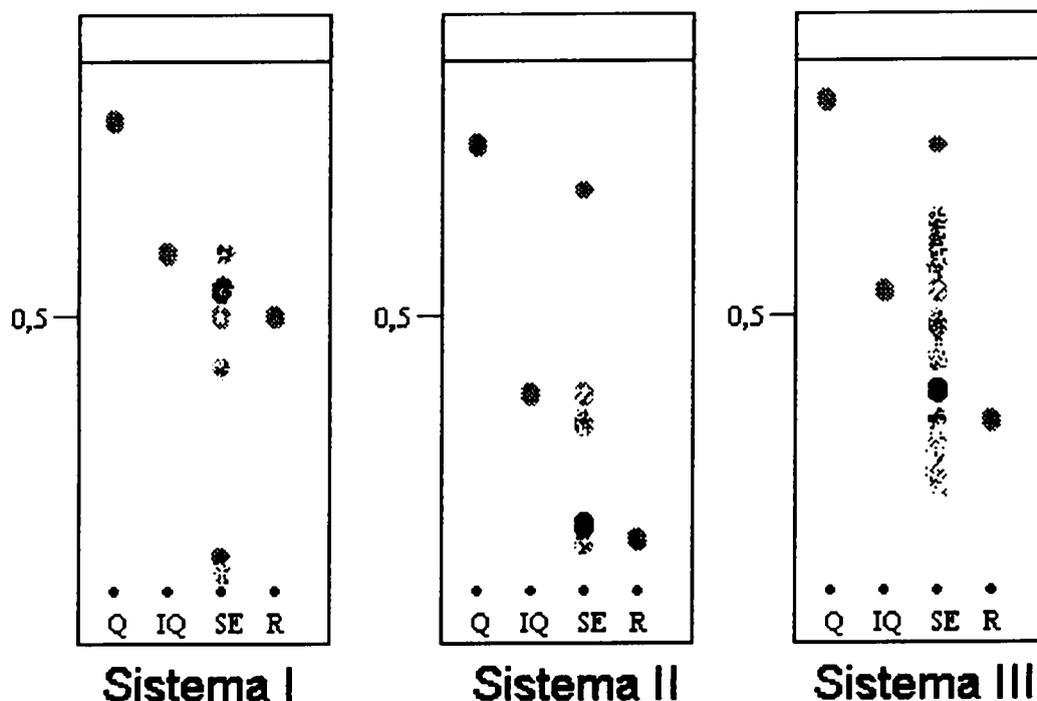
NEG = negativo

Embora flavonóides sejam compostos distribuídos largamente no reino vegetal, sua concentração e sua composição podem auxiliar na identificação e

servir de elementos de padronização de matérias-primas para produtos fitoterápicos, especialmente pela importância farmacológica dos mesmos (CODY *et al.*, 1986). O decocto das partes aéreas de *Phyllanthus niruri* L. na proporção de 7,5:100 (m/V) foi analisado cromatograficamente utilizando três sistemas eluentes e como revelador difeniloxietilamina a 0,5 % (m/V) (MABRY, 1970). Como substâncias de referência foram utilizadas soluções metanólicas de quercetina, isoquercitrina e rutina.

A análise cromatográfica empregando o sistema eluente n-butanol:ácido acético:água (4:1:5)(STAHL, 1969) e detecção sob luz UV a 366 nm revelou quatro manchas principais para uma solução extrativa aquosa (sistema I, fig. 9, p. 47), das quais duas eram amarelo-alaranjadas com valores de Rf de 0,5 e 0,58, uma amarelo-esverdeada com Rf de 0,52 e outra azul claro com Rf de 0,38. Por sua vez, as substâncias de referência apresentaram como resultados cromatográficos o aparecimento de manchas de coloração laranja com valor de Rf de 0,83 para a quercetina, 0,58 para a isoquercitrina e 0,5 para a rutina, que tiveram suas colorações intensificadas após serem borrifadas com o revelador.

O sistema eluente AcOEt:MeOH:HCOOC:H<sub>2</sub>O (80:1:8:10 V/V) (DE SOUZA, 1997) com detecção sob luz UV 366 nm resultou, para o cromatograma da solução extrativa aquosa, na detecção de seis manchas principais (sistema II) (fig. 9, p. 47). Duas amarelo-alaranjadas com Rf de 0,12 e Rf de 0,37, uma mancha amarelo-esverdeada com Rf de 0,16, uma mancha de cor azul clara com Rf de 0,31, uma mancha com Rf de 0,64 e cor amarelo vivo e, por fim, uma mancha escura de Rf de 0,75. Enquanto todas manchas tiveram suas cores intensificadas após a utilização de difenilboriloxietilamina 0,5 % (m/V), a última não apresentou alteração. As substâncias de referência apresentaram coloração amarelo-alaranjada e Rf de 0,12; 0,37 e 0,82 para rutina, isoquercitrina e quercetina, respectivamente.



**Figura 9.** Representação dos cromatogramas obtidos para solução extrativa aquosa de *P. niruri* L. (SE), quercetina (Q), isoquercitrina (IQ) e rutina (R), utilizando como sistemas eluentes n-butanol:ácido acético:água (4:1:5) (sistema I), AcOEt:MeOH:HCOOC:H<sub>2</sub>O (80:1:8:10 V/V) (sistema II) e, AcOEt:metiletilcetona:HCOOH:H<sub>2</sub>O (5:3:1:1 V/V) (sistema III), sobre gel de sílica GF<sub>254</sub> após revelação com solução metanólica de difenilboriloxietilamina 0,5 % (m/V).

Empregando o sistema eluente AcOEt:metiletilcetona:HCOOH:H<sub>2</sub>O (5:3:1:1) (sistema III) (fig. 9) e detectando-se sob luz UV a 366 nm, pode-se observar para solução extrativa aquosa a presença de cinco manchas principais. Duas apresentaram coloração laranja com R<sub>f</sub> iguais a 0,29 e 0,53, uma mancha amarelo-esverdeada com R<sub>f</sub> de 0,35, uma mancha de cor azul claro com R<sub>f</sub> de 0,46 e uma mancha escura com R<sub>f</sub> de 0,82. Enquanto todas manchas tiveram suas cores intensificadas após a utilização de difenilboriloxietilamina 0,5 % (m/V), a última não apresentou alteração. Os resultados obtidos para as substâncias de referência foram de R<sub>f</sub> de 0,29 para rutina, R<sub>f</sub> de 0,53 para isoquercitrina e R<sub>f</sub> de 0,87 para quercetina.

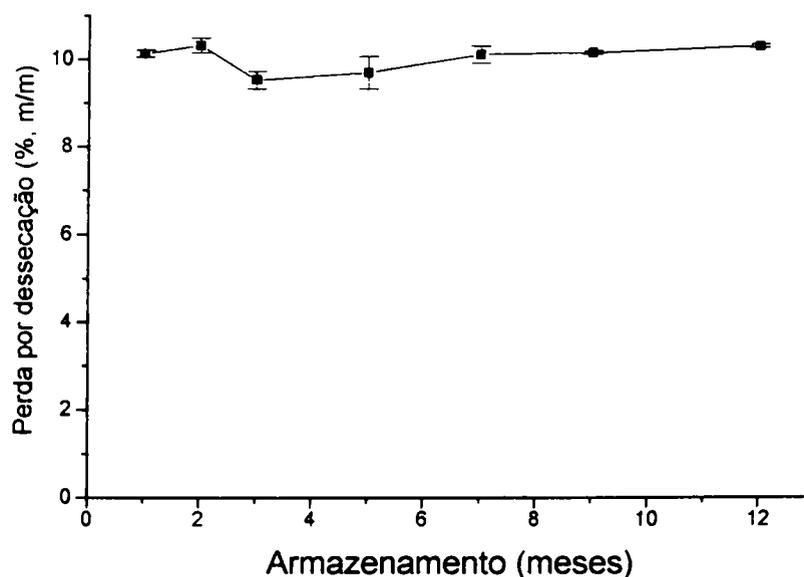
A análise cromatográfica realizada indicou a provável presença nesta solução extrativa de isoquercetrina e rutina. Estes compostos que, normalmente, não são extraídos com água como meio de extração, podem estar presentes em soluções aquosas desde que empregada a extração a quente.

O material vegetal apresentou, após secagem em estufa e tratamento posterior por moagem, umidade residual de  $10,32 \% \pm 0,14 \%$  ( $CV = 1,38 \%$ ). Este valor sofreu diminuição estatisticamente significativa após 3 meses de armazenamento, restabelecendo o valor da umidade inicial a partir do sétimo mês (tab. 7 e fig. 10). Os valores obtidos encontram-se dentro dos limites farmacopéicos máximos preconizados de 8 e 14 % (ZHI-CHEN, 1980), indicando que a operação de secagem alcançou um resultado adequado e que a matéria-prima vegetal se mantém estável nas condições de armazenamento empregadas, neste caso em potes plásticos com tampas rosqueadas.

**Tabela 7.** Perda por dessecação (PD) do material vegetal seco e moído de *P. niruri* L. em função do tempo de armazenamento (com três repetições)

Armazenamento (meses)	PD $\pm$ s (CV %) (%, m/m)
1	10,13 $\pm$ 0,08 (0,81)
2	10,32 $\pm$ 0,17 (1,63)
3	9,53 $\pm$ 0,20 (2,14)
5	9,70 $\pm$ 0,37 (3,86)
7	10,11 $\pm$ 0,20 (1,95)
9	10,15 $\pm$ 0,04 (0,35)
12	10,29 $\pm$ 0,04 (0,37)
PD média	10,03 $\pm$ 0,30 (2,99)

ANOVA: gl (dentro) 16; gl (entre) 7,  $\alpha = 0,05$ , Fcalc: 7,5; Fcrit: 2,7



**Figura 10.** Representação gráfica da perda por dessecação do material vegetal de *P. niruri* L. em função do tempo de armazenamento.

O teor de extrativos da matéria-prima vegetal compreende um parâmetro de avaliação da qualidade. Através do exame do rendimento da extração de substâncias solúveis em um determinado líquido extrator, sem que signifique necessariamente a extração das substâncias ativas, pode-se caracterizar a matéria-prima vegetal, permitindo estabelecer mais um parâmetro de comparação entre matérias-primas vegetais de diversas procedências. Para a matéria-prima vegetal *Phyllanthus niruri* L. fornecida pelo CPQBA/UNICAMP, coletada em janeiro de 1996, o teor de extrativos obtido em solvente aquoso (TE) encontra-se expresso na tabela 8. A determinação foi realizada através de seis repetições utilizando três pesa-filtros por repetição.

**Tabela 8.** Teor de extrativos (TE) da matéria-prima vegetal de *P. niruri* L.

Amostra (g)	Resíduo seco (g) $x \pm s$ (CV %)	TE (m/m) $x \pm s$ (CV %)
$1,0013 \pm 0,0006$	$0,0633 \pm 0,0025$ (3,87)	$31,60 \pm 1,2187$ (3,85)

A granulometria da droga é considerada como um dos fatores determinantes na homogeneidade e reprodutibilidade da operação extrativa. Em comparação com a droga íntegra, a droga rasurada ou moída, obviamente, apresentam maior superfície de contato com o líquido de extrator, além de possuir maior proporção de células cujas paredes encontram-se rompidas, proporcionando maior exposição dos conteúdos celulares ao solvente. Entretanto, partículas excessivamente finas podem dificultar a separação do marco no final da extração (VOIGT, 1993).

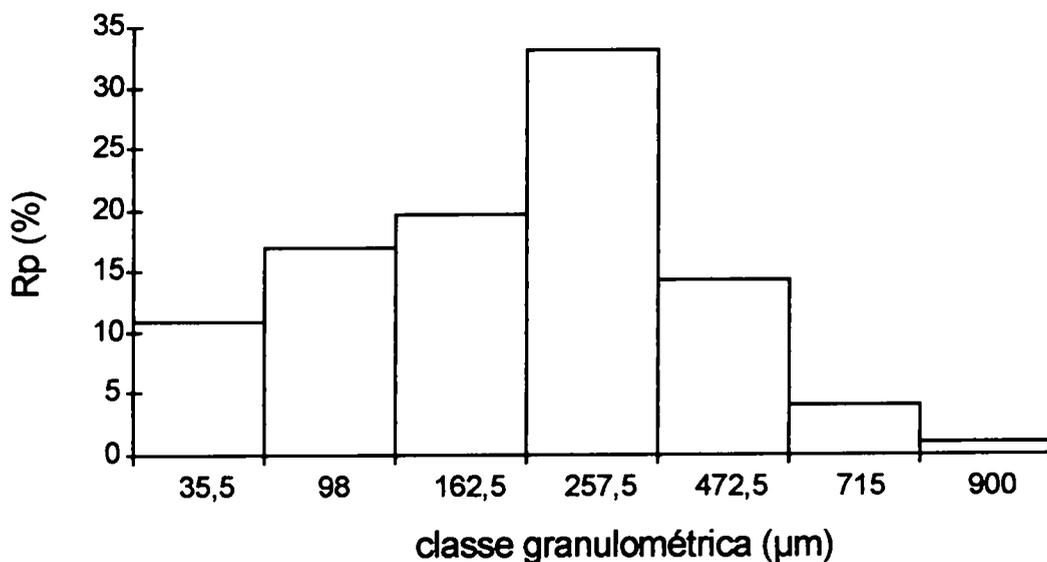
A distribuição granulométrica da droga vegetal moída encontra-se expressa na tabela 9 e figura 11.

**Tabela 9.** Granulometria da matéria-prima vegetal seca e moída de *P. niruri* L.

L. Inf. Classe (µm)	L. Sup. Classe (µm)	Média (µm)	intervalo abertura (µm)	R(g%)	Rp(g%)	Soma Rp(g%)	Resíduo (g%)	Passagem (g%)
0	71	35,5	71	6,24	0,088	10,87	6,24	93,76
71	125	98	54	7,44	0,138	17,04	13,68	86,32
125	200	162,5	75	11,90	0,159	19,62	25,58	74,42
200	315	257,5	115	30,82	0,268	33,14	56,4	43,6
315	630	472,5	315	36,42	0,116	14,29	92,82	7,18
630	800	715	170	5,57	0,033	4,05	98,39	1,61
800	1000	900	200	1,61	0,008	0,99	100	0

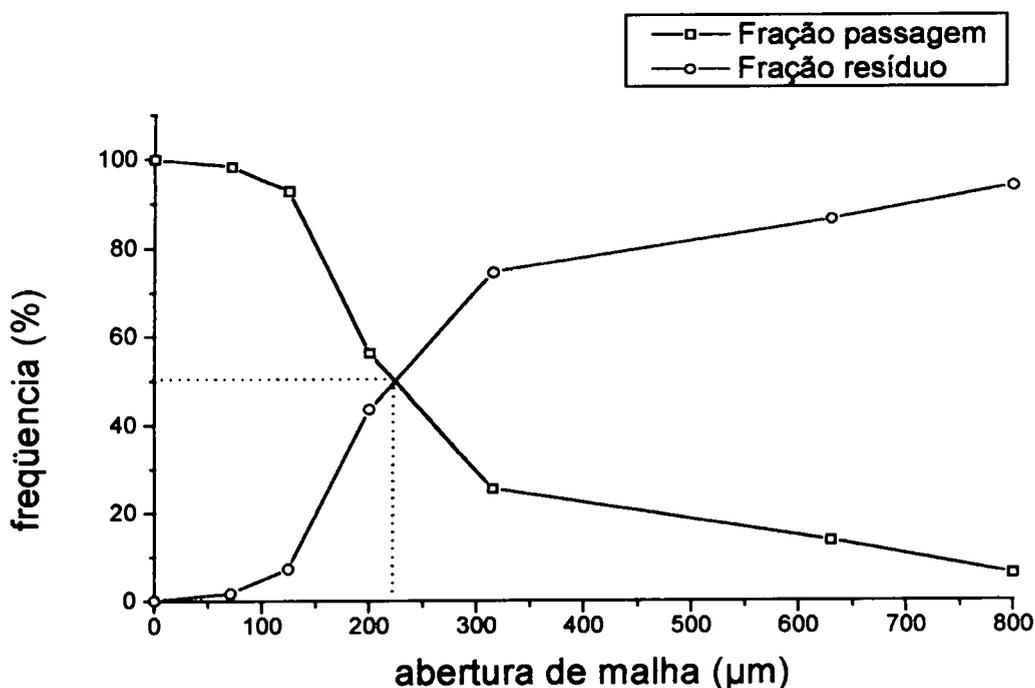
L. Inf. = limite inferior; L. Sup. = limite superior; R(g%) = retido em g%; Rp(g%) = retido ponderal em g%

Os resultados obtidos com a determinação da distribuição granulométrica demonstraram que as classes granulométricas predominantes concentram-se entre os tamises com abertura de malha de 125 e 315 µm, correspondendo a 67,05 % de todo o material.



**Figura 11.** Representação gráfica da distribuição granulométrica da droga vegetal seca e moída de *P. niruri* L.

A granulometria média de 0,22 mm foi determinada graficamente pela interseção das curvas de retenção e passagem da droga moída através da análise granulométrica por tamisação, dos dados experimentais (fig. 12).



**Figura 12.** Curva cumulativa de retenção e passagem após tamisação da droga vegetal seca e moída de *P. niruri* L.

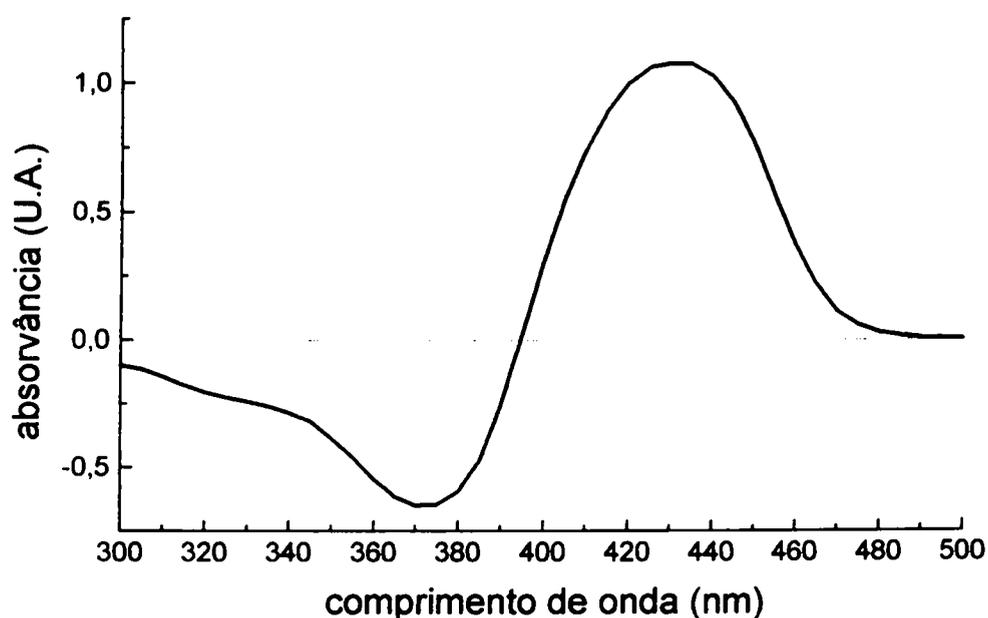
A determinação quantitativa de substâncias ativas em drogas vegetais representa um dos parâmetros de qualidade mais importantes. Para tanto devem ser selecionadas preferencialmente substâncias ou grupos de substâncias específicas para a droga vegetal e com atividade biológica relacionada. Entretanto, muitos são os casos em que o grupo de substâncias responsáveis por determinada atividade ainda não está estabelecido. Desta forma, grupos de substâncias que sejam reconhecidos pelas propriedades terapêuticas podem ser empregados como marcadores para análise quantitativa. Para o *Phyllanthus niruri* L. não há relatos sobre qual grupo de substâncias seja responsável pela atividade terapêutica. Assim, uma escolha analítica adequada pode recair sobre os flavonóides. Estes apresentam-se como componentes químicos majoritários (NARA *et al.*, 1977) e suas propriedades químicas e farmacológicas são descritas na literatura (CODY *et al.*, 1986).

A quantificação dos flavonóides, freqüentemente baseia-se em sua capacidade de formar complexos com cloreto de alumínio (MABRY, 1970). Fundamentando-se nesta propriedade, alguns códigos oficiais propõem metodologias de quantificação espectrofotométricas. As metodologias propostas diferenciam-se, quanto à preparação da amostra, segundo o tipo de ligação entre a aglicona flavonoídica e o componente osídico. Para drogas vegetais ricas em flavonóides do tipo C-glicosilados, a quantificação proposta por SCHMIDT e GONZÁLEZ ORTEGA (1993) prevê um doseamento direto destes compostos nas soluções extrativas. Para droga vegetais ricas em flavonóides do tipo O-glicosilados, a quantificação, na metodologia preconizada pela Farmacopéia Alemã (DEUTSCHES, 1992), é realizada após a hidrólise ácida e extração com solvente orgânico.

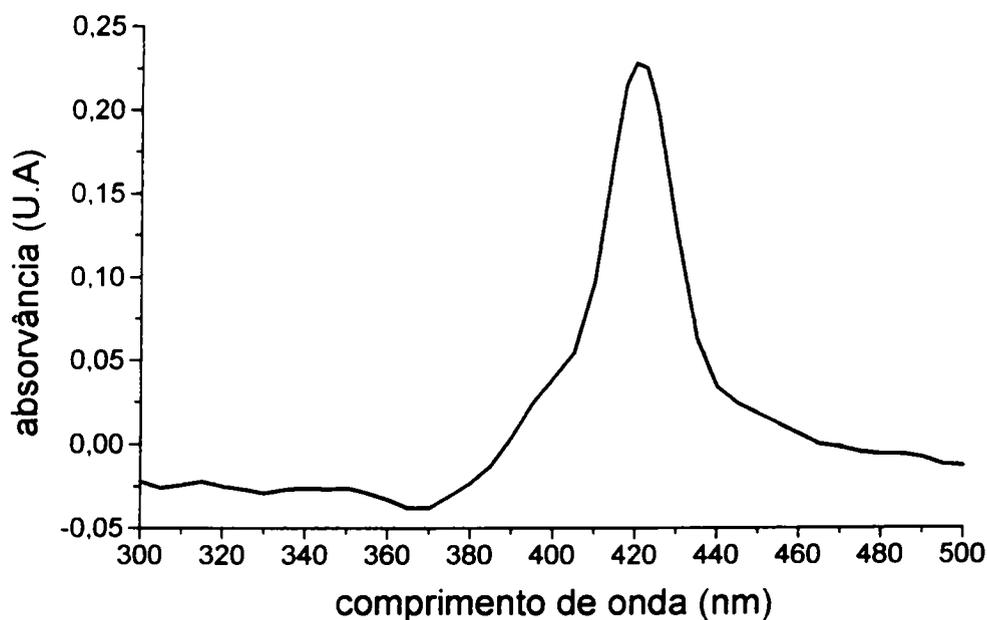
Para partes aéreas de *P. niruri*, os compostos flavonoídicos relatados são do tipo O-glicosilados e devido a isto, a metodologia mais adequada para sua quantificação é a preconizada pela Farmacopéia Alemã. Entretanto, para a aplicação desta técnica ao material vegetal em estudo é necessária a

realização de ensaios de adequabilidade e de validação que assegurem os resultados obtidos e que garantam a repetibilidade e reprodutibilidade dos mesmos.

Para determinação do comprimento de onda de leitura, foi realizada uma análise comparativa entre o espectro de varredura de uma solução de quercetina- $\text{AlCl}_3$  obtida a partir da hidrólise de rutina (fig. 13) e o espectro de varredura da solução amostra obtida a partir droga seca tratada segundo o item 4.1.5. (fig. 14). Os resultados demonstraram que ambos os espectros possuem absorção máxima entre 420 e 430 nm, sendo portanto, utilizado o comprimento de onda de 420 nm.



**Figura 13.** Representação do espectro de varredura do complexo quercetina- $\text{AlCl}_3$



**Figura 14.** Representação do espectro de varredura da solução amostra obtida através da metodologia de quantificação de flavonóides na matéria-prima vegetal de *P. niruri* L. segundo o item 4.1.5

Na região em que se obteve o máximo de absorvância deve-se observar que outros compostos flavonoídicos relatados para *P. niruri*, tais como astragalina, quercetrina, isoquercetrina (NARA *et al*, 1977) e canferol 4'-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosídeo (CHAUHAN, 1977), cujas agliconas são quercetina e canferol, respectivamente, quando complexados com  $AlCl_3$  apresentam  $\lambda_{max}$  em 428 nm (MABRY, 1970).

Outro fator importante na validação de uma metodologia analítica é a linearidade e o estabelecimento da faixa em que o método é linear. Assim, empregaram-se quantidades crescentes de droga vegetal seca e moída, submetendo-as à metodologia descrita no item 4.1.5. Através da comparação entre o valor experimental para o teor de flavonóides totais e o valor calculado (tab. 10) pode-se observar o comportamento aparentemente não-linear entre ambos. Este fato sugere a existência de um *erro sistemático proporcional*, ou seja, um erro ligado ao aumento da quantidade de droga vegetal. Vários fatores

podem estar relacionados com tal comportamento, tais como, a saturação do meio solvente pelas substâncias extraíveis ou a reação de complexação entre o cloreto de alumínio e os compostos em estudo, que tem demonstrado um comportamento não-linear e de cinética complexa (DE SOUZA, 1997).

**Tabela 10.** Variação do teor de flavonóides totais (TFT) em função da quantidade de amostra de droga vegetal de *P. niruri* L.

Amostra (g)	$\Delta$ Conc.	TFT (g%) experimental	TFT (g%) calculado	TFT <sub>exp</sub> - TFT <sub>calc.</sub>	$\Delta\%$ TFT <sub>exp</sub>
0,400	-	0,819	0,819	-	-
0,750	1,8750	0,826	0,820	0,006	0,67
1,125	2,8125	0,790	0,820	- 0,030	3,75
1,500	3,7500	0,706	0,819	- 0,113	16,14
1,850	4,6250	0,677	0,820	- 0,143	21,06

$\Delta$  Conc. = variação de concentração; TFT = teor de flavonóides totais;  $\Delta\%$ TFT<sub>exp</sub> = diferença percentual entre TFT calculado e experimental

A análise dos resultados obtidos (tab. 10 e fig. 15) demonstra porém um comportamento linear para o valor do teor de flavonóides totais na faixa de 0,400 a 1,125 g de droga seca (fig. 15) indicando que, nesta zona de concentração, a quantificação não sofre variações relevantes.

Por outro lado, nesta região de concentração da droga, atinge-se o máximo de rendimento de extração das substâncias em avaliação. Assim, utilizando a faixa linear da relação, o resultado obtido para o teor de flavonóides totais foi de  $0,80 \pm 0,031$  g % (m/m). A repetibilidade entre os dados de 3,82 % (n=6) é aceitável considerando o número de passos da técnica.

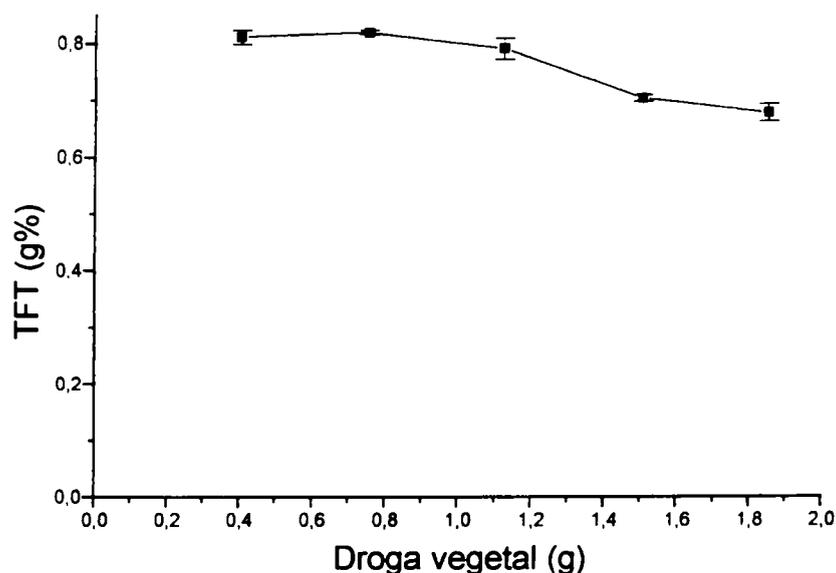
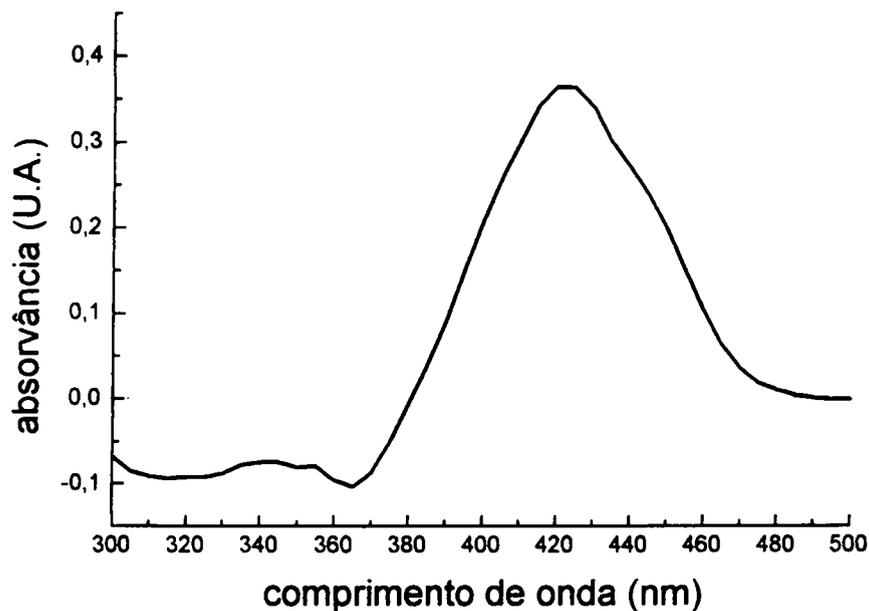


Figura 15. Relação entre a quantidade de droga seca vegetal de *P. niruri* L. e o teor de flavonóides totais (TFT).

## 5.2 Solução extrativa

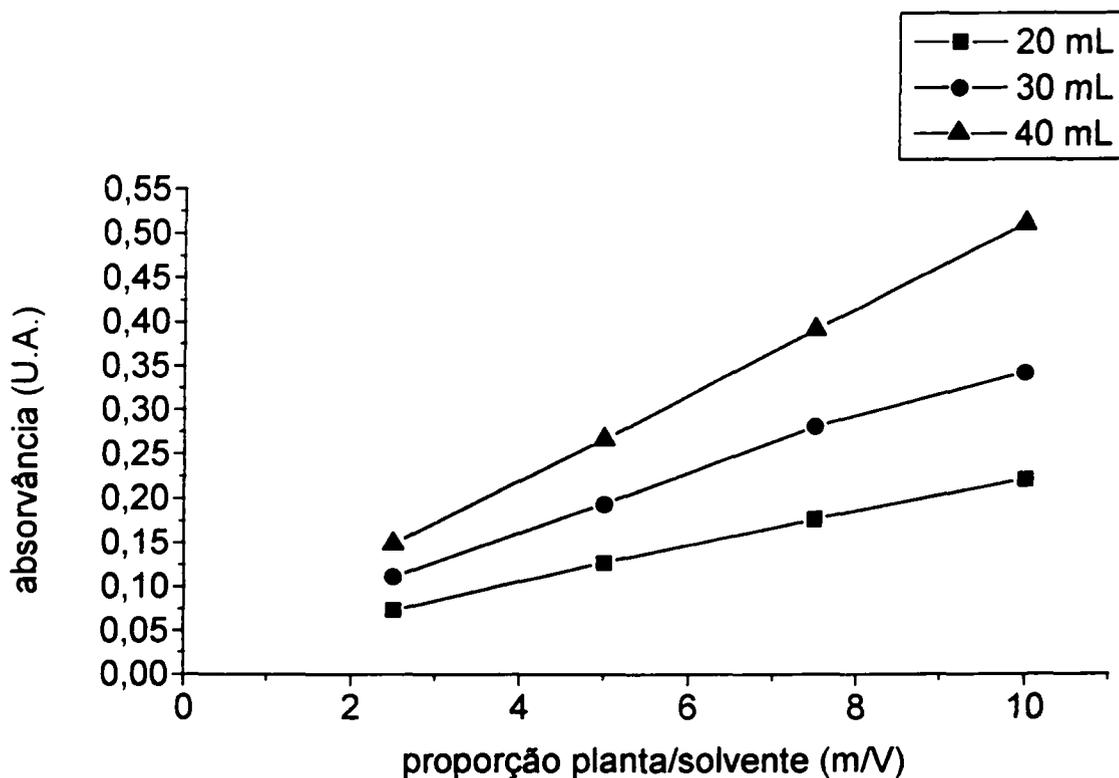
A quantificação de substâncias marcadoras em extrativos vegetais é um dos parâmetros mais importantes para avaliar a eficiência de extração e a estabilidade durante o processamento. Entretanto, a metodologia quantitativa empregada para a matéria-prima vegetal nem sempre pode ser aplicada, sem adaptações na avaliação da concentração das substâncias marcadoras em soluções extrativas. Para adotar uma metodologia analítica de extratos é necessário, inicialmente, a realização de estudos que assegurem a sua adequação às características da amostra assim como a sua validação, minimizando ou excluindo possíveis erros ligados à técnica. Entre estes destacam-se a determinação do comprimento de onda ideal de medida, da linearidade, da presença de erros sistemáticos, da repetibilidade e da reprodutibilidade.

Para soluções extrativas aquosas de *P. niruri* a escolha baseou-se na semelhança entre o espectro de varredura a partir de uma solução de rutina padrão hidrolizada, após complexação com cloreto de alumínio (fig. 13), e o espectro de varredura da solução extrativa resultante da metodologia de hidrólise ácida descrita no item 4.2.1.2. p. 31 (fig. 16). Ambos os espectros apresentaram um máximo de absorção entre os comprimentos de onda de 420 a 430 nm.



**Figura 16.** Representação do espectro de varredura da solução extrativa aquosa de *P. niruri* L. após hidrólise e complexação de flavonóides com  $\text{AlCl}_3$

A viabilidade da metodologia de quantificação de flavonóides em extratos aquosos de *Phyllanthus niruri* L. foi avaliada através de estudo da linearidade. Desta forma, foram construídas curvas empregando soluções extrativas nas proporções planta/solvente, de 2,5; 5; 7,5 e 10:100 (m/V) em três níveis, determinados pelo emprego de alíquotas de 20, 30 e 40 mL da solução-mãe **SM** (item 4.2.1.2). As curvas obtidas estão representadas na figura 17.



**Figura 17.** Curvas obtidas a partir da absorvância do complexo  $\text{AlCl}_3$ -flavonóide em soluções extrativas de diferentes proporções planta/solvente, utilizando alíquotas de 20, 30 e 40 ml da solução mãe (**SM**)

A análise estatística das curvas obtidas (tab. 11), através da determinação dos limites de confiança para as inclinações das retas ( $b$ ), demonstrou a existência de diferenças estatisticamente significantes entre todas as curvas, decorrente do aumento da alíquota de **SM**.

**Tabela 11.** Dados da análise estatística da correlação entre a concentração de droga na solução extrativa e a absorvância do complexo flavonóide- $\text{AlCl}_3$ , segundo equação de primeira ordem ( $y = a + bx$ ), considerando a alíquota da solução mãe (**SM**)

SM (ml)	inclinação ( $b \pm s$ )	Lb	interseção ( $a \pm s$ )	La	$r^2$
20	$0,0196 \pm 0,0006$	0,0206 a 0,0187	$0,0268 \pm 0,0040$	0,0332 a - 0,0204	0,9982
30	$0,0312 \pm 0,0016$	0,0337 a 0,0287	$0,037 \pm 0,0111$	0,0547 a 0,0193	0,9946
40	$0,0485 \pm 0,0004$	0,0492 a 0,0478	$0,0265 \pm 0,0029$	0,0311 a 0,0219	0,9998

Lb = limites de confiança para inclinação; La = limites de confiança para interseção

A determinação dos limites de confiança dos pontos de interseção permite inferir sobre a presença ou não de erro sistemático constante no método. Os limites de confiança calculados para o ponto de interseção obtidos pela regressão da curva em que foram utilizadas alíquotas de 20 ml de **SM** incluem o valor zero. Isto significa que a reta calculada passa pelo ponto de origem dos eixos ou muito próximo ao mesmo, demonstrando a ausência de erro sistemático constante. Entretanto, os limites de confiança obtidos para as curvas construídas empregando alíquotas de 30 e 40 mL não incluem o valor zero. A exclusão deste valor nos limites de confiança para a curva obtida pelo emprego de alíquotas de 30 ml de **SM** pode ser decorrente do comportamento não-linear, o que se deduz através do baixo coeficiente de correlação linear ( $r^2$ ). O mesmo não pode ser dito da curva resultante do emprego de alíquotas de 40 ml de **SM**. O valor calculado para o coeficiente de correlação linear sugere um comportamento linear para esta curva. A comparação entre os valores de absorvância experimental e calculados indicam um comportamento semelhante. Ao mesmo tempo, do confronto das absorvâncias calculadas pela equação da reta, onde o ponto de interseção (a) é diferente de zero ( $y_2$ ) com os valores de absorvância, considerando o ponto de interseção (a) igual a zero, percebe-se uma diferença constante de 0,026 unidades de absorvância (tab. 12).

**Tabela 12:** Avaliação do erro sistemático constante para curva de calibração com alíquotas de 40 ml de **SM**

x	y <sub>1</sub> (experimental)	y <sub>2</sub> (calculado)	y <sub>3</sub> sem erro (a = 0)	Δy <sub>2,y3</sub> (%)
2,5	0,148	0,148	0,121	18,24
5,0	0,266	0,269	0,243	9,85
7,5	0,391	0,390	0,364	6,7
10,0	0,504	0,511	0,485	5,3

x = relação planta/solvente (g/100 mL de água); y<sub>i</sub> = absorvância; a = ponto de interseção com o eixo de y

Para quantificação de flavonóides totais em soluções extrativas aquosas de *Phyllanthus niruri* L., foi selecionada a alíquota de 20 mL de **SM**, devido ao comportamento linear na faixa de concentração estudada e à ausência de erros sistemáticos.

A seleção da solução extrativa utilizada no trabalho foi realizada através da análise fatorial do tipo 2<sup>3</sup>. A influência dos fatores estudados foi avaliada considerando o teor de flavonóides totais nas soluções extrativas.

Os fatores escolhidos para a realização do experimento foram: a metodologia de extração (fator A), a relação planta/solvente (fator B) e o tempo de extração (fator C). Para o fator metodologia de extração foram selecionados como níveis qualitativos a decocção e a infusão. Estes níveis foram eleitos baseando-se nos dados existentes para ensaios pré-clínicos e clínicos (SANTOS, 1990). Esta mesma consideração, adicionada ao estudo da faixa linear de resposta visto anteriormente, fundamentaram a opção dos níveis do fator B. A definição dos níveis do terceiro fator, tempo de extração, foi realizada através de ensaio preliminar, onde foram fixadas a decocção, como método de extração, e a relação droga solvente de 7,5:100 (m/V). Nos valores de tempo experimentados não se observou diferença significativa na eficiência de extração de flavonóides (tab. 13). Optou-se para este fator por um tempo fora dos limites estudados e pelo tempo intermediário, ou seja 5 e 15 minutos.

**Tabela 13.** Influência do tempo de extração sobre o teor de flavonóides totais (TFT) em decoctos aquosos de *P. niruri* L. na relação planta:solvente de 7,5:100 (m/V).

Tempo (minutos)	TFT (g%)
10	0,0085
20	0,0089
30	0,0088
$\bar{x} \pm s$ (CV %)	0,00873 $\pm$ 0,00021 (2,40)

Os resultados obtidos para teor de flavonóides totais (TFT) através do planejamento fatorial (tab. 14) foram submetidos à análise da variância (ANOVA) de uma entrada, para verificar qual a origem dos efeitos e/ou interações. Desta maneira pode-se avaliar se a oscilação dos valores do teor de flavonóides totais de cada tratamento foi resultante de variações dentro dos grupos ou provocada pelos tratamentos (tab. 15).

**Tabela 14.** Teor de flavonóides totais (TFT x 10<sup>4</sup>) para soluções extrativas aquosas de *P. niruri* L.

Repetição	Tratamentos							
	(1)	a	b	ab	c	ac	bc	abc
1	20,83	27,92	52,08	74,58	20,83	31,67	56,67	77,08
2	19,58	28,33	49,17	74,17	20,83	32,08	54,17	75,83
3	19,58	27,92	50,00	74,58	20,42	31,67	54,58	77,08
média	20,00	28,06	50,42	74,44	20,69	31,81	55,14	76,67
± s	0,72	0,24	1,50	0,24	0,24	0,24	1,34	0,72
CV (%)	3,61	0,84	2,97	0,32	1,15	0,75	2,43	0,94

**Tabela 15.** Análise da variância dos resultados do experimento fatorial empregando ANOVA.

Fonte de variação	gl	Soma dos Quadrados	Média dos Quadrados	F calculado
Entre Tratamentos	7	11033,37	1576,195	2374,35***
Dentro Tratamento	16	10,62	0,664	
Total	23	11043,99		

Fcrit 0,05[7,16] ≤ 2,71\*; Fcrit 0,025[7,16] ≤ 3,29\*\*; Fcrit 0,01[7,16] ≤ 4,14\*\*\*

A análise da variância (ANOVA) (tab. 15) demonstrou que a mudança dos níveis dos fatores, utilizados no planejamento fatorial, apresenta efeito altamente significativo ( $P < 0,01$ ) sobre a extração de flavonóides totais. Entretanto apenas este teste estatístico não possibilita afirmar que todos os

tratamentos são estatisticamente diferentes. Para avaliar quais os tratamentos são diferentes entre si, procedeu-se a comparação entre as médias do teor de flavonóides totais para cada tratamento empregando o teste de Student-Newman-Keuls. O resultado obtido demonstrou que apenas o tratamento "c" não apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao tratamento (1), ou seja, o valor obtido para o teor de flavonóides totais no tratamento "c" não é estatisticamente diferente do valor do teor de flavonóides para o tratamento (1) considerando  $\alpha \leq 0,05$  (tab. 16).

**Tabela 16.** Resultado da comparação das médias do teor de flavonóides totais através do teste de Student-Newman-Keuls.

Tratamentos	Diferença de médias	p
abc x (1) *	56,667	141,40
abc x c *	55,970	139,66
abc x a *	48,607	121,29
abc x ac *	44,857	111,93
abc x b *	26,247	65,49
abc x bc *	21,523	53,71
abc x ab *	2,220	5,54
ab x (1) *	54,447	135,86
ab x c *	53,750	134,12
ab x a *	46,387	115,75
ab x ac *	42,637	106,39
ab x b *	24,027	59,95
ab x bc *	19,303	48,17
bc x (1) *	35,143	87,69
bc x c *	34,447	85,95
bc x a *	27,083	67,58
bc x ac *	23,333	58,22
bc x b *	4,723	11,79
b x (1) *	30,420	75,91
b x c *	29,723	74,17
b x a *	22,360	55,80
b x ac *	18,610	46,44
ac x (1) *	11,810	29,47
ac x c *	11,113	27,73
ac x a *	3,750	9,36
a x (1) *	8,060	20,11
a x c *	7,363	18,37
c x (1)	0,697	1,74

\* valores estatisticamente não significantes para  $\alpha \leq 0,05$

Uma avaliação inicial do tipo e da intensidade dos efeitos e das interações entre os diversos fatores estudados sobre o teor de flavonóides presentes nos extratos aquosos pode ser visualizada através dos resultados obtidos diretamente da forma padrão de um planejamento fatorial (tab. 17)

**Tabela 17.** Efeitos e interações (E/I) calculados a partir da forma padrão do planejamento fatorial sobre o teor de flavonóides totais em soluções extrativas aquosas de *P. niruri* L..

Efeito/Interação	Valor estimado
E <sub>A</sub>	+16,18
E <sub>B</sub>	+39,03
E <sub>C</sub>	+3,30
I <sub>AB</sub>	+2,85
I <sub>AC</sub>	+0,07
I <sub>BC</sub>	+0,31
I <sub>ABC</sub>	-0,69

A análise dos dados da tabela 17 demonstra que, entre os fatores principais, a passagem dos níveis inferiores para os superiores proporcionou um aumento no teor de flavonóides totais. A decocção (nível superior) foi mais efetiva na extração dos marcadores do que a infusão (nível inferior). Este aumento pode ser explicado pela propriedade hidrófoba deste grupo de substâncias, a qual é contornada pelo aporte de calor no processo extrativo. Desta forma, a manutenção de calor durante todo o processo de extração, no caso da decocção, é a provável responsável pelo efeito positivo. O aumento da relação planta/solvente (fator B) influencia positivamente a concentração de flavonóides totais extraídos, o que quer dizer que, quando este fator muda do nível inferior (relação planta/solvente = 2,5:100; m/V) para o nível superior (relação planta/solvente = 7,5:100; m/V), há aumento da eficiência de extração destas substâncias. Entretanto, a intensidade do fator B é aproximadamente duas vezes maior que a do fator A. O fator C (tempo de extração) aparenta também ter efeito sobre a quantidade de flavonóides totais. O aumento do tempo de contato entre a droga e o solvente produziu um incremento no teor de flavonóides extraído. O efeito causado pela passagem do nível inferior (tempo de 5 min) para o nível superior (tempo de 15 min) causou, entretanto, influência

menor do que os outros dois anteriormente citados. As interações secundárias parecem influir positivamente sobre o rendimento de extração. Entre estas, a de maior intensidade foi a interação entre os fatores A e B. Quando os fatores A e B passam simultaneamente do nível inferior [A = infusão e B = 2,5:100 (m/V)] para o nível superior, o teor de flavonóides sofre um aumento. As demais interações apresentam influência diminuta, quando comparadas aos efeitos principais e interação AB.

Os resultados obtidos na tabela 17 devem, no entanto, ser compreendidos como indicadores de tendência, necessitando comprovação estatística.

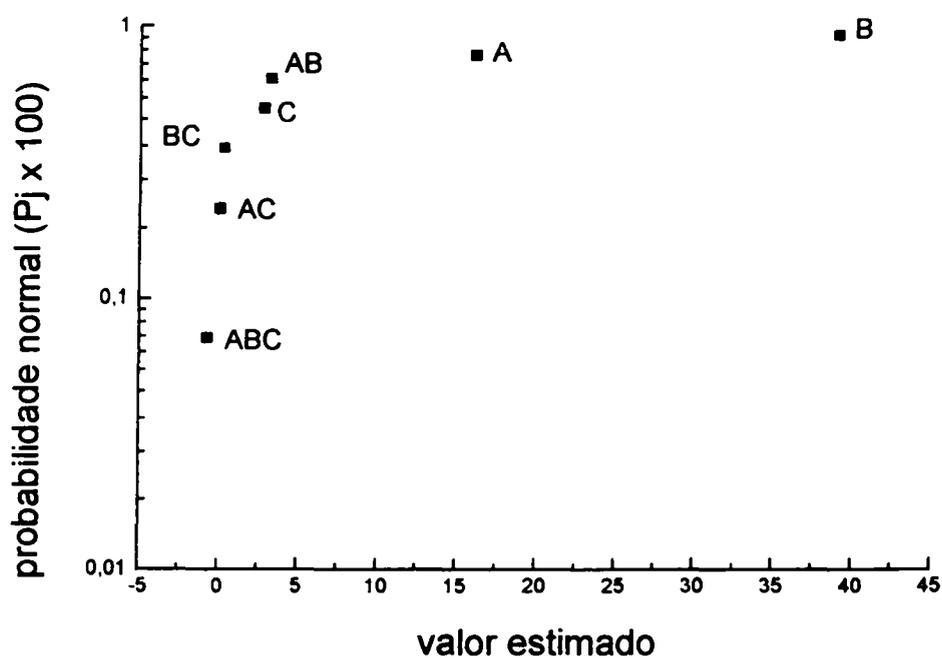
A estimativa de erros neste tipo de planejamento fatorial consiste em supor que determinadas interações de ordem superior não apresentam influência importante e em combinar seus quadrados médios para estimar o erro. Quando se observam interações de ordem superior, o uso do quadrado médio do erro obtido por combinação ou agrupamentos de interações de ordem superior é inadequado. Entretanto o método de análise proposto por DANIEL (1959) representa um meio sensível de superar este problema. O método consiste em representar os efeitos estimados em rede de probabilidade normal. Os efeitos não importantes distribuem-se normalmente com média igual a zero, tendendo a situar-se ao longo de uma linha reta neste gráfico, enquanto efeitos importantes significantes, com médias distintas de zero, não se situam ao longo desta reta (MONTGOMERY, 1991).

Para análise do planejamento fatorial realizado, os efeitos estimados foram ordenados por intensidade (tab. 18) e representados em rede de probabilidade normal (fig. 18).

**Tabela 18.** Dados para determinação dos efeitos e interações não importantes

Ordem (j)	Efeito/Interação	Valor estimado	P <sub>j</sub>
7	B	39,03	0,9286
6	A	16,18	0,7857
5	AB	3,30	0,6429
4	C	2,85	0,5000
3	BC	0,31	0,3571
2	AC	0,07	0,2143
1	ABC	-0,69	0,0714

$$P_j = (j-0,5)/7$$



**Figura 18.** Representação gráfica em rede de probabilidade normal dos efeitos estimados a partir da forma padrão do planejamento fatorial sobre o teor de flavonóides totais em soluções extrativas aquosas de *P. niruri* L..

O gráfico da probabilidade normal dos efeitos estimados, apresentado na figura 18, demonstra que os efeitos A, B e C, e a interação AB merecem interpretação. As interações AC, BC e ABC não são importantes.

A análise da variância dos dados obtidos para os efeitos e interações foi realizada pelo cálculo da média dos quadrados segundo YATES (1937). O erro foi calculado como a média simples das interações que não apresentam influência importante identificadas pelo gráfico da figura 18 e assinaladas na tabela 19 como não significante (NS).

**Tabela 19.** Análise da variância dos efeitos e interações para o teor de flavonóides totais obtidos em soluções extrativas aquosas de *P. niruri* L.

Efeito/Interação	gl	MS	Fcalc.
A	1	523,62	336 ***
B	1	3046,33	1954 ***
AB	1	87,05	56 **
C	1	16,21	10
AC	1	0,04	NS
BC	1	0,78	NS
ABC	1	3,86	NS
Total	7	3678	
Erro		1,5593	

Fcrit.:  $\alpha \leq 0,05 = 18,5^*$ ;  $\alpha \leq 0,025 = 38,5^{**}$ ;  $\alpha \leq 0,01 = 98,5^{***}$

A análise da variância demonstrou que os fatores A e B apresentaram influência altamente significativa sobre a extração de flavonóides ( $\alpha \leq 0,01$ ), tendo se apresentado o fator B cerca de 6 vezes mais intenso que o fator A. O efeito do fator C não foi estatisticamente significativo e a interação AB apresentou influência significativa ( $\alpha \leq 0,05$ ), demonstrando sua importância no experimento.

Outra técnica para avaliar a existência de interações significantes é realizada através da representação gráfica dos valores obtidos para o teor de flavonóides em ambos os níveis do fator A com relação aos níveis do fator B. Quando as retas obtidas são paralelas não há interação entre os fatores. No caso contrário, a interação entre os fatores estudados é significativa (fig. 21). Entretanto este método não deve ser a única maneira para análise dos dados, pois sua interpretação é muito subjetiva (MONTGOMERY, 1991). Como pode-se observar, as curvas obtidas na figura 19 apresentam perda de paralelismo, sugerindo uma interação ainda que, reduzida, entre os fatores. Este fato também pôde ser observado na tabela da análise da variância.

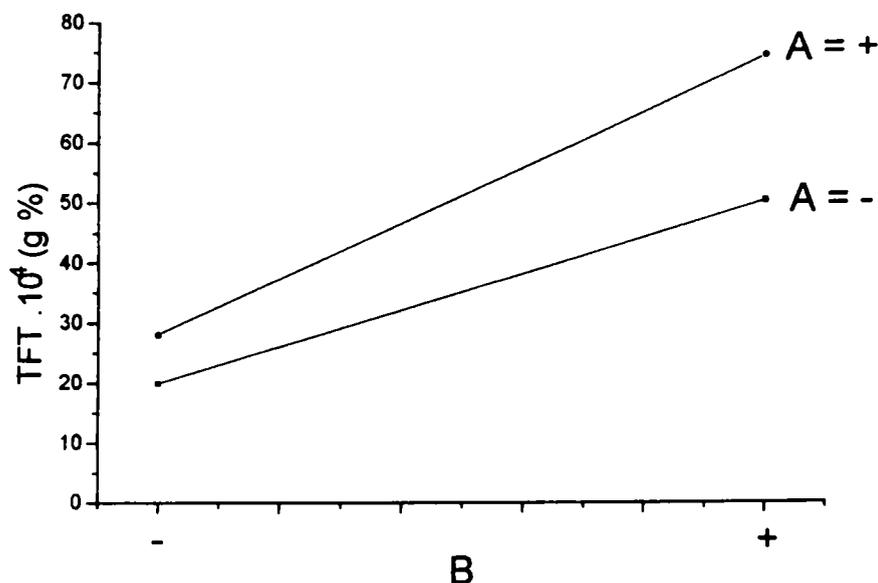


Figura 19. Representação gráfica da interação AB para o desenho fatorial  $2^3$ .

Antes de aceitar os resultados obtidos é necessário realizar um teste de ajuste de modelo com o objetivo de comprovar se o modelo empregado para análise dos fatores é adequado. A principal técnica para comprovação deste modelo é realizada através da análise dos resíduos (MONTGOMERY, 1991). Nossa análise indica que os únicos efeitos significativos são  $A = 28,06$ ;  $B = 50,42$  e  $AB = 74,44$ . Caso este resultado seja verdadeiro, o teor de flavonóides estimado nos vértices do desenho será:

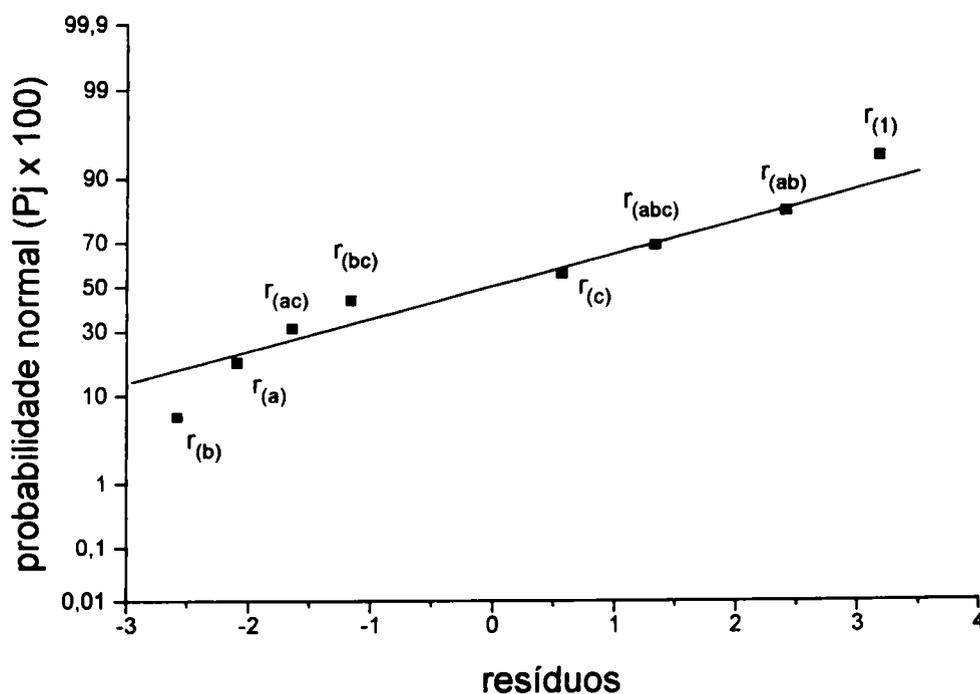
$$\text{TFT calculado} = 45 + (28,06 \div 2)x_1 + (50,42 \div 2)x_2 + (74,44 \div 2)x_1x_2$$

onde: 45 = valor médio do teor de flavonóides, e as variáveis  $x_1$  e  $x_2$ , assumem os valores +1 ou -1.

**Tabela 20.** Resíduos para o planejamento fatorial  $2^3$  empregando soluções extrativas de *P. niruri* L.

Tratamentos	TFT ( $\times 10^4$ ) exp.	TFT calculado	Resíduo
(1)	20,00	16,82	3,18
a	28,06	30,15	-2,09
b	50,42	53,00	-2,58
ab	74,44	72,03	2,41
c	20,69	20,12	0,57
ac	31,81	33,45	-1,64
bc	55,14	56,30	-1,16
abc	76,67	75,33	1,34

TFT = teor de flavonóides totais; exp. = experimental



**Figura 20.** Representação gráfica em rede de probabilidade normal para análise dos resíduos do planejamento fatorial

O comportamento razoavelmente linear obtido para os valores dos resíduos (tab. 20) em rede de probabilidade normal (fig. 20) permite concluir que o modelo fatorial empregado é satisfatório.

Diante dos resultados obtidos pelo planejamento fatorial, a solução extrativa de escolha para o ensaio de caracterização e subsequente desenvolvimento do produto seco por aspersão foi a resultante do emprego do nível superior do fator A (decoção), no nível superior para o fator B (relação planta/solvente = 7,5:100 (m/V)). Para a eleição do fator C (tempo de extração), como não apresentou influência estatisticamente significativa e os dados etnofarmacológicos demonstram que o tempo de extração empregado se encontra entre 10 e 30 minutos, foi determinado o tempo de 15 minutos (SANTOS, 1990).

Na caracterização da solução extrativa foi determinado o teor de resíduo seco (RS), que expressa a capacidade de extração de solutos presentes na droga pelo solvente. O resultado obtido foi de  $2,13 \pm 0,01$  (% m/m) (CV = 4,34 %) e tem especial interesse para o desenvolvimento de produtos secos por aspersão, uma vez que o mesmo influencia o rendimento da operação de secagem e as características do produto seco (TEIXEIRA, 1996; CAMPOS, 1996; DE PAULA, 1996; CARVALHO, 1996; DE SOUZA, 1997; LEMOS SENNA, 1997).

A determinação do pH da solução extrativa corresponde a um parâmetro físico-químico a ser avaliado e estabelecido na caracterização e padronização de soluções extrativas. Diversos fatores, tais como, reações enzimáticas da droga não estabilizada e a própria água, podem alterar o pH da solução extrativa de maneira que a determinação do mesmo permite inferir sobre estes fatores e sobre a qualidade das soluções. Em resultados obtidos por SONAGLIO (1987) observou-se que para soluções extrativas de *Achyrocline satureioides* houve desestabilização da solução com desaparecimento de algumas manchas cromatográficas quando o valor de pH afastou-se do valor do

extrato de origem. Para soluções extrativas de *P. niruri* L. o valor de pH se encontra, juntamente com a densidade relativa na tabela 21.

**Tabela 21.** Densidade relativa e pH da solução extrativa aquosa de *P. niruri* na proporção droga:solvente de 7,5:100 (m/V)

Densidade relativa $x \pm s$ (CV %)	pH $x \pm s$ (CV %)
1,0087 $\pm$ 0,0003 (0,03)	4,74 $\pm$ 0,0045 (0,09)

### 5.3 Produto seco por aspersão (PSA)

O desenvolvimento de produtos secos por aspersão está intimamente relacionado com as características físicas e químicas da solução extrativa a ser seca. A técnica de preparação da solução extrativa de *Phyllanthus niruri* L. empregando como meio de extração água, e o resíduo seco obtido de 2,13 % (m/m), permitiram a realização da secagem direta destes extratos.

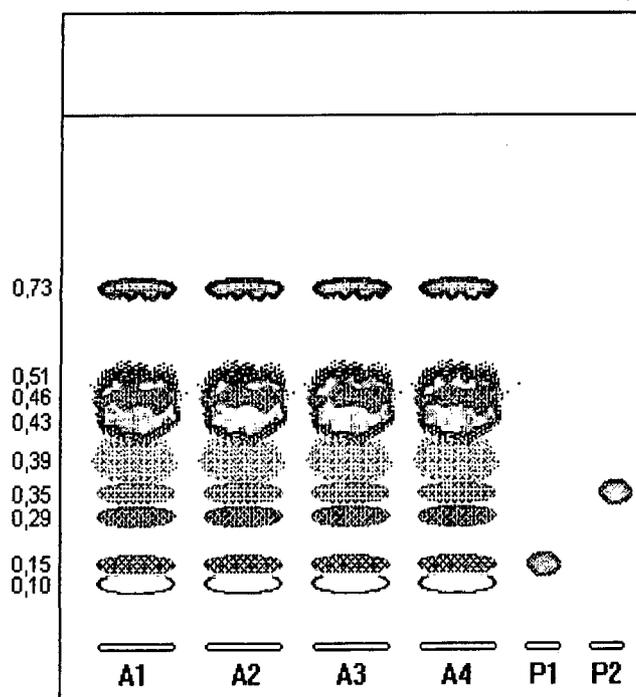
O produto seco por aspersão obtido através da secagem direta da solução extrativa foi comparado macroscopicamente com os outros produtos secos obtidos a partir de soluções extrativas preparadas nas mesmas condições de operação e adicionadas de adjuvante de secagem. Como adjuvante de secagem foi empregado o dióxido de silício coloidal. A escolha deu-se devido a sua adequabilidade tecnológica constatada em diversos trabalhos realizados neste laboratório (CAMPOS, 1996; CARVALHO, 1996; TEIXEIRA, 1996; DE SOUZA, 1997; LEMOS SENNA, 1997). A realização desta avaliação permitiu constatar diferenças marcantes entre os produtos obtidos sob dois aspectos principais:

1. Comportamento durante a operação de secagem: na aspersão da solução extrativa sem adição de adjuvantes de secagem constatou-se aderência intensa nas paredes da torre de secagem, propiciando diminuição no rendimento do processo. Ao contrário da primeira, a

secagem da solução extrativa adicionada de adjuvante de secagem (dióxido de silício coloidal) mostrou redução significativa na aderência do produto seco nas paredes da torre.

2. Características físicas e organolépticas: o produto obtido pela secagem direta da solução extrativa apresentou formação de grumos de coloração marrom e sua reconstituição em água foi lenta. Por outro lado, o produto obtido pela secagem da solução extrativa adicionada de adjuvante de secagem apresentou-se sob a forma de pó fino e de coloração amarelada e homogênea. A sua reconstituição em água foi quase que instantânea, tendo o produto com maior concentração de adjuvante apresentado característica de escoamento superior aos demais.

A avaliação comparativa dos perfis cromatográficos dos produtos secos por aspersão e da solução extrativa de origem demonstrou que tanto as condições da operação de secagem quanto a adição de dióxido de silício coloidal não causaram alterações quer no número ou na intensidade das manchas (fig. 21).



**Figura 21.** Representação do cromatograma obtido para a solução extrativa aquosa (A1), produto seco por aspersão sem adjuvante (A2), produto seco por aspersão com 20 % de adjuvante (A3), produto seco por aspersão com 30 % de adjuvante (A4), Substâncias de referência: rutina (P1) e isoquercetrina (P2), empregando como sistema eluente AcOEt:MeOH:HCOOH:H<sub>2</sub>O (80:1:8:10 V/V), sobre gel de sílica GF<sub>254</sub>, após revelação com difenilboriloxietilamina 0,5 % (m/V) e observação em luz UV a 366 nm.

Desta forma, na preparação do produto seco por aspersão, objeto deste estudo, foi empregado dióxido de silício coloidal como adjuvante de secagem de modo a perfazer 30 % do total do produto seco obtido.

O controle da concentração das substâncias marcadoras compreende um dos parâmetros mais importantes para assegurar a qualidade do produto final. Para determinação do teor de flavonóides totais no produto seco por aspersão, foi utilizada quantidade de produto seco por aspersão correspondente a faixa em que a extração de flavonóides apresentou comportamento linear, estabelecida através da matéria-prima vegetal e da

solução extrativa. O resultado obtido foi de  $0,2624 \pm 0,009$  % (m/m) (CV = 3,43 %). A taxa calculada de recuperação de flavonóides encontra-se na tabela 22.

**Tabela 22.** Recuperação de flavonóides no produto seco por aspersão de *P. niruri* L. em relação à solução extrativa

TFT calculado	TFT obtido	Recuperação (% m/m)
0,0946	0,0944	99,78

TFT = teor de flavonóides totais

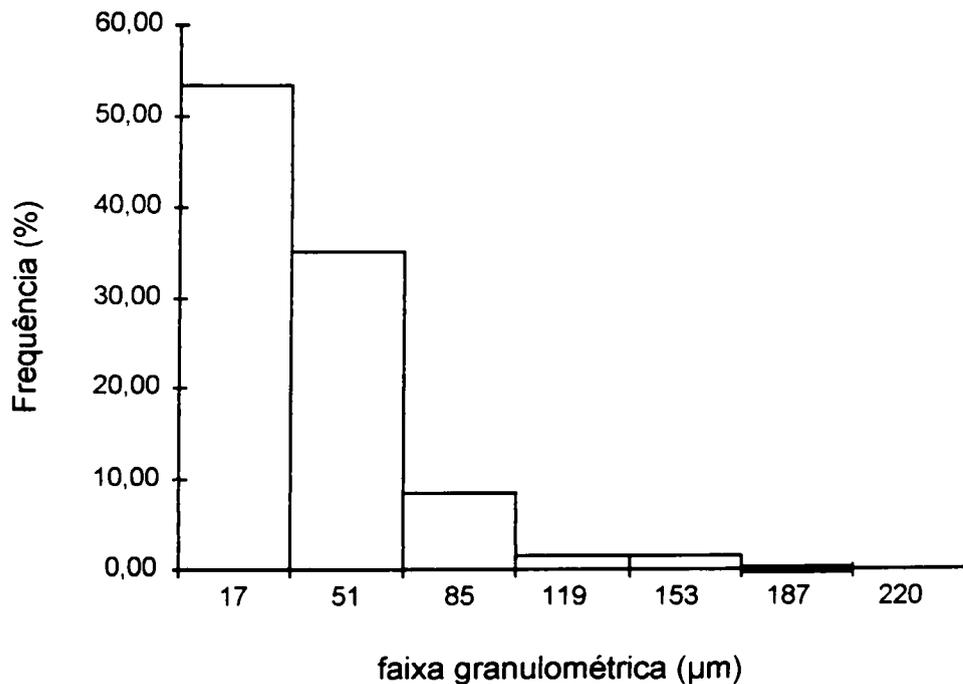
O recuperação calculada de flavonóides para produto seco final, demonstra que tanto a técnica de secagem, bem como a adição de adjuvante não promoveram alterações na concentração desta classe de constituintes químicos. O coeficiente de variação obtido é aceitável devido ao número de passos que a técnica exige.

O rendimento da operação de secagem da solução extrativa de *Phyllanthus niruri* adicionada de dióxido de silício coloidal foi de cerca 74 % (tab. 23). Segundo os resultados obtidos por SENNA (1993), em produtos secos por aspersão de *Achyrocline satureioides*, o rendimento da operação de secagem foi de 75 % (m/m). TEIXEIRA (1996) obteve para produtos secos, também a partir de soluções extrativas de *Achyrocline satureioides* com a combinação de diferentes adjuvantes de secagem, valores de rendimento que não ultrapassaram 72 % (m/m). Para produtos secos de *Ilex paraguariensis* preparados por CAMPOS (1996), o rendimento da operação de secagem tanto para produto seco sem adjuvante quanto para produto seco preparado com adjuvante de secagem, foi em torno de 70 % (m/m). A operação de secagem de soluções extrativas de *Passiflora edulis*, teve rendimento em torno de 65 % (m/m) (DE SOUZA, 1997), enquanto que para produtos secos obtidos por CARVALHO (1997) a partir de *Maytenus ilicifolia* com e sem o emprego de adjuvante de secagem o rendimento não foi diferente ficando em torno de 70 % (m/m). Deste modo pode-se considerar o rendimento alcançado neste trabalho como normal aos demais obtidos neste laboratório.

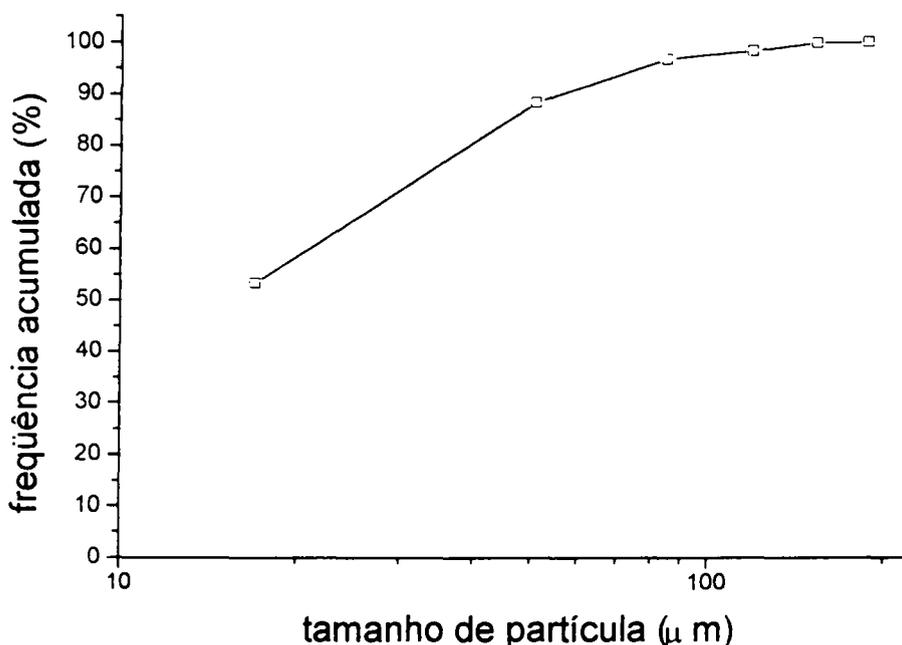
**Tabela 24.** Granulometria do produto seco por aspersão de *P. niruri* L.

Faixa Granulométrica ( $\mu\text{m}$ )	Diâmetro Médio ( $\mu\text{m}$ )	Frequência (f)	Frequência (%)	Frequência acumulada (%)
0 - 34	17	341	53,28	53,26
34 - 68	51	225	35,16	88,44
68 - 102	85	53	8,28	96,72
102 - 136	119	10	1,56	98,28
136 - 170	153	10	1,56	99,84
170 - 204	187	1	0,16	100
Total		640	100,00	

A maior proporção de partículas apresenta diâmetro inferior a 68  $\mu\text{m}$ . A distribuição granulométrica restrita e a presença de grande quantidade de partículas com diâmetro baixo podem ser explicadas pela utilização como adjuvante de secagem partículas muito finas.

**Figura 22.** Representação gráfica da distribuição granulométrica do produto seco por aspersão de *P. niruri* L.

O tamanho médio de partícula de 16,88  $\mu\text{m}$  foi calculado graficamente (fig. 23), empregando a frequência percentual acumulada em escala linear no eixo das ordenadas em função do tamanho de partícula ( $\mu\text{m}$ ) em escala logarítmica, a partir de 53 % de frequência.



**Figura 23.** Representação gráfica da distribuição granulométrica do produto seco por aspersão, em função da frequência acumulada percentual

Outra maneira de analisar a distribuição granulométrica é através do emprego da rede de distribuição RRSB. Este método foi idealizado para análise gráfica de amostras que não obedecem uma distribuição normal. Além do tamanho médio de partícula, a RRSB permite estabelecer a amplitude granulométrica e a superfície específica (DE SOUZA, 1997).

O diâmetro médio obtido foi determinado por extrapolação e foi igual a 22,5  $\mu\text{m}$  e a amplitude da distribuição granulométrica encontrada foi de 0,885 (fig. 24). A superfície-volume específica  $2,8 \cdot 10^3 \text{ cm}^2/\text{cm}^3$  foi determinada através da equação:

$$S_{\text{esp}} = (S_{\text{coef}} \cdot f) / d$$

Onde:

$S_{\text{esp}}$  = superfície-volume específica ( $\text{cm}^2/\text{cm}^3$ )

$S_{\text{coef}}$  = coeficiente de superfície

$f$  = fator forma

$d$  = diâmetro médio de partícula, obtido por extrapolação (cm)

Para o fator forma foi utilizado o valor 1. Isto significa que as partículas foram consideradas como possuindo forma esférica perfeita e de superfície não porosa. Deste modo, os valores obtidos compreendem estimativas dos valores verdadeiros. O valor para superfície-volume específica do produto seco é inversamente proporcional ao tamanho médio de partícula e diretamente proporcional ao ângulo de inclinação da reta, uma vez que o valor de  $S_{\text{coef}}$  é obtido pela extrapolação da mesma.

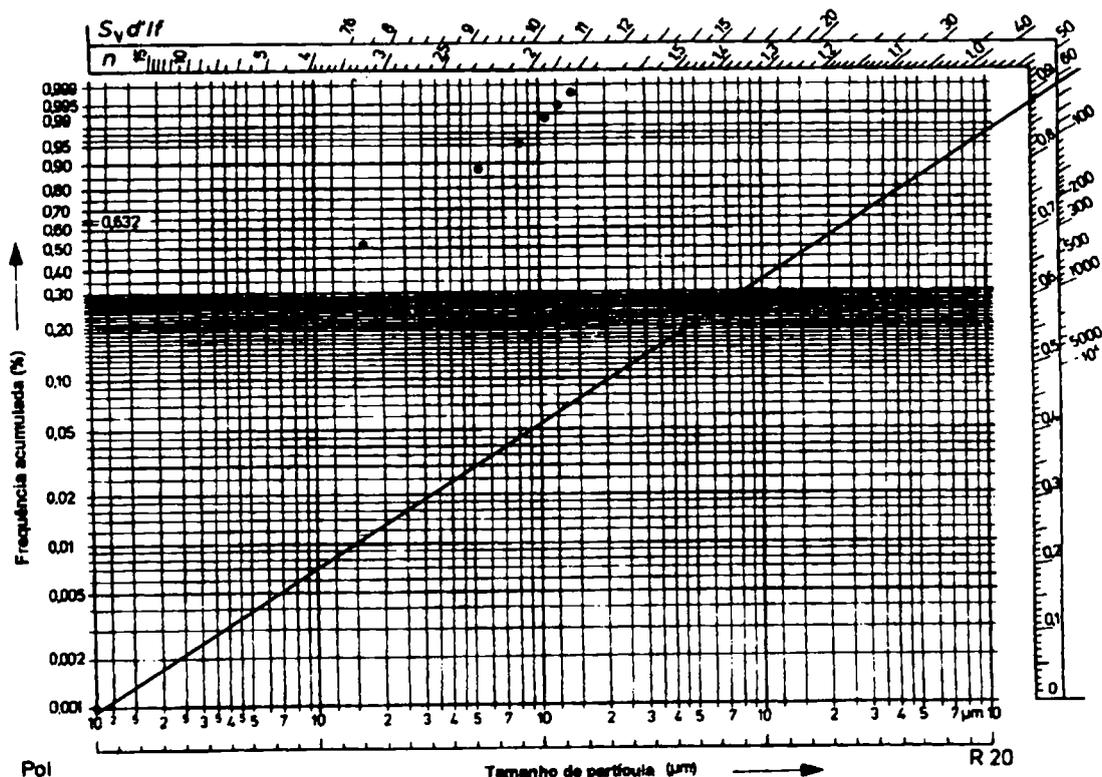
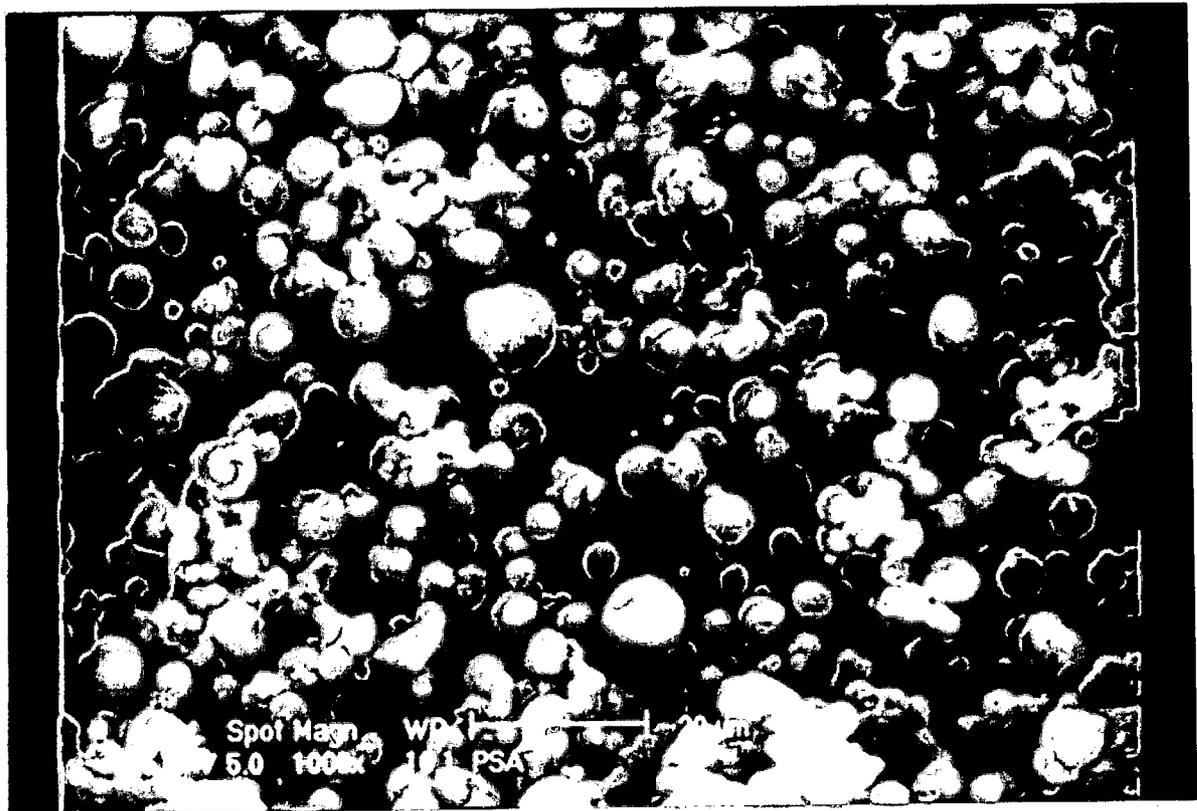


Figura 24. Análise da granulometria do produto seco por aspersão de *P. niruri* L. através da rede de distribuição RRSB

As figuras 25 e 26 mostram as fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura com aumentos de 1000 e 6000x.



**Figura 25.** fotomicrografia do PSA obtida através de microscopia eletrônica de varredura com aumento de 1000x

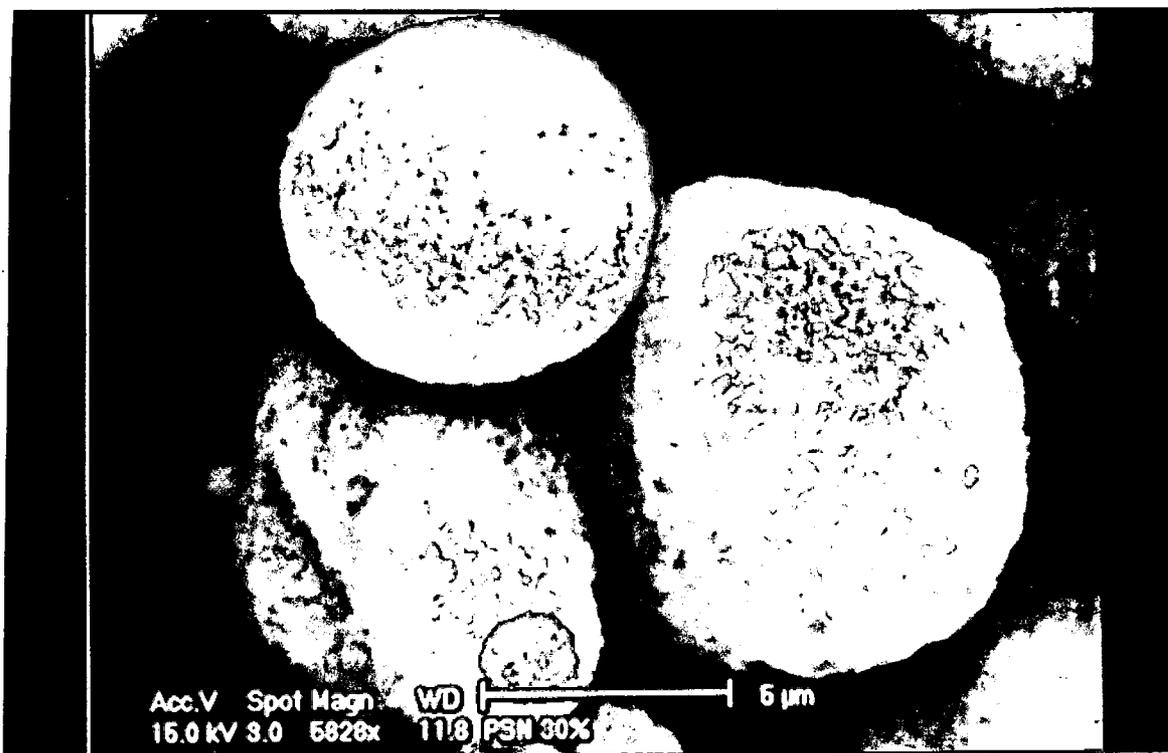


Figura 26. fotomicrografia do PSA obtida através de microscopia eletrônica de varredura com aumento de 6000x

A figura 25. mostra que as partículas do PSA encontram-se dispersas, possuindo, preponderantemente, forma esférica e com poucas partículas de dimensões extremas. Já a figura 26 retrata a superfície rugosa das partículas do PSA. Estas propriedades podem ser explicadas pela técnica de secagem, onde a forma esférica das partículas é característica da secagem por aspersão a partir de sólidos em suspensão, acarretando superfície rugosa como observado por GONZÁLEZ ORTEGA, 1993; TEIXEIRA, 1996; DE SOUZA, 1997.

A avaliação do comportamento do produto seco por aspersão diante de ambientes com diferentes umidades relativas constantes permite analisar o comportamento das preparações frente às variações normais de umidade ambiente durante o armazenamento, possibilitando inferir sobre a estabilidade física do produto e sua aplicabilidade em diversos procedimentos tecnológicos. Com a realização de estudo preliminar sobre o perfil de higroscopicidade do

produto seco de *Phyllanthus niruri* L. pôde-se observar, que a exposição do mesmo a uma atmosfera controlada de 63 % em ambiente fechado e termostaticado promoveu um rápido aumento de massa nas primeiras 24 horas, estabilizando-se a partir do quarto dia, após absorver cerca de 12 % de seu peso em água. O produto seco apresentou também alterações de suas características macroscópicas, tais como escurecimento, seguido de formação de grumos a partir do quarto dia de experimento e compactação do pó no décimo dia de ensaio (fig. 27). Os resultados obtidos demonstram que apesar da baixa umidade residual, o produto seco por aspersão apresenta comportamento higroscópico. Tal característica pode ser decorrente de diversos fatores, tais como a presença de grupos funcionais hidroxilas livres no adjuvante empregado ou de constituintes vegetais apresentando grupamentos polares (BASSANI, 1990).

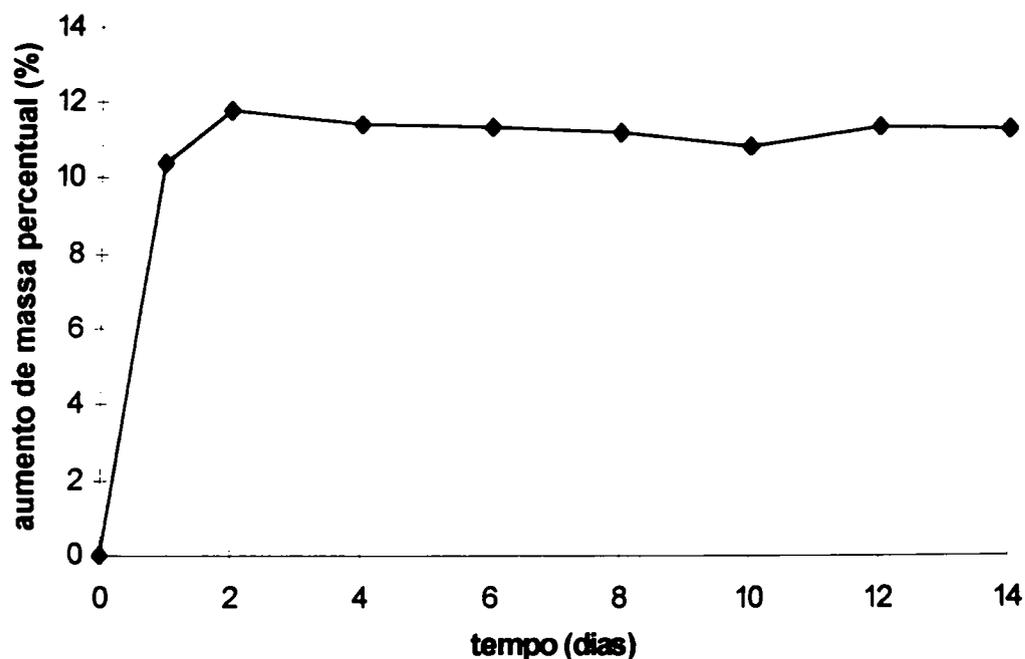


Figura 27. Perfil de higroscopicidade do produto seco por aspersão de *P. niruri* L. em atmosfera controlada de umidade relativa de 63 %.

## 6. CONCLUSÕES

---

---

A presença de alcalóides, freqüentemente relatada na literatura, em partes aéreas do vegetal, não foi confirmada nas condições empregadas para *Phyllanthus niruri* L.

O emprego de flavonóides como grupo de substâncias marcadoras apresentou-se como boa alternativa, tanto pela presença expressiva destes, quanto pela semelhança estrutural entre os mesmos, permitindo sua quantificação utilizando método espectrofotométrico.

O estudo da linearidade para a metodologia de quantificação de flavonóides em partes aéreas de *Phyllanthus niruri* L., apresentou um comportamento não-linear em função da quantidade de material vegetal analisada. Entretanto, permitiu estabelecer uma faixa de segurança para a quantidade de amostra, onde a quantificação dos flavonóides apresenta comportamento linear, assegurando que nesta faixa, o incremento da amostra não ocasiona variações importantes na determinação destes constituintes.

A variação do volume das alíquotas empregadas na metodologia de quantificação de flavonóides em soluções extrativas aquosas de *Phyllanthus niruri* L., sugere a presença de *erro sistemático proporcional* ao aumento de volume das mesmas. A diferença estatisticamente significante entre os valores obtidos para as inclinações da curva, demonstra a presença de um erro metodológico não determinado. O emprego de alíquotas com volume de 40 mL, demonstrou, ainda, a presença de *erro sistemático constante*. Utilizando alíquota de menor volume observou-se, apesar dos baixos valores de absorvância, ausência de *erro sistemático constante* e comportamento linear.

A metodologia de extração, a relação droga:solvente e a interação entre estes fatores influenciaram a extração de flavonóides em partes aéreas de *Phyllanthus niruri* L.

A passagem do nível inferior para o nível superior do fator método de extração, do fator relação droga:solvente bem como a passagem simultânea dos mesmos, representaram um aumento estatisticamente significativo na extração de flavonóides em partes aéreas de *Phyllanthus niruri* L. ( $\alpha \leq 0,025$ ).

A solução extrativa preparada através de decocção durante 15 minutos na proporção droga:solvente igual a 7,5:100 (m/V), apresentou o teor mais elevado de flavonóides totais.

A secagem direta por aspersão da solução extrativa sem adjuvante proporcionou a obtenção de produto seco com características físicas pouco satisfatórias além de elevada higroscopicidade. A adição de dióxido de silício coloidal como adjuvante de secagem conferiu melhora significativa para estas características.

O produto obtido empregando a técnica de secagem por aspersão a partir de solução extrativa aquosa de *Phyllanthus niruri* L. não apresentou qualquer alteração no perfil de constituintes químicos utilizados como marcadores quando comparado ao perfil apresentado pela solução extrativa.

A técnica de secagem por aspersão e a adição de dióxido de silício coloidal não interferiram no perfil qualitativo de marcadores químicos.

O produto seco por aspersão contendo dióxido de silício coloidal 30% apresentou tendência à aglomeração e pouca estabilidade quando submetido à atmosfera controlada de 63 % de umidade relativa.

O conjunto dos resultados obtidos neste trabalho demonstra a viabilidade da preparação de produtos secos por aspersão a partir de soluções extrativas aquosas de *Phyllanthus niruri* L. Entretanto, devido ao caráter pioneiro da abordagem tecnológica para a droga vegetal em questão, certamente serão necessários estudos complementares para os diversos aspectos avaliados neste trabalho.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

---

- ARTIGUES, A. What are the Legal Requirements for the use of Phytopharmaceutical Drugs in France?. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 32, p. 231-234, 1991.
- ANJANEYULU, A.S.R.; JAGANMOHAN RAO, K.; RAMACHANDRA ROW, I.; SUBRAHMANYAN, O. Crystalline Constituents of Euphrobiaceae - XII. Isolation and Structural Elucidation of Three New Lignans from the Leaves of *Phyllanthus niruri* L. *Tetrahedron Letters*, v. 29, 1291-1298, 1973.
- BACCHI, E.M.; DE OLIVEIRA, F. Caracterização química da droga e do extrato fluido de *Phyllanthus tenellus* Robx. - Quebra-Pedra. *Anais de Farmácia e Química*, v. 23, n 1/2, p. 19-27, 1983.
- BASSANI, V.L. *Valorisation de formes galéniques végétales: desalcoolisation et concentration de solutions extractives sur membrane d'osmose inverse*. Montpellier: Faculté de Pharmacie, 1990. Tese (Doutorado em Farmácia).
- BAUER, R.; CZYGAN, F.C.; FRANZ, G.; IHRIG, M.; NAHRSTEDT, A.; SPRECHER, E. Qualitätsansprüche an rational anwendbare Phytopharmaka. *Deutscher Apotheker Zeitung*, v. 133, n. 44, p. 17-20, 1993.
- BÖHME, H.; HARTKE, K. (Hrsg.) *Deutsches Arzneibuch - 8. Ausgabe 1978 - Kommentar*. Stuttgart: Wissenschaftliche, 1981. p. 15-16.
- BHADBHADDE, M.M.; SUBBA RAO, G.R.S.; VENKATESAN, K. Concerning Hypophyllanthin. *Tetrahedron Letters*, v. 21, p. 3097-3098, 1980.
- BOLTON, S. *Pharmaceutical Statistics: Particle and Clinical Applications*. New York: Marcel Dekker, 1984.

BRASIL, Ministério da Saúde, Serviço Nacional de Fiscalização da Medicina e Farmácia. Portaria n. 22, 30 de outubro de 1967. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília. 1967.

BRASIL, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria n. 19/DIMED, 27 de novembro de 1981. Determina as informações necessárias à obtenção de aprovação preliminar do produto natural. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília. 1981.

BRASIL, Comissão Interministerial do Planejamento, Resolução n. 8, 8 de março de 1988. Inclui a fitoterapia no Sistema Oficial da Saúde. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília. 1988.

BRASIL, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria n. 10, 30 de janeiro de 1992. Proíbe o uso de *Symphytum officinale*, o confrêi ou consólida, como matéria-prima terapêutica. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília. 1992.

BRASIL, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria n. 123, 19 de outubro de 1994. Apresenta proposta de normas de registro de produtos fitoterápicos. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília. 1994.

BRASIL, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria n. 6, 30 de janeiro de 1995. Regulamenta o registro de produtos fitoterápicos no Brasil. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília. 1995.

BRASIL, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria n. 116, 08 de agosto de 1996. Proposta de normas para estudo da toxicidade e da eficácia de produtos fitoterápicos. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília. 1996.

- BRITO, A.R.M.S. Legislação de Fitoterápicos In: DI STASI, L.C. (Org.). *Plantas medicinais: arte e ciência - Um guia de estudo interdisciplinar*. São Paulo: Universidade Estadual Paulista, 1996, p. 187-197.
- BUNDESVEREINIGUNG DEUTSCHER APOTHEKERVERBÄNDE (Hrsg.). *Deutscher Arzneimittel - Codex*. 1986. Frankfurt: Govi; Stuttgart: Deutscher Apotheker, 1986a. v.1: Codex - Probe 4, 9.
- BUNDESVEREINIGUNG DEUTSCHER APOTHEKERVERBÄNDE (Hrsg.). *Deutscher Arzneimittel - Codex*. 1986. Frankfurt: Govi, Stuttgart: Deutscher Apotheker, 1986b. v. 2: Holunderblüten, p.1-3.
- CALIXTO, J.B.; YUNES, R.A.; NETO, A. S.O.; VALLE, R.M.R.; ERA, G.A. Antiespasmotic Effects of an Alkaloid Extracted from *Phyllanthus sellowianus*: a Comparative Study with Papaverine. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 17, p. 313 - 321, 1984.
- CAMPOS, A.M. *Desenvolvimento de extratos secos nebulizados de Ilex paraguarienses St. Hil. AQUIFOLIACEAE (Erva-mate)*. Porto Alegre: Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, 1996. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas).
- CARVALHO, E.L.S; GONZÁLEZ ORTEGA, G.; BASSANI, V.L.; GUTERRES, S.S.; PETROVICK, P.R. Extratos secos nebulizados de *Maytenus ilicifolia*: otimização de formulação. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 14, 1996, Florianópolis, *Resumos...*, Florianópolis:UFSC, 1996. p 64.
- CASADEBAIG, J.L. *Realization d'extraits secs nebulisés. Optimization de formes galéniques de origine végétale a activité diuretique*. Montpellier: Faculté de Pharmacie, 1987. Tese (Doutorado em Farmácia).

- CASADEBAIG, J.L.; JACOB, M.; CASSANAS, G.; GAUDY, D.; BAYLAC, G.; PUECH, A. Physicochemical and Pharmacological Properties of Spray-dried Powder from *Fraxinus excelsior* Leaf Extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 26, p. 211-216, 1989.
- CASADEBAIG, J.L.; JACOB, M.; CASSANAS, G.; MARION, C.; PUECH, A. Elaboration d'extraits végétaux absorbés. Réalisation d'extraits secs d'*Orthosiphon stamineus* Benth. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, v. 5, p. 469-473, 1989.
- CASADEBAIG, J.L.; JACOB, M.; CASSANAS, G.; MARION, C.; PUECH, A. Elaboration d'extraits végétaux absorbés. Réalisation d'extraits secs de *Borago officinalis* L. *S. T. P. Pharma Sciences*, v. 5, p. 469-473, 1989.
- CHAUAN, J.S.; MOHAMMAD SULTAN; SRIVASTAVA, S.K. Two New Glycoflavones from the Roots of *Phyllanthus niruri*. *Planta medica*, v. 32, p. 217-222, 1977.
- CODY, V.; MEDDLETON, J.R.E.; HARBORNE, J.B. (Editors) (1986). *Plant Flavonoids in Biology and Medicine*. Alan R. Liss, New York.
- COIMBRA, R.; SILVA, E.D. *Notas de fitoterapia*. 2ª ed., Rio de Janeiro: Laboratório Clínico Silva Araújo, 1958.
- COSTA, A.F. *Farmacognosia: Farmacognosia experimental*. V. 3, Coimbra: Calouste-Gulbenkain, 1972. P 821-824.
- CPQBPA/UNICAMP. *Estudo agrônômico de plantas medicinais brasileiras dotadas de atividade farmacológica*. Relatório Técnico. Campinas: UNICAMP, 1990, p. 38 - 42.
- CRUZ, G.L. *Dicionário de plantas úteis do Brasil*. 3.ed. Rio de Janeiro. Civilização Brasileira, p. 327-328, 1985.

- DANIEL, C. Use of Half-Normal Plots in Interpreting Factorial Two Level Experiments. *Technometrics*, v.1, p. 311-342, 1959.
- DE PAULA, I.C. *Desenvolvimento tecnológico de forma farmacêutica plástica contendo extrato seco nebulizado de Achyrocline satureioides (Lam.) DC. Compositae - marcela*. Porto Alegre: Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, 1997. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas).
- DE SOUZA, K.C.B. *Desenvolvimento de metodologias analíticas e tecnológicas na obtenção de extratos secos nebulizados de Passiflora edulis forma flavicarpa*. Porto Alegre: Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, 1997. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas).
- DEUTSCHES Arzneibuch. 10. Ausgabe. Stuttgart: Govi, Frankfurt: Wissenschaftliche, 1992.
- DIN 66145 Normen - Partikelmesstechnik, DIN: Deutscher Institut für Normung (Hrsg.) 3. Aufl., Berlin, Köln: Beuth, 1990.
- FARIAS, M.R.O.; SCHENKEL, E.P.; BERGOLD, A.M.; PETROVICK, P.R. O problema da qualidade dos fitoterápicos. *Caderno de Farmácia*, v. 1, p.73-82, 1985.
- FARMACOPÉIA Brasileira. 4 ed., São Paulo: Atheneu, 1988.
- FARNSWORTH, N.R.O. The Development of Pharmacological and Chemical Research for Application to Traditional Medicine in Developing Countries. *Journal of Ethnopharmacology*, v.2, p. 173. 1980.

- FRANCO, S.L. *Proposta tecnológica de macerados de Maytenus ilicifolia Martius Ex. Reiss.* Porto Alegre: Curso de Pós-Graduação em Farmácia: análise, síntese e controle de medicamentos, UFRGS, 1989. Dissertação (Mestrado em Farmácia).
- FUNK, W.; DAMMANN, V.; DONNEVERT, G. *Qualitätssicherung in der analytischen Chemie.* Weinheim: VHC, 1992,
- FURLAN, M.R. Aspectos agronômicos em plantas medicinais. In: DI STASI, L.C. (Org.). *Plantas medicinais: arte e ciência - Um guia de estudo interdisciplinar.* São Paulo: Universidade Estadual Paulista, 1996. p. 157-167.
- GANESHPURE, P.A.; SCHNEIDERS, G.E.; STEVENSON, R. Structure and Synthesis of Hypophyllanthin, Nirtetralin, Phylltetralin and Lintetralin. *Tetrahedron Letters*, v. 22, p.393-396, 1981.
- GAUDY, D. *Contribution a l'optimisation des preparations galéniques a base de Noix vomique: mises au point technologique et analytique.* Montpellier: Unité de Formation et de Recherche des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, 1987. Tese (Doutorado em Farmácia).
- GAUDY, D.; PUECH, A.; JACOB, M. Rôle de l'adjuvant dans l'otimization de la production d'un extrait de Noix Vomique. *Pharmaceutica Acta Helvetica*, v. 66, p. 5-10, 1991.
- GONZÁLEZ ORTEGA, G. *Trockenextrakte aus Passionsblumenkraut. Herstellung, Standardisierung, Wirkungsnachweis.* Tübingen: Fakultät für Chemie und Pharmazie, Eberhard-Karls Universität, 1993. Tese (Doutorado em Ciências Naturais).
- GUPTA, D.R.; AHMED, B. Nirurin: a New Prenylated Flavone Glycoside from *Phyllanthus niruri*. *Journal of Natural Products*, v. 47, p. 958 - 963, 1984.

- GUTERRES, S.S. *Influência de adjuvantes sobre as características farmacêuticas de cápsulas de gelatina dura contendo hidroclorotiazida*. Porto Alegre: Curso de Pós-Graduação em Farmácia, UFRGS, 1991. Dissertação (Mestrado em Farmácia).
- HARTKE, K.; MUTSCHLER, E. (Hrsg.) *Deutscher Arzneibuch - 9. Ausgabe 1986 Kommentar*. Stuttgart : Wissenschaftliche, 1987. p. 305-306.
- HARTKE, K.; HARTKE, H.; MUTSCHLER, E.; RÜCKER, E.; WICHTL, M. *Deutsches Arzneibuch 10. Aufgabe - Kommentar*, Wissenschaftliche: Stuttgart, GOVI: Frankfurt. Vol II/1, Monographie B39 (Birkenblätter), 1991.
- JACOB, M.; PUECH, A.; FRESQUET, J. Elaboration d'extraits végétaux adsorbés. Obtention d'un extrait de Belladone sur support Aerosil. *Revue Science Technologie Pharmacie*, v. 5, n. 2, p. 79 - 80, 95, 1976.
- JACOB, M.; SOERTANO, S.; PUECH, A.; DURU, C.; CAVAILLES, M.L. Contribution à l'étude de la stabilité de divers extraits végétaux secs. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, v. 59, p. 335-338, 1984.
- JOSHI, B.S.; GAWAD, D.H.; PETELIER, S.W.; KARTHA, G.; BHANDARY, K. Isolation and Structure (x-ray Analysis) of Ent-norsecurinine, an Alkaloid from *Phyllanthus niruri*. *Journal of Natural Products*, v. 49, p.614-620, 1986.
- KARD, R.S.; SATYANARAYANA, P.; RAMCHANDA ROW, L.; GOPALA RAO, B.V. The Case for a Revised Structure for Hypophyllanthin - na Analysis of the <sup>13</sup>C NMR Spectra of Aryltetralins. *Tetrahedron Letters*. V. 32, p. 3043-3046, 1979.

- KELLER, K. Legal Requirements for the Use of Phytopharmaceutical Drugs in the Federal Republic of Germany. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 32, p. 225-229, 1991.
- KELLER, K. Results of the Revision of the Herbal Drugs in the Federal Republic of Germany with a Special Focus on Risk Aspects. *Zeitschrift für Phytotherapie*, v. 13, n. 4, p. 116-120, 1992.
- LANTZ, R.J.Jr. Size Reductions. In: LIEBERMAN, H.A., LACHMAN, L.S., SCHWARTZ, J.B. (ed.) *Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets*. 2nd. ed., New York: Marcel Dekker, 1989. v. 1.
- LAPA, A.J. Plantas medicinais do projeto de pesquisa da central de medicamentos (CEME) do Ministério da Saúde do Brasil, farmacologia da *Cecropia glazioui*. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 14, Florianópolis, 1996. *Resumos...*, Florianópolis: UFSC, 1996. p. 23.
- LEMONS SENNA, E.; PETROVICK, P.R.; GONZÁLEZ ORTEGA, G.; BASSANI, V.L. Preparation and Characterization of Spray-dried Powders from *Achyrocline satureioides*. (Lam.) D.C. Extracts. *Phytotherapy Research*, v. 11, p. 123-127, 1997.
- LIST, P.H.; SCHMIDT, P.C. *Phytopharmaceutical Technology*. Boca Raton: CRC, 1989.
- MABRY, T.J.; MARKHAM, K.R.; THOMAS, M.B. *The Systematic Identification of Flavonoids*. Berlin: Springer, 1970.
- MARKHAM, K.R. *Techniques of Flavonoid Identification (Biological Techniques Series)*. London: Academic, 1982.
- MASTERS, K. *Spray drying*, 2ed. New York: John Wiley, 1978.

- MATOS, F.J.A. Curso: Plantas Medicinais - (quebra-pedra). *Universidade aberta*, v. 24, 1988.
- MATOS, F.J.A. Quebra-pedra: *Phyllanthus amarus* Schum, et Thorn, *P. niruri* L. e *P. urinaria* L. In: *Plantas medicinais: guia de relação e emprego de plantas medicinais do Nordeste do Brasil*. Fortaleza. IOCE, v. 2, p. 73 1989.
- MATTOS, J.K.A. *Plantas Medicinais: aspectos agrônômicos*. Brasília: Gutenberg, 1996.
- MELLO, J.C.P. *Desenvolvimento galênico de macerados de Baccharis trimera (LESS.) DC. - Compositae - (Carqueja)*. Porto Alegre: Curso de Pós-Graduação em Farmácia, UFRGS, 1989. Dissertação (Mestrado em Farmácia).
- MENßEN, H.G. Standardisierung von Phytopharmaka. *Deutscher Apotheker Zeitung*, v. 121, p. 1255-1259, 1981.
- MENßEN, H.G. Arzneipflanzenstandardisierung am Beispiel der Sennespflanzen *Cassia angustifolia* und *Cassia acutifolia*. *Deutscher Apotheker Zeitung*, v. 122, n. 45, p. 2317-2320, 1982.
- MILLMAN, I., VENKATESWARAN, P.S., and BLUMBERG, B.S. Manufacture of a medicament for treatment viral hepatitis. *European Patent Office. Bulletin* 86/44.199429A2, 1986.
- MONTEGOMERY, D.C. *Diseño y análisis de experimentos*. México: Iberoamérica, 1991.

- MOURA, T.F.; GAUDY, D.; JACOB, M.; TEROL, A.; PAUVERT, B.; CHAUVET, A. Vitamin C Spray Drying: Study of the Thermal Constraint. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 22, n. 5, p. 393-400, 1996.
- MULCHANDI, N.B.; HASSARAJANI, S.A. 4-Methoxy-nor-securinine, a New Alkaloid from *Phyllanthus niruri*. *Planta Medica*, v. 50, p. 104-105, 1984.
- NAGELL, A. Qualitätssicherung von Arzneidrogen. *Deutscher Apotheker Zeitung*, v. 127, n. 1/2, p. 7-10, 1987.
- NARA, T.K.; GLEYE, J.; LAVERGNE DE CERVAL, E.; STANISLAS, E. Flavonoids of *Phyllanthus niruri* L.; *Phyllanthus urinaria* L. and *Phyllanthus orbiculatus* L.C.Rich. *Plantes Medicinales et Phytotherapie*, v. 11, p. 82-86, 1977.
- PETCHNAREE, P.; BUNYAPRATHATSARA, N. X-ray Crystal and Molecular Structure of Nirurine, a Novel Alkaloid to the Securinega Alkaloid Skeleton, from *Phyllanthus niruri* (Euphorbiaceae). *Journal Chemical Society of Perkins Transactions*, V. 1, p. 1551 - 1556, 1986.
- PETROVICK, P.R. *Contribuição ao estudo fitoquímico de Euphorbia prostrata* AIT. Porto Alegre: : Curso de Pós-Graduação em Farmácia, UFRGS, 1975. Dissertação (Mestrado em Farmácia).
- PETROVICK, P.R.; SONAGLIO, D.; MELLO, J.C.P.; FRANCO, S.L.; CARDOSO, M.L.C. Eficácia terapêutica e padronização de fitoterápicos. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 10, São Paulo. *Resumos...*, São Paulo: Escola Paulista de Medicina, 1988. res. 18
- PETROVICK, P.R. Tecnologia de fitoterápicos: um desafio a vencer. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 14, Florianópolis, 1996. *Resumos...*, Florianópolis: UFSC, 1996. p. 25.

- PUECH, M. *Elaboration d'un extrait sec nebulisé de Vigne Rouge. Place des substances auxiliaires*. Montpellier: Faculté de Pharmacie, 1991. Tese (Doutorado em Farmácia).
- RAO, G.S.; BRAMLEY, R. Hypophyllanthin. (*Phyllanthus niruri*). *Tetrahedron Letters*, v. 43, p.3175 - 3178, 1971.
- ROUFFIAC, R.; PARELLO, J. Étude chimique des alcaloides du *Phyllanthus niruri* L. Présence de l'antipode de la norsécurine. *Plantes Medicinales et Phytotherapie*, v. 3, n. 3, p. 220-223, 1969.
- SANTOS, D.R. *Chá de quebra-pedra (Phyllanthus niruri) na litfase urinária em humanos e em ratos*. São Paulo: Escola Paulista de Medicina. 1990. Dissertação (mestrado)
- SATYANARAYANA, P.; SUBRAHMANYAM, P. VISWANATHAN, K.N.; WARD, R.S. Seco- and Hydroxy- lignans from *Phyllanthus niruri*. *Journal of Natural Products*, v. 51, p. 44-49, 1988.
- SCHENKEL, E.P.; SIMÕES, C.M.O.; MENGUE, S.S.; MENTZ, L.A.; IRGANG, B.E.; STEHRMANN, J.R. O espaço das plantas medicinais e suas formas derivadas na medicina científica. *Caderno de Farmácia*, v. 1, p. 65-72, 1985.
- SCHEFFER, M.C. *Recomendações técnicas para o cultivo das plantas medicinais pelo Projeto de Fitoterapia do SUDS/Paraná*. Curitiba: SESA/Fundação Caetano Munhoz da Rocha, 1990. p 29-30.
- SCHMIDT, P.C.; GONZÁLEZ ORTEGA, G. Passionsblumenkraut: Bestimmung des Gesamtflavonoidgehaltes von *Passiflorae herba*. *Deutscher Apotheker Zeitung*, n. 47, p. 17-26, 1993.

- SENNA, E.M.T. *Desenvolvimento de extratos secos nebulizados de Achyrocline satureioides (Lam.) DC. COMPOSITAE (marcela)*. Porto Alegre: UFRGS, Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 1993. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas).
- SIMÕES CMO, MENTZ LA, SCHENKEL, EP, IRGANG BE, STEHMANN JR. *Plantas da medicina popular do Rio Grande do Sul*. 4 ed. Editora da Universidade/UFRGS, Porto Alegre. 1995.
- SINGH, B.; AGRAWAL, P.K.; THAKUR, R.S. Chemical Constituents of *Phyllanthus niruri* Linn. *Indian Journal of Chemistry*, v.25B, p. 600-602, 1986
- SINGH, B.; AGRAWAL, P.K.; THAKUR, R.S. A new Lignan and New Neolignan from *Phyllanthus niruri*. *Journal of Natural Products*, v. 52, p. 48-51, 1989.
- SOARES, L.A.L.; GONZÁLEZ ORTEGA, G.; BASSANI, V.L.; PETROVICK, P.R. Estudo da viabilidade tecnológica de extratos secos por nebulização de *Phyllanthus niruri* L. - Euphorbiaceae - (Quebra-Pedra). In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 14, 1996, Florianópolis, *Resumos...*, Florianópolis: UFSC, 1996. p. 163.
- SOERTANO, S. *Comparaison entre divers extraits secs de Strychnos ligustrina BL. Aspects technologique, analytique et disponibilité*. Montpellier: Faculté de Pharmacie, 1980. Tese (Doutorado em Farmácia).
- SOUSA, G.S. *Tratado descritivo do Brasil em 1587*. São Paulo: Nacional, 1938. v. 117.
- STAHL, E. *Thin-Layer Chromatography: A Laboratory Handbook*. 2nd ed., Berlin: Springer, 1969.

- STANISLAS, E.; ROUFFIAC, R.; FOYARD, J.J. *Phyllanthus niruri* Alkaloids, Flavonoids and Lignans. *Plantes Medicinales et Phytotherapie*, v. 1, p. 136-141, 1967.
- STELLMACH, B. Herstellung und Standardisierung von Pflanzenextrakten. *Chemische Industrie*, v. 32, p. 165-70, 1980
- TEIXEIRA, H.F. *Avaliação da influência de adjuvantes farmacêuticos sobre características físicas, químicas, tecnológicas e farmacológicas de extratos secos nebulizados de Achyrocline satureioides (LAM.) DC. Compositae - Marcela*. Porto Alegre: Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, 1996. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas).
- UENO, H.; HORIE, S.; NISHI, Y.; SHOGAWA, H.; KAWASAKI, M.; SUZUKI, S.; ARISAWA, M.; SHIMIZU, M.; YOSHIZAKI, M.; MORITA, N. Chemical and Pharmaceutical Studies on Medicinal Plants in Paraguay. Geraniin, na Angiotensin-converting Enzyme inhibitor from "paraparai mi" *Phyllanthus niruri*. *Journal of Natural Products*, v. 51, p.357-359, 1988.
- UNADER, W.P.; WEBSTER, G.L.; BLUMBERG, B.S. Uses and Bioassays in *Phyllanthus* (Euphorbiaceae). Compilation Part 2 Subgenus *Phyllanthus*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 34, p. 97-133, 1991.
- VENKATESWARAN, P.S.; MILLMAN, I.; BLUMBERG, B.S. Effects of an Extract from *Phyllanthus niruri* on Hepatitis B and Woodchuck Hepatitis Viruses: *In vitro* and *in vivo* Studies. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, v. 84, p. 274-278, 1987
- VIEIRA, L.S. *Fitoterapia da Amazônia: Manual de Plantas Medicinais*. 2. ed., São Paulo: Agronômica, 1992.

- VOIGT, R. *Pharmazeutische Technologie*. 7. überarb. Aufl., Berlin: Ullstein Mosby, 1993.
- WADE, A.; WELLER, P.J. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 2nd. ed. London: Pharmaceutical, 1994
- WAGNER, H.; BLADT, S. *Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas*. 2nd. ed., Berlin: Springer, 1996
- WEBSTER, G.L. A Revision of *Phyllanthus* (Euphorbiaceae) in the Continental United States. *Britonia*, v. 22, p. 44-76, 1970.
- WORLD Health Organization, *Pautas para la evaluation de medicamentos herbários*. Genebra: WHO, 1991.
- XAVIER, H.S. Plantas medicinais no Brasil. *Revista Portuguesa de Farmácia*, v. 41, n. 3, p. 31-32, 1991.
- YATES, F. *The Design and Analysis of Factorial Experiments*. England: Imperial Bureau of Soil Science, 1937.
- ZHI-CHEN, L. General Control Methods for Vegetable Drugs. Geneva: WHO, 1980. p.31-33.

## PRODUÇÃO CIENTÍFICA

SOARES, L.A.L.; GONZÁLEZ ORTEGA, G.; BASSANI, V.L.; PETROVICK, P.R.

Estudo da viabilidade tecnológica de extratos secos por nebulização de *Phyllanthus niruri* L. - Euphorbiaceae - (Quebra-Pedra). In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 14, 1996, Florianópolis, *Resumos...*, Florianópolis: UFSC, 1996. P. 163.

SOARES, L.A.L.; GONZÁLEZ ORTEGA, G.; BASSANI, V.L.; PETROVICK, P.R.

Some aspects about the assay of O-glycosylated flavonoids in spray dried powders from *Phyllanthus niruri* L. (Euphorbiaceae). In: WORLD CONGRESS ON MEDICINAL AND AROMATIC PLANTS FOR HUMAN WELFARE, 2, 1997, Mendoza - Republica Argentina, *Abstract...*, Mendoza: ICMAP-ISHS-SAIPA, 1997. P-459.

SOARES, L.A.L.; DE SOUZA, K.C.B.; GONZÁLEZ ORTEGA, G.; BASSANI, V.L.;

PETROVICK, P.R. Quantitative evaluation of glycosylated flavonoids in the crude drugs *Phyllanthus niruri* L. (Euphorbiaceae) and *Passiflora edulis* (Passifloraceae). In: WORLD CONGRESS ON MEDICINAL AND AROMATIC PLANTS FOR HUMAN WELFARE, 2, 1997, Mendoza - Republica Argentina, *Abstract...*, Mendoza: ICMAP-ISHS-SAIPA, 1997. P-460.

## *CURRICULUM VITAE*

09 de outubro de 1971	Nascimento em Recife, Pernambuco
março de 1979 à dezembro de 1982	Primeiro grau menor (1 <sup>a</sup> a 4 <sup>a</sup> séries) Instituto Santa Maria Mazzarello Recife - PE
março de 1983 à dezembro de 1986	Primeiro grau maior (5 <sup>a</sup> a 8 <sup>a</sup> séries) Colégio de Aplicação do Centro de Educação da Universidade Federal de Pernambuco - Recife - PE
março de 1987 à dezembro de 1989	Segundo grau (1 <sup>a</sup> a 3 <sup>a</sup> séries) Colégio de Aplicação do Centro de Educação da Universidade Federal de Pernambuco - Recife - PE
março de 1991 à janeiro de 1994	Graduação em Farmácia Departamento de Farmácia da UFPE Recife - PE
março de 1995 à outubro de 1997	Pós-Graduação nível mestrado em Tecnologia Farmacêutica pela Faculdade de Farmácia da UFRGS Porto Alegre - RS

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Av. Ipiranga, 2752 - 1º andar - Porto Alegre, RS, 90610 - 000  
Fone (051) 3165243 - Fax. (051) 3305610

Área de concentração :

DESENVOLVIMENTO E CONTROLE DE INSUMOS E MEDICAMENTOS

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO : \*Padronização do extrato aquoso e desenvolvimento do produto seco por aspersão de *Phyllanthus niruri* L. - Euphorbiaceae (quebra-pedra).

Mestrando (a): LUIZ ALBERTO LIRA SOARES

PARECER

O Mestrando aborda em sua dissertação um tema atual e de expressiva importância no desenvolvimento de formas farmacêuticas centradas no aproveitamento de nossos vegetais, onde apresenta protocolos analíticos destinados a avaliar a qualidade da matéria prima e dos produtos envolvidos nos diversos estágios do processo, incluindo o produto final. Foi muito feliz quanto à escolha da matéria prima para seu estudo, compreendendo esta, as partes aéreas de *Phyllanthus niruri* L. a espécie deste taxon mais amplamente empregada em todo o país, contando com aprofundados estudos de sua bioatividade. Acertada também nos pareceu a escolha dos marcadores químicos, O-glicosil flavonóides e agliconas, constituindo-se essas moléculas em bons indicadores porquanto permitem já a partir de análises cromatográficas de produtos, aquilatar o desempenho e rendimento do método empregado. Some-se a isto, sua presença nas demais espécies de *Phyllanthus*, o que permite estender-se as mesmas o procedimento aqui estudado.

Amplamente calcada em dados experimentais, a feitura da presente dissertação certamente aportou ao seu autor um bom cabedal de conhecimentos, os quais somados à experiência adquirida ao longo do curso, apontarão o Norte de pesquisas futuras.

Não vislumbrando, de qualquer natureza, deslizes que pudessem comprometer a qualidade desse trabalho, atribuímos ao mesmo o grau final 9,0 (nove).

Recife, 27 de outubro de 1997



Prof. Dr. Haroudo Satiro Xavier  
Universidade Federal de Pernambuco

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Área de concentração:

DESENVOLVIMENTO E CONTROLE DE INSUMOS E MEDICAMENTOS

Título:

"Padronização do extrato aquoso e desenvolvimento do produto seco por  
aspersão de *Phyllanthus niruri* L. - Euphorbiaceae (quebra-pedra)"

Mestrando: LUIZ ALBERTO LIRA SOARES

**PARECER**

O trabalho de dissertação apresentado por Luiz Alberto Lira Soares para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas aborda tema de elevada relevância socio-política no Brasil, estando inserido no Programa Governamental de Pesquisa de Plantas Medicinais. Os objetivos foram delineados com clareza e os métodos adaptados ou desenvolvidos para alcançá-los mostraram-se adequados. No entanto a utilização de relações planta:solvente diversas na análise de linearidade do método espectrofotométrico de doseamento de flavonóides totais deve ser revista. Contudo, este aspecto, não compromete o mérito científico do trabalho. É de ressaltar a boa qualidade de apresentação, tanto do trabalho escrito, como da exposição oral do mesmo. Sou de parecer favorável à aprovação do trabalho com o grau final 9,0.

Data: 31 de outubro de 1997.

  
Prof. Dra. Valquiria Linck Bassani,  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Área de concentração:

**DESENVOLVIMENTO E CONTROLE DE INSUMOS E MEDICAMENTOS**

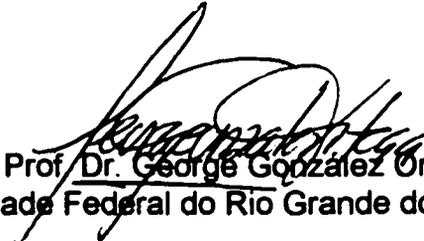
Título: "Padronização de extrato aquoso e desenvolvimento de produto seco por aspersão de *Phyllanthus niruri* L. - Euphorbiaceae (quebra-pedra)"

Mestrando: **LUIZ ALBERTO LIRA SOARES**

**P A R E C E R**

O trabalho de dissertação trata de assunto relevante, face à importância da espécie estudada, e insere-se dentro do Projeto de Pesquisa de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos - CEME. Dada a inexistência de referências dentro da literatura especializada, o trabalho pode ser considerado pioneiro na área da tecnologia de fitoterápicos. Os objetivos do trabalho são claros e a metodologia empregada bem descrita. Os resultados obtidos contribuem, certamente, ao estabelecimento de critérios de avaliação da qualidade a matéria-prima e da solução extrativa aquosa, assim como à obtenção de um produto seco por aspersão. Pelo caráter pioneiro, o trabalho deixa em aberto diversos aspectos de desenvolvimento tecnológico, os quais constituem um desafio para a realização de trabalhos futuros que venham a complementar. A discussão dos resultados é, de forma geral coerente com os resultados e objetivos propostos. A avaliação conjunta do trabalho demonstra um volume e de qualidade de resultados compatíveis com o grau de mestre pretendido pelo candidato.

Porto Alegre, 30 de outubro de 1997.

  
Prof. Dr. George González Ortega  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul