

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

Maytenus ilicifolia Martius ex. Reiss. - Celastraceae -

PROPOSTA TECNOLÓGICA DE MACERADOS

Dissertação apresentada por
SELMA LUCY FRANCO para ob-
tenção do grau acadêmico de
Mestre em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. PEDRO ROS PETROVICK

PORTO ALEGRE - 1990

Dissertação apresentada e aprovada em 18 de junho de 1990,
perante banca constituída pelos professores:

Prof. Dr. Eloir Paulo Schenkel

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Paulo de Oliveira

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Pedro Ros Petrovick

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

F826m Franco, Selma Lucy
Maytenus ilicifolia Martius ex. Reiss. Celastraceae -
proposta tecnológica de macerados.
153 + xxvp.
Dissertação (mestrado), Análise, Síntese e Controle de
Medicamentos. UFRGS.
1. Tecnologia farmacêutica: fitoterápicos.
I. Título

CDU: 615.4:615.322

Índices para catálogo: **sistemático**

615.4 **Tecnologia farmacêutica**
547.9 **Produtos naturais**
615.322 **Farmacognosia : Fitoterápicos**

Aos meus pais,
JOSÉ e AUGUSTA
e meus filhos,
MAÍRA, VINÍCIUS e RAONI.

AGRADECIMENTOS

A nossa formação é obtida da vivência, da discussão, das diferenças de idéias. As pessoas com as quais nos deparamos, nos ensinam, quer no campo profissional, quer no pessoal. Assim agradecemos a todos que direta ou indiretamente nos propiciaram este crescimento. Tentando fazer jus a estas pessoas, sabemos de antemão que podemos esquecer alguém, escrevemos seus nomes para que fiquem gravados neste trabalho com nossa gratidão:

- . Professora Amélia T. Henriques;
- . Professora Ana Maria Bergold;
- . Professora Diva Sonaglio;
- . Professor Eloir Paulo Schenkel;
- . Professora Elza Maria P. G. Barbosa;
- . Professora Grace Gosmann;
- . Ivone Job Antunes;
- . Professor João Carlos Palazzo de Mello;
- . Professora Elfrides Sherman Shapoval;
- . Karine Rossi;
- . Luciana Maria Kerber;
- . Professor Luis Carlos Marques;
- . Professora Mara Lane Carvalho Cardoso;
- . Marcos G. Sobral;
- . Margarida M. C. F. Ferreira;

- . Professora Marly Miriam de Souza Lima;
- . Professor Marco Dexheimer;
- . Professor Marco Aurélio Dornelles;
- . Miriam Knorst;
- . Nádia Volpato;
- . Rosana Isabel dos Santos e
- . Professora Silvia S. Guterres.

Agradecemos especialmente ao professor Dr. Pedro Ros Petrovick, pela orientação e estímulo.

À Célia Marly Franco Teles pelo carinho, organização, datilografia e força para continuar.

À Universidade Estadual de Maringá e à CAPES pelo incentivo e manutenção durante o curso.

RESUMO

A padronização de fitoterápicos leva a garantia de sua eficácia. Inicia-se na secagem, estabilização, moagem e acondicionamento. Devem ser estabelecidas técnicas de reconhecimento e manutenção das substâncias ativas, tanto na droga vegetal como em suas formas derivadas.

Maytenus ilicifolia Martius ex. Reiss. (Celastraceae) é planta popularmente conhecida como espinheira santa, cancerosa ou cancorosa. Tem sido empregada como analgésico, contraceptivo oral, cicatrizante e nas gastralgias.

Encontra-se no elenco de 20 plantas medicinais propostas pela Central de Medicamentos para estudos, já tendo sido comprovadas suas ações cicatrizante e protetora em dispepsias altas, bem como a baixa toxicidade e ausência de ação mutagênica.

Para caracterização da droga vegetal, estabeleceram-se parâmetros de qualidade, inicialmente como avaliação anatómica da droga onde puderam ser observadas estruturas características para *M. ilicifolia* como por exemplo a existência de parênquima paliçádico em três camadas.

Na análise química preliminar foi detectada a presença de carotenóides, flavonóides, taninóides e substâncias nitrogenadas. As duas últimas foram empregadas como substân-

cias referência no desenvolvimento de técnicas para quantificação.

A técnica de quantificação utilizada para taninos, é preconizada em farmacopéia, já para as metilxantinas, método de extração descrito por Stahl e por coluna Extrelut seguido de quantificação em espectrometria no ultravioleta.

Foram avaliados melhor os efeitos de diversos fatores tecnológicos sobre os macerados e submetidos a análise fatorial 4x2 e 3x2, onde foi possível avaliar o rendimento de extração das substâncias e de grupos específicos. Esta análise possibilitou avaliar qual fator que influencia a extração, selecionando o macerado que contém 50% de álcool e com 5 dias de contato, sendo o álcool responsável pelo efeito predominante.

O macerado padronizado foi submetido a estudos preliminares de estabilidade através de ensaios de degradação térmica, a 30, 40 e 60°C, com acompanhamento cromatográfico e doseamento de substâncias taninóides, observando-se degradação deste grupo, que ocorreu aparentemente sob cinética de primeira ordem.

ABSTRACT

The standardization of phytotherapeutic drugs guarantees their efficacy and safety. Such standardization begins in the steps of drying, stabilizing, grinding and storing. Techniques of recognizing and maintaining the active substances, both in plant and in derived forms must be established.

The leaves of *Maytenus ilicifolia* Martius ex. Reiss. (Celastraceae), popularly known as "espinheira santa", "cancerosa" or "cancorosa", have been used as analgesics, oral contraceptives, in wound healing and in alleviating gastric distress. The plant is among the 20 medicinal plants proposed for study by "CEME", the Brazilian national drug supply administration. To date, its beneficial actions in wound healing and in the treatment of dyspepsia have been clinical proven, as well as its low toxicity and absence of mutagenicity.

In this study, quality control parameters for the plant form were established, initially using *Maytenus ilicifolia*'s anatomic characteristics as for example, its three-layered palisadic parenchyma. Preliminary chemical analyses of the plant revealed carotenoids, flavonoids, tanninoids and nitrogenous compounds. The latter two substances were used as references in the development of quantification techniques.

Quantification by tanninoids, used in this work, is well

recognized in the pharmacopoeial literature. For methyl-xanthines, extraction techniques described by Stahl employing Extrelut column extraction followed by UV spectrophotometric quantification were utilized.

To better evaluate the effects of various techniques on the maceration of the plant, 4x2 and 3x2 factorial analyses were employed, permitting evaluation of the extractive yield of both specific substances and specific groups of substances. The analysis revealed alcohol to be of paramount importance, with the best extraction occurring with a maceration containing 50% alcohol with five days of contact.

A standardized macerate was submitted to preliminary stability studies through heat degradation experiments at 30, 40 and 60 degrees centigrade, degradation be followed by chromatography and by dosing of tanninoid substances. Degradation of these substances apparently followed first order kinetics.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
LISTA DE TABELAS	xv
LISTA DE FIGURAS	xxii
1. INTRODUÇÃO	1
2. PARTE EXPERIMENTAL	
2.1 MATERIAIS	
2.1.1 Material Vegetal	16
2.1.2 Aparelhos e Equipamentos	17
2.1.3 Substâncias Referências, Soluções e Reagentes	18
2.1.4 Sistemas Cromatográficos	20
2.1.5 Agentes Cromogênicos	22
2.2 METODOLOGIA	
2.2.1 Caracterização Morfológica	22
2.2.2 Caracterização Anatômica	23
2.2.3 "Screening" Fitoquímico	
2.2.3.1 Testes químicos preliminares	
2.2.3.1.1 Alcalóides	23
2.2.3.1.2 Antranóides	24
2.2.3.1.3 Polifenóis	24
2.2.3.1.4 Cardenolídeos	25
2.2.3.1.5 Taninos	25

2.2.3.1.6	Flavonóides	26
2.2.3.1.7	Saponinas	26
2.2.3.2	"Screening" por cromatografia em camada delgada	26
2.2.3.2.1	Preparo das soluções ...	26
2.2.3.2.2	Análise cromatográ- fica	27
2.2.4	Caracterização Cromatográfica de <i>Maytenus</i> <i>ilicifolia</i>	28
2.2.4.1	Perfil cromatográfico de <i>M. ilicifolia</i>	28
2.2.4.2	Comparação de <i>M. ilicifolia</i> com outras drogas e produtos comer- cializados sob a sinonímia de espinheira santa, espinheira di- vina, cancerosa	29
2.2.5	Secagem e Moagem do Material Vegetal	30
2.2.6	Perda por Dessecação	30
2.2.7	Perda por Secagem	30
2.2.8	Análise Granulométrica por Tamisação	30
2.2.9	Determinação do Teor Extrativo	31
2.2.10	Determinação de Taninos	32
2.2.11	Métodos de Extração	
2.2.11.1	Turbolisação	33
2.2.11.2	Maceração	34
2.2.11.3	Infusão	34
2.2.12	Caracterização dos Extratos	
2.2.12.1	Determinação do resíduo seco (RS)	35
2.2.12.2	Determinação da densidade ...	35
2.2.12.3	Determinação do teor alcoólico ...	35
2.2.12.4	Determinação do pH	35
2.2.13	Quantificação dos Macerados	
2.2.13.1	Doseamento químico de taninos	36
2.2.13.2	Doseamento para cafeína	36

2.2.13.3	Quantificação para cafeína após cromatografia em coluna Extrelut	37
2.2.14	Avaliação da Presença de Cafeína	
2.2.14.1	Extração com solventes	38
2.2.14.2	CCD - Bidimensional	38
2.2.15	Espectroscopia no Ultravioleta e Visível de Substâncias isoladas de <i>M. ilicifolia</i>	39
2.2.15.1	Substância M1	39
2.2.15.2	Substância M2	39
2.2.16	Avaliação tecnológica do extrato de <i>M. ilicifolia</i>	40
2.2.17	Estudos Preliminares da Estabilidade	42

3. RESULTADOS

3.1 CARACTERIZAÇÃO DA DROGA

3.1.1 Caracterização Botânica

3.1.1.1	Anatômica	44
3.1.1.2	Morfológica	47

3.1.2 Caracterização Química

3.1.2.1 Testes químicos preliminares

3.1.2.1.1	Alcalóides	48
3.1.2.1.2	Antranóides	48
3.1.2.1.3	Substâncias fenólicas	48
3.1.2.1.4	Taninos	49
3.1.2.1.5	Flavonóides	49
3.1.2.1.6	Cardenolídeos	49
3.1.2.1.7	Saponinas	49

3.1.2.2 "Screening" - cromatografia em camada delgada

3.1.2.2.1	Taninos	50
3.1.2.2.2	Saponinas	51
3.1.2.2.3	Saponinas, cumarinas e flavonóides	52
3.1.2.2.4	Quinonas	53

3.1.3	Perfis Cromatográficos de <i>Maytenus ilicifolia</i> ...	54
3.1.3.1	Comparação cromatográfica de <i>Maytenus ilicifolia</i> com outras espécies	61
3.1.4	Detecção de Substâncias em	
3.1.4.1	Detecção da cafeína	65
3.1.4.2	Caracterização de M1, M2 e M3	70
3.1.4.2.1	Substância M1	70
3.1.4.2.2	Substância M2	71
3.1.4.2.3	Substância M3	72
3.1.5	Perda por Secagem	73
3.1.6	Perda por Dessecação	74
3.1.7	Análise Granulométrica	74
3.1.8	Determinação do Teor Extrativo (TE) de folhas de <i>M. ilicifolia</i>	75
3.1.9	Determinação de Taninos	76
3.2	CARACTERIZAÇÃO DOS MACERADOS	
3.2.1	Determinação do Resíduo Seco (RS)	77
3.2.2	Determinação da Densidade dos Macerados e Extrato Referência	77
3.2.3	Determinação do Teor Alcoólico	78
3.2.4	Determinação do pH	79
3.2.5	Coloração dos Extratos	80
3.3	QUANTIFICAÇÃO DOS MACERADOS	
3.3.1	Doseamento Químico de Taninos	80
3.3.2	Avaliação Espectrofotométrica para Cafeína ..	82
3.3.2.1	Avaliação para cafeína no ultravioleta - extração com solvente	82
3.3.2.2	Doseamento para cafeína através de coluna Extrelut	84
3.4	ESTUDOS PRELIMINARES DA ESTABILIDADE	85

4. DISCUSSÃO	96
5. CONCLUSÕES	142
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	144

LISTA DE TABELAS

Tabelas	Página
1 - Descrição das especialidades farmacêuticas contendo droga rasurada, adquiridas no mercado	17
2 - Descrição das amostras sob a forma de tintura adquiridas no mercado	17
3 - Análise de variância dos fatoriais 4x2 e 3x2 tendo como variáveis dependentes resíduo seco (RS), taninos totais (TT) e tanantes (T)	41
4 - Representação das observações do fatorial 4x2 (4 concentrações etanólicas - A e 2 tempos de maceração - B), A1 - 50%; A2 - 60%; A3 - 70%; A4 - 96% e B1 - 5 dias; B2 - 10 dias de maceração	42
5 - Caracterização morfológica de <i>Maytenus ilicifolia</i> , <i>Sorocea bonplandii</i> , <i>Iodina rhombifolia</i> , <i>Citronella gongonha</i> e amostras M1, M2 e M3	47
6 - Análise cromatográfica para taninos em <i>M. ilicifolia</i>	51
7 - Comportamento frente ao agente cromogênico R2 de substâncias detectadas em <i>M. ilicifolia</i>	52
8 - Comportamento cromatográfico das substâncias detectadas em <i>M. ilicifolia</i>	53

Tabela	Página
9 - Comportamento cromatográfico das substâncias detectadas em <i>M. ilicifolia</i> após nebulização com R8 e R9	54
10 - Comportamento cromatográfico de <i>Maytenus ilicifolia</i> no sistema II	55
11 - Comportamento cromatográfico de <i>M. ilicifolia</i> (sistema VIII)	56
12 - Comportamento cromatográfico dos extratos de <i>M. ilicifolia</i> (sistemas IX, X e IV), utilizando como agentes cromogênicos R1 e R4	58
13 - Comportamento cromatográfico dos extratos alcoólico, hidroalcoólico e aquoso de <i>M. ilicifolia</i>	60
14 - Comportamento cromatográfico (sistema I)	62
15 - Comportamento cromatográfico de substâncias detectadas no cromatograma da Figura 13 (sistema I)	64
16 - Dados do cromatograma para xantinas	66
17 - Dados da cromatografia bidimensional para xantinas	67
18 - Comportamento cromatográfico da análise de xantinas em <i>M. ilicifolia</i> (sistema V)	68
19 - Comportamento cromatográfico de substâncias detectadas no sobrenadante da análise de xantinas (sistema XVI)	69
20 - Comportamento cromatográfico de substâncias detectadas em cromatografia circular (sistema VI)	70
21 - Comportamento espectroscópico no ultravioleta de M2 em metanol	72

22 - Perda por secagem (PS) das folhas de <i>Maytenus ilicifolia</i> sem rasurar, em estufa de ar circulante a 40°C, em função do tempo	73
23 - Perda por dessecação (PD) das folhas rasuradas de <i>M. ilicifolia</i> a 105°C	74
24 - Análise granulométrica por tamisação de <i>M. ilicifolia</i>	74
25 - Determinação do teor extrativo de folhas frescas de <i>M. ilicifolia</i>	75
26 - Determinação do teor extrativo de folhas secas de <i>M. ilicifolia</i> em função da granulometria	75
27 - Determinação do teor extrativo de folhas secas de <i>M. ilicifolia</i> em função do tempo de armazenamento	75
28 - Validação do método de doseamento para taninos, utilizando taninos SETA e <i>Rathania radix</i>	76
29 - Determinação quantitativa de taninos em folhas de <i>M. ilicifolia</i>	76
30 - Resíduo seco (RS) dos extratos macerados em função da concentração etanólica (CE) e do tempo de maceração (TM) e do extrato referência (ER)	77
31 - Densidade dos macerados após 5 dias de contato e do ER determinada por areômetro e por picnômetro em função da concentração etanólica	77
32 - Densidade dos macerados após 10 dias de contato e do ER determinada por areômetro e por picnômetro, em função da concentração etanólica	78

- 33 - Teor alcoólico (TA) dos extratos após 5 dias de maceração (M), em função da concentração etanólica (CE) do mênstruo e do ER, determinado pelo método da FARMACOPEIA (1977) empregando areômetro e picnômetro 78
- 34 - Teor alcoólico (TA) dos extratos após 10 dias de maceração (M), em função da concentração etanólica (CE) do mênstruo e do extrato referência (ER), determinado pelo método da FARMACOPEIA (1977), empregando areômetro e picnômetro 79
- 35 - Valores de pH dos extratos em função da concentração etanólica (CE) do mênstruo e do tempo de maceração (TM), do extrato referência (ER), dos mênstruos e da água 79
- 36 - Coloração dos extratos em função do tempo de maceração 80
- 37 - Doseamento de taninos nos extratos de *M. ilicifolia* após 5 dias de maceração em função da concentração etanólica (CE) do mênstruo com pó de pele 80
- 38 - Doseamento de taninos nos extratos de *M. ilicifolia* após 5 dias de maceração, em função da concentração etanólica (CE) do mênstruo, utilizando como substância precipitante a caseína 81
- 39 - Doseamento de taninos nos extratos de *M. ilicifolia* após 10 dias de maceração, em função da concentração etanólica (CE) do mênstruo, utilizando pó de pele como precipitante 81

40 - Doseamento de taninos dos extratos de <i>M. ilicifolia</i> , após 10 dias de maceração, em função da concentração etanólica (CE) do menstruo, empregando caseína como precipitante	81
41 - Doseamento de taninos no extrato referência (ER) de <i>M. ilicifolia</i> empregando como precipitantes pó de pele e caseína	82
42 - Avaliação da cafeína em UV a 272,8 nm após extração, em função do tempo de maceração (TM) e concentração etanólica (CE) do menstruo	82
43 - Dados da curva de calibração de cafeína em etanol absoluto a 272,8nm	83
44 - Concentração de cafeína nos macerados, em função do tempo de maceração (TM), da concentração etanólica (CE) do menstruo, por espectrometria no ultravioleta a 272nm, após extração e purificação por coluna Extrelut	84
45 - Curva de calibração de cafeína padrão após passagem por coluna Extrelut a 272nm	84
46 - Curva de calibração de cafeína em diclorometano, a 272 nm	85
47 - Concentração de taninos totais (TT) no extrato de <i>M. ilicifolia</i> quando submetido a 30°C, em função do tempo de exposição	85
48 - Concentração da fração tanante (T) no extrato de <i>M. ilicifolia</i> , quando submetidos a 30°C, em função do tempo de exposição	86
49 - Concentração da fração não-tanante (NT) no extrato de <i>M. ilicifolia</i> quando submetidos a	

	30°C, em função do tempo de exposição	86
50 -	Concentração de taninos totais (TT) no extrato de <i>M. ilicifolia</i> quando submetido a 40°C, em função do tempo de exposição	87
51 -	Concentração da fração tanante (T) no extrato de <i>M. ilicifolia</i> quando submetido a 40°C, em função do tempo de exposição	87
52 -	Concentração da fração não-tanante (NT) no extrato de <i>M. ilicifolia</i> quando submetido a 40°C, em função do tempo de exposição	88
53 -	Concentração de taninos totais (TT) no extrato de <i>M. ilicifolia</i> quando submetido a 60°C, em função do tempo de exposição	88
54 -	Concentração da fração tanante (T) no extrato de <i>M. ilicifolia</i> quando submetido a 60°C, em função do tempo de exposição	89
55 -	Concentração da fração não-tanante (NT) no extrato de <i>M. ilicifolia</i> quando submetido a 60°C, em função do tempo de exposição	89
56 -	Comportamento cromatográfico de substâncias detectadas no extrato padronizado de <i>M. ilicifolia</i> a 30°C	91
57 -	Comportamento cromatográfico das substâncias detectadas no extrato padronizado de <i>M. ilicifolia</i> , exposto à temperatura de 40°C	93
58 -	Comportamento cromatográfico das substâncias detectadas no extrato padronizado de <i>M. ilicifolia</i> , exposto à temperatura de 60°C	95
59 -	Comparação entre dois métodos extrativos (turbolisação e maceração).....	122

Tabela	Página
60 - Análise de variância de resíduo seco (RS), fatorial 4 x 2	128
61 - Resultados do teste Newman-Keuls para o re- síduo seco ($\alpha = 0,05$)	129
62 - Análise de variância de taninos totais se- gundo fatorial 3 x 2	130
63 - Resultados do teste Newman-Keuls ($\alpha = 0,05$) para taninos totais	131
64 - Análise de variância de tanantes, segundo fatorial 3 x 2	131
65 - Resultados do teste Newman-Keuls para subs- tâncias tanantes ($\alpha = 0,05$)	132

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1 - Corte transversal da nervura central de <i>M. ilicifolia</i>	44
2 - Corte transversal do limbo de <i>Maytenus ilicifolia</i>	45
3 - Corte transversal do limbo de <i>Maytenus ilicifolia</i> . Mesófilo em detalhe	46
4 - Análise cromatográfica preliminar para taninos de <i>M. ilicifolia</i> (Sistema XI)	50
5 - Análise cromatográfica preliminar para saponinas em <i>M. ilicifolia</i> (Sistema XII)	51
6 - Análise cromatográfica de saponinas, cumarinas e flavonóides em <i>M. ilicifolia</i> (Sistema VII)	52
7 - Análise cromatográfica de quinonas em <i>M. ilicifolia</i> (Sistema XIII)	53
8 - Comportamento das manchas na análise cromatográfica de <i>M. ilicifolia</i> (Sistema II)	54
9 - Cromatografia de <i>M. ilicifolia</i> (Sistema VIII)	56
10 - Análise cromatográfica de <i>M. ilicifolia</i> nos sistemas A = IX; B = X; C = IV	57
11 - Análise cromatográfica de <i>M. ilicifolia</i> em função do líquido extrator (Sistema I)	59

Figura	Página
12 - Cromatografia comparativa (Sistema I) <i>Maytenus ilicifolia</i> , <i>Iodina rhombifolia</i> , M1, M2, M3, <i>Sorocea bonplandii</i> , <i>Citronella gon-</i> <i>gonha</i>	61
13 - Cromatografia comparativa de <i>M. ilici-</i> <i>folia</i> com drogas adquiridas no mercado (Sistema I)	63
14 - Cromatografia para xantinas (Sistema IV)	65
15 - Cromatografia bidimensional para com- provação de xantinas (Sistemas I e V)	66
16 - Cromatografia comparativa entre amos- tras obtidas na quantificação e pa- drões de metilxantinas (Sistema V)	67
17 - Cromatografia de detecção de degrada- ção da substância M3 (Sistema XVI)	68
18 - Cromatografia circular para detecção de xantinas (Sistema VI)	69
19 - Espectro no Visível de M1 em clorofór- mio	70
20 - Espectro no ultravioleta de M2 em me- tanol	71
21 - Espectros no ultravioleta de M3 em eta- nol	72
22 - Cromatografia do extrato padronizado de <i>M. ilicifolia</i> , submetido à temperatura de 30°C, em função do tempo de exposi- ção	72
23 - Cromatografia do extrato padronizado de <i>M. ilicifolia</i> , submetido à temperatura 40°C em função do tempo de exposição	92

Figura	Página
24 - Cromatografia do extrato padronizado de <i>M. ilicifolia</i> , submetido a 60°C, em função do tempo de exposição	94
25 - Perda por secagem das folhas de <i>M. ilicifolia</i> mantidas em estufa de ar circulante a 40°C	108
26 - Perda por dessecação (PD) das folhas de <i>M. ilicifolia</i> a 105°C em função do tempo de ensaio	109
27 - Histograma da distribuição granulométrica da droga rasurada	111
28 - Curvas acumulativas de retenção (R) e passagem (P) após tamisação da matéria-prima vegetal	112
29 - Análise da estabilidade da droga através do teor extrativo (TE) em função do tempo de armazenagem	113
30 - Influência da concentração etanólica (CE) do líquido extrator e tempo de maceração (TM) sobre o pH dos macerados	115
31 - Teor alcoólico 5 dias e 10 dias de maceração com auxílio de picnômetro	117
32 - Teor alcoólico 5 e 10 dias de maceração com auxílio de areômetro	118
33 - Influência da concentração etanólica do líquido extrator e do tempo de maceração sobre o resíduo seco	119
34 - Influência da concentração etanólica do líquido extrator e tempo de maceração sobre a concentração de taninos totais e	

Figura	Página
fração tanante	121
35 - Curva de calibração de cafeína em etanol a 272,8nm	124
36 - Curvas padrão UV direto e indireto a 272nm em diclorometano	126
37 - Curvas representativas de degradação de acordo com a cinética de 1ª ordem. Concentração de taninos totais (TT), obtida de macerados submetidos à 30, 40 e 60°C	135
38 - Curvas representativas de degradação de acordo com a cinética de 1ª ordem. Concentração da fração tanante (T), obtida de macerados submetidos à 30, 40 e 60°C	137
39 - Curvas representativas de degradação de acordo com a cinética de 1ª ordem. Concentração da fração não-tanante (NT), obtida de macerados submetidos à 30, 40 e 60°C	138
40 - Determinação da ordem de reação através da escolha da melhor reta, para taninos totais (TT)	140

INTRODUÇÃO

O homem desde remotos tempos faz uso de plantas medicinais, buscando a cura dos seus males. Com o advento da 2ª Guerra Mundial, houve um declínio no consumo devido aos medicamentos contendo substâncias isoladas. Nos últimos 20 anos tem-se observado um retorno em maior escala às plantas medicinais, levando a maior necessidade de estudo químico-farmacológico das mesmas. Este estudo é desenvolvido a partir de informações populares do uso da planta sendo submetida a triagem química-farmacológica e, em fase posterior, direcionando para estudos mais específicos (FARNSWORTH, 1985).

O Brasil apresenta vasta flora medicinal, constando com destaque na economia mundial dos fitoterápicos, com grande variação climática e fitogeografia bem definida (RENNÓ, 1971).

O desconhecimento atual das plantas, de suas substâncias ativas e suas propriedades farmacológicas é a parte imersa do "iceberg", uma massa enorme de informações originais que estão ignoradas. Fazer emergir estas informações de maneira racional é uma tarefa difícil, por vezes uma fonte de desilusões, de equívocos, necessitando de modificações continuadas dos métodos de trabalho e orientação da pesquisa (PATRI, 1984).

Nos países desenvolvidos a utilização de drogas deriva-

das de plantas medicinais está em torno de 25% (EUA). Na China e Japão há o grande interesse industrial, já que o consumo "in natura" é muito grande, de 5.767 medicamentos na China, 4.773 são fitoterápicos. Com abertura da fronteira, houve aumento do consumo na Europa e Oriente Médio (PETROVICK et alii, 1988).

O aspecto econômico no Brasil é muito sério, como o replantio é oneroso, gera a exploração irracional, podendo levar a extinção de muitas espécies medicinais. Quando o homem brasileiro começar a repor o que retira da natureza, haverá a manutenção do equilíbrio. Haverá a necessidade dos órgãos financiadores de pesquisas no Brasil, não esquecerem de investir na pesquisa do replantio. Ligado ao aspecto econômico há o social, o alto custo do medicamento sintetizado, a pobreza reinante no país, a promulgação da "Carta Constitucional" e o estabelecimento do SUS (Sistema Unificado de Saúde), que responsabiliza o Estado pela saúde de toda população.

Entre outras práticas de saúde está o medicamento que exige boa quota dos recursos públicos destinados à saúde. A fitoterapia já é parte da cultura popular, surge como alternativa econômica. Há no entanto, necessidade de estudo químico-farmacológicos das plantas medicinais para que a população possa utilizá-las com segurança. Isto tem sido fomentado pela Central de Medicamentos e órgãos financiadores tais como CAPES e CNPq que objetivam a devolução da informação rapidamente à população.

Nos últimos 10 anos o assunto mais freqüente com relação aos fitoterápicos é o asseguramento e a manutenção da qualidade. Para alcançar a qualidade final, deve-se ter em mente a

necessidade de padronizar desde a coleta, secagem, bem como todo processo de manufatura, que são características para cada espécie vegetal.

MENßEN (1979) discute o problema da insegurança na terapia, devida a grande oscilação de concentração de substâncias ativas e ligada às características ambientais (clima, solo, radiação solar) e estágio de desenvolvimento da planta no período de coleta.

As Boas Práticas de Fabricação (GMP) estabelecidas em 1969 pela Organização Mundial da Saúde (OMS) preconizam um certo número de disposições relativas às regras de obtenção de medicamento e ao controle de qualidade (VALERY, 1989). Estas regras podem perfeitamente ser aplicadas para produção de fitoterápicos, desde insumos até o produto final (ROBERT et alii, 1979).

Há o questionamento por parte de alguns autores (MENEN, 1981; PETROVICK et alii, 1988), de que, se os fitoterápicos pertencem ao arsenal terapêutico devem ser tratados como tal, quanto às exigências de fabricação e controle de qualidade, estabelecendo normas de identificação dos mesmos, já que qualidade significa terapia com efeitos mantidos.

A identificação botânica das espécies é indispensável para o desenvolvimento da padronização, de acordo com os dados morfológicos, anatômicos e fisiológicos. No Brasil a flora é vasta e a bibliografia ainda é restrita, muitas vezes, para melhor classificação, faz-se necessário associar a esta, a análise química. Normalmente é feita por reações químicas clássicas e/ou

traçando-se o perfil cromatográfico, método relativamente fácil e rapidamente executável após fixadas as condições.

Para o estabelecimento destas condições geralmente há a necessidade de conhecer as substâncias ativas e/ou substâncias referências (marcadoras). Geralmente as substâncias marcadoras são utilizadas quando as substâncias ativas estão em baixíssima concentração, sejam muito instáveis, ou de difícil detecção e portanto não permitam reprodutibilidade da técnica. A substância marcadora serve para a determinação da qualidade, sendo garantia para o uso terapêutico e como material de reconhecimento científico (MENßEN, 1981).

Na obtenção de fitoterápicos há um ciclo farmacêutico, com uma seqüência de ações de transformações fornecendo produto intermediário e/ou forma farmacêutica. Nesta fase são estabelecidas as características pretendidas da matéria-prima e são fixadas as melhores técnicas para secagem, moagem, granulometria objetivando a qualidade da droga.

A escolha do método de secagem do material depende essencialmente da natureza das substâncias ativas, das características da droga, temperatura e da umidade relativa do ar.

Entre os vários métodos, há secagem ao ar livre característica de climas tropicais, secagem a altas temperaturas (70-110°C) por curto período e os métodos propostos por NGUYEN-HIÊP et alii (1964) onde a secagem é feita com temperaturas variando de 10-120°C com circulação de ar, ou raios infravermelho ou vácuo, estabelecendo por tentativa o tempo necessário para a estabilização da droga. Estes processos visam a inativação enzimá-

tica. MENßSEN (1979) alerta para o problema desta inativação ser temporária ou seja, ao colocar a droga em contato com o líquido extrator, haver a continuidade do processo de desorganização e deterioração da droga.

A perda por secagem, apesar de não constar nos códigos oficiais, é um recurso tecnológico de grande valia. Aliado a perda por dessecação, método farmacopêico, permite avaliar e controlar a secagem da droga.

Ainda dentro dos critérios necessários para caracterização da matéria-prima podem ser determinados a variação granulométrica, o teor extrativo e avaliação quantidade das substâncias marcadoras.

A análise granulométrica torna-se importante no processo de padronização, por fornecer a distribuição das partículas e o diâmetro médio delas. Estes fatores são determinantes no rendimento da extração das substâncias ativas presentes na droga (VOIGT, 1980).

Uma técnica para caracterização da qualidade de drogas, instituída em códigos oficiais e oficiosos (FARMACOPEIA, 1988; BUNDESVEREINIGUNG, 1986), além de ser preconizada pela Organização Mundial de Saúde (ZHI-CEN, 1980), é a determinação do teor extrativos (TE), que traduz a quantidade de todas substâncias extraíveis sob condições pré-determinadas. Embora seja uma técnica inespecífica, é de grande valia para assegurar a qualidade das drogas vegetais, quer como matéria-prima, quer como produto intermediário no ciclo de transformações. Esta técnica é bem reprodutível e caracterizadora da matéria-prima, já que é diferen-

ciada para as diversas plantas medicinais. Permite avaliar, quando há a quantificação de grupos de substâncias ativas, a relação entre estas e o total de substâncias extraídas. Aliado a isto é um método facilmente realizável e com custo reduzido para a indústria de fitoterápicos.

A padronização da matéria-prima bem realizada não assegura porém, isoladamente, o alcance da qualidade no produto final, se não forem conhecidas e determinadas as condições de extração, dentre elas a escolha do solvente, a qual deve ser criteriosa, considerando que este deva promover boa dissolução dos constituintes, possuir baixo ponto de ebulição, sem resíduo de destilação, não ser inflamável (STELLMACH, 1980; ROSS & BRAIN, 1977) e, quando há manutenção do solvente na forma farmacêutica, deve-se observar sua compatibilidade fisiológica.

Em extrações não é recomendável utilizar a água, pois, além de extrair considerável quantidade de substâncias que são responsáveis pela hidrólise ou oxidação, extrai junto mucilagens e carboidratos que formam soluções viscosas dificultando o processo de filtração. Além disso é excelente meio de crescimento de microorganismos. O álcool é um bom solvente para as substâncias ativas e não dissolve gomas, açúcares e proteínas. Inibe a ação enzimática e o crescimento microbiano. Assim, o ideal é a utilização de soluções hidroalcoólicas que combinam as ações do álcool e água (PARROT, 1971), podendo promover um aumento no conteúdo de sólidos totais (PAL & NANDY, 1983).

Granulometria, pH, tempo de contato e temperatura são fatores acessórios para a obtenção de maior rendimento na extração. De acordo com as substâncias a serem extraídas, é possível

alterar-se o pH do líquido extrator e aumentar o rendimento. A granulometria é um fator já preconizado como importante e até decisivo em alguns casos para melhor extração. Partículas maiores fornecem menor superfície de contato com o líquido extrator, enquanto que partículas muito pequenas podem reter as substâncias ativas no marco (VOIGT, 1980). O tempo de contato melhora o rendimento de extração, no entanto, é importante considerar que o estabelecimento do tempo de extração deve ser racional, já que em alguns casos as substâncias ativas apresentam tendência a se instabilizar em solução, demonstrando ao final de longo período resultados semelhantes ao obtido após 10 ou 15 dias de maceração. Isto leva a perda do tempo para extrair as substâncias ativas com conseqüente acréscimo no preço do extrato. Usualmente o tempo fixado é no mínimo 5 dias e no máximo na faixa de 10 a 15 dias.

A temperatura é um fator que está intimamente ligado à extração das substâncias ativas se termolábeis ou termorresistentes.

Dentre os vários métodos extrativos, a maceração destaca-se por proporcionar bom rendimento, ser mais simples, permitindo sua execução sem requerer equipamentos sofisticados. Se bem estabelecido o tempo de contato entre droga e líquido extrator, o problema de instabilidade das substâncias torna-se insignificante diante do rendimento.

Se há a possibilidade de determinar qual ou quais constituintes apresentam ação farmacológica, tem-se agora dois caminhos a percorrer. A extração destas substâncias ativas para ser transformadas em uma forma farmacêutica intermediária ou produto

final, ou o isolamento das mesmas. LIST (1969) questiona se após detecção da substância ativa é melhor isolá-la ou se sua ação seria mais eficaz em conjunto com substâncias em uma preparação galênica. Exemplo disto é apresentado em estudos com extratos de beladona e soluções de alguns de seus alcalóides, em que obtiveram-se respostas terapêuticas diferentes.

Ainda com relação às preparações extrativas, alguns fatores propostos por BONATI (1980) devem ser considerados, como a escolha do solvente, conforme exposto anteriormente, observando a solubilidade e estabilidade das substâncias a serem extraídas, a forma física do extrato que se pretenda (extrato mole, fluido ou seco), observando ainda as características da substância ativa para que ela permaneça estável física e quimicamente.

Independente de sua consistência, o extrato deve apresentar conteúdo definido em substância ativa ou referência, e ser otimizada as condições de obtenção. O preparo de extratos padronizados quali e quantitativamente é dificultado pelo incompleto conhecimento de sua composição e pela inadequação dos métodos de análise; este fato prejudica a manutenção da qualidade entre os diferentes lotes do produto (CRIPPA, 1980).

Incluída no elenco de plantas medicinais proposto pela CEME (Central de Medicamentos) para serem estudadas, está *Maytenus ilicifolia* Martius ex Reissek (Celastraceae), conhecida popularmente como espinheira santa, cancorosa, cancerosa, coromilho do campo, salva-vidas, espinho de Deus, espinheira divina, tem sido usada no Paraguai pelas populações indígena e rural como controlador da natalidade (SCHVARTZMAN et alii, 1976; ARENAS et alii, 1977). Na Argentina é utilizada como antiasmático, sia-

lagogo, antisséptico e vulnerário (AHMED et alii, 1981). No Brasil utilizada como abortiva e emenagoga (AZORERO & SCHVARTZMAN, 1975), no tratamento do câncer de estômago (PIO CORREA, 1952), como tônica (MELLO, 1980), analgésica, cicatrizante, antisséptica, em gastralgias e como diurética (COIMBRA, 1958).

A importância do vegetal tem motivado diversos centros de pesquisa a realizarem estudos fitoquímicos, farmacológicos e sobre o cultivo racional extensivo, existindo hoje no Brasil, no mínimo cinco grupos avaliando estes fatores: Universidade Federal de Minas Gerais, Universidade de Campinas, Universidade de São Paulo-Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo - SP e Fundação Ezequiel Dias (Belo Horizonte). Com relação aos estudos farmacológicos, LIMA (1969) comprovou a ação antimicrobiana em gram positivos (*Bacillus*, *Staphylococcus*, inclusive *S. faecalis*). STELLFELD (1935) detectou ação diurética e analgésica, LIMA (1969), ação antineoplásica, atividade antitumoral contra sarcoma de Yoshida de ratos albinos e sarcoma 180 de camundongos albinos suíços. MELLO (1974), ação anticâncer de pele com baixa irritabilidade, com propriedades antineoplásicas tardias e mais eficazes. CARLINI e BRAZ (1988) comprovaram ação protetora do abafado (infuso) contra úlcera experimental em ratos. KITAJIMA & SOHMA (1986) relataram que a ação e o mecanismo de ação são comparáveis a cimetidina. Quando testada a indução ao sono por via oral apresentou resultado negativo, quando administrado por via intraperitoneal, houve diminuição significativa da atividade locomotora, aumentando o tempo do sono induzido por pentobarbital, contestando o relato da indução ao sono. Não apresentou alterações quanto à fertilidade de ratos e quando administrado chá antes ou depois da prenhez, não apresentou efeitos teratogênicos

(CARLINI, 1988).

Os estudos químicos de *Maytenus ilicifolia* iniciaram-se em 1934 com STELFELD, descrevendo a presença de iodo, enxofre, fósforo, sódio, cálcio, taninos, resina levemente aromática, cera, clorofila, corante e mucilagem. LIMA (1971) isolou maitenina e pristimerina. HNATYSZYN et alii (1974) detectaram, no chá de talos, ramos, folhas e raízes a presença de aminoácidos, fenóis, taninos, fitoesteróides insolúveis em água, leucoantocianidinas e saponinas. AHMED et alii (1981) quantificaram maitansinóides (maitansina, maitanprima, maitanbutina) em decocto das folhas, sementes e parte da raiz de *M. ilicifolia* por cromatografia líquida de alta eficiência. MANDICH (1984) detectou altas concentrações de taninos, chalconas e auronas. PEREIRA (1962) descreveu a presença de maitenina, tanino, cálcio, magnésio, titânio e ácido clorogênico. WASICKY (1954) relatou presença de dulcitol e substâncias taninóides.

Apesar do grande consumo de plantas medicinais no país e no mundo, os estudos toxicológicos são mais restritos do que os químico-farmacológicos. Muitas plantas, consideradas medicinais, contêm substâncias com alta toxicidade sendo no entanto, consumidas com completo desconhecimento e às vezes até com certo descaso. PRISTA (1982) dizia que a sobredosagem e o mau uso dos vegetais medicamentosos podem também originar intoxicações irreparáveis. A prescrição e a venda sem regras de misturas medicinais podem originar problemas de toxicidade para os quais as autoridades sanitárias não estão suficientemente alertadas, mas que, em todo mundo, são objeto de atenção e estudo.

Um otimismo exagerado abrange hoje a fitoterapia clás-

sica, classificada como uma terapia não tóxica. Informações desta natureza são as mais encontradas na literatura popular, geralmente enquadrando os "milagres do fitoterápico". Há o questionamento por parte de alguns autores (MEERE, 1983; THESEN, 1988), se realmente os chás são tão saudáveis e tão úteis? Se o uso prolongado e indiscriminado não apresenta riscos? Se não é possível que os efeitos colaterais sobreponham-se aos efeitos terapêuticos?

FARNSWORTH (1985) propõe que se coloque na balança eficácia versus toxicidade e só assim se poderá avaliar, se a droga vegetal deverá ser utilizada como medicamento.

Os estudos toxicológicos realizado para *M. ilicifolia* mostraram que esta droga vegetal não apresentou nenhum efeito tóxico significante (CARLINI & FROCHTENGARTEN, 1988). Em doses centenas de vezes maiores que as usadas pelo homem não apresentam toxicidade (CARLINI et alii, 1988), não causam alterações quanto às séries branca e vermelha, não altera o estado geral como perda de peso, temperatura, bem como de vários parâmetros séricos e exame anátomo-patológico das visceras (CARLINI et alii, 1988). VARGAS et alii (1989) submeteram o extrato aquoso 50% (m/V) de *M. ilicifolia* a testes de mutagenicidade pelo teste AMES TA100 e TA98, obtendo resultados negativos, salientando que taninos são antimutagênicos.

Os controles organolépticos, físicos (pH, densidade, viscosidade) e químicos, podem dar uma indicação sobre a natureza do extrato, mas são insuficientes, por refletirem mais a imagem do solvente. Assim se faz necessário apelar para outros métodos (DIEMUCH, 1980).

A espectroscopia no ultravioleta de uma substância não tem geralmente um alto grau de especificidade, é no entanto, muito útil para as avaliações quantitativas.

Normalmente a quantificação de uma substância ou grupo de substâncias é feita por comparação simultânea com absorvância de substância referência. Quando as avaliações são realizadas com grande frequência, pode-se omitir o uso da substância referência e empregar uma curva padrão da mesma (FARMACOPÉIA Internacional, 1980).

A espectrometria pode, em certos casos, ser utilizada diretamente sobre o extrato diluído (DIEMUCH, 1980), mas são casos isolados, geralmente se faz necessário desenvolver e/ou fazer uso de métodos farmacopéicos ou não de extração.

GSTIRNER et alii (1956) avaliando a estabilidade de taninos em farmacógenos e tinturas de várias espécies vegetais, compararam métodos clássicos preconizados para a quantificação, optando entre outros, pelo método colorimétrico por aglutinação (com hemácias), método gravimétrico com pó de pele cromada e método colorimétrico com pó de pele. Os métodos colorimétricos e por aglutinação foram considerados pelo autor, os mais eficientes para quantificação de taninos.

O reativo Folin-Denis é constituído por uma mistura de ácido fosfotúngstico ($H_3PWO_{12}O_{40}$) e ácido fosfomolibdico ($H_3PMO_{12}O_4$) que é reduzido então pela oxidação dos fenóis, em uma mistura de óxidos azuis de tungstênio (W_8O_{23}) e do molibdênio (Mo_8O_{23}) (SWAIN, 1964). A coloração produzida com absorção máxima entre 725-750nm, é proporcional a taxa de compostos fenó-

licos (RIBÉREAU-GAYON, 1968). A reação não é específica, pois outros polifenóis podem reduzir o reagente. Para evitar este inconveniente, os taninos são precipitados ou adsorvidos da solução extrativa por técnicas apropriadas como gelatina, albumina, pó de pele, soluções de eritrócitos, etc. (REICHER, SIERAWSKI & CORREA, 1981).

O termo estabilidade aplicado a um medicamento se refere a capacidade deste em manter suas características iniciais dentro de determinados limites.

Um medicamento está submetido durante o seu armazenamento a diversas alterações ambientais como a luz, oxigênio do ar, etc.; mas há outra série de mudanças devidas ao transporte: com efeito, de acordo com a modalidade, o medicamento poderá se encontrar exposto a fatores mecânicos e climatológicos, que poderiam provocar desde ruptura da embalagem até um verdadeiro envelhecimento acelerado: a permanência do veículo transportador ao sol, pode acarretar a elevação da temperatura interior até 70°C. Os choques e as vibrações repetidas podem provocar alterações físico-químicas como cristalização, sedimentação, quebra de emulsões, erosão de comprimidos, etc.

O aumento da temperatura acelera praticamente todos os processos degradativos; as variações térmicas, por si só ou em combinação com outras causas de instabilidade, constituem sem dúvida o fator mais ativo e mais permanente de degradação de medicamentos. Os métodos de envelhecimento acelerado para o estudo de estabilidade de uma especialidade se baseiam em medir o efeito que produz, em curto tempo, uma elevação de temperatura constante ou uma alternância de temperaturas altas e baixas.

Até o princípio do século XVIII, a maioria dos medicamentos era total ou parcial de origem vegetal e, com segurança, o estado de conservação de uma preparação era julgado unicamente pelo seu estado macroscópico, mas as preparações eram extemporâneas ou era utilizado o farmacógeno para o preparo de chás. Atualmente, dado o aumento do consumo, tem-se tentado obter formas farmacêuticas estáveis sob a forma de extratos e tinturas, bem como, manutenção do teor de substâncias ativas na droga.

O planejamento fatorial objetiva proporcionar o máximo de informação, apresentando programa de trabalho o mais simples, eficiente e econômico possível. Tem como princípios básicos a reprodução aleatorizada e o controle local (OSTLE, 1977).

A análise de variância é um desenvolvimento lógico do teste t para diferenças de médias de duas populações, ao passo que, a análise de variância é técnica mais geral e pode ser utilizada para analisar diferença entre médias de 3 ou mais populações simultaneamente (PETERS & SUMMERS, 1973; BRUNING & KINTZ, 1968).

O planejamento completamente ao acaso (randomizado), permite investigar um conjunto de variáveis com outro conjunto, combinados entre si.

Newman-Keuls é um teste multiseriado que fornece informações das diferenças significativas, entre os níveis, possibilitando a comparação múltipla (MONTGOMERY, 1976). São comparadas as maiores médias com as menores. É um teste mais conservador que outros semelhantes, apresentando menor erro. Geralmente aplicado se o teste de Fisher é significativo para $\alpha = 0,05$ (MONTGOMERY, 1984).

O objetivo deste trabalho é o desenvolvimento galênico para a droga *M. ilicifolia* e a avaliação tecnológica dos fatores que influem na obtenção de forma farmacêutica dela derivada.

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1 MATERIAIS

2.1.1 Material Vegetal

As folhas de *M. ilicifolia* Mart. ex. Reiss. (Celastraceae) e *Sorocea bonplandii* (BAILL) BURGER, LANJ & BOER (Moraceae), foram coletadas em Encruzilhada do Sul (R.S.), em dezembro de 1986 e identificadas pelo técnico Marcos G. Sobral. *Iodina rhombifolia* HOOKER & ARNOTT (Santalaceae), adquirida no comércio de Porto Alegre e *Citronella gongonha* (MART.) HOWARD (Icacinaceae), cedida e ambas identificadas pela Botânica Lilian Auler Mentz, por comparação com exsicatas existentes no herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. M1, M2, M3 foram coletadas em Guaporé (R.S.) em abril de 1987 e fornecidas como *Maytenus ilicifolia*. Não foi possível identificar estas três últimas espécies.

As exsicatas das quatro primeiras espécies se encontram no herbário do Departamento de Botânica (UFRGS), com registro ICN nº 66752, 66756, 4384 e 2311, respectivamente.

Foram adquiridas amostras da droga rasurada, sob a for-

ma de "sachets" no comércio de Porto Alegre, com o nome popular de espinheira santa, espinheira divina, cancerosa, denominadas A₁, A₂, A₃ (Tabela 1) e tinturas T₁, T₂, T₃ (Tabela 2).

TABELA 1 - Descrição das especialidades farmacêuticas contendo droga rasurada adquiridas no mercado.

AMOSTRA	FABRICANTE	NOME POPULAR	LOTE	DATA DE FABRICAÇÃO
A ₁	Lab. Flora da Índia	espinheira santa	-	14.04.87
A ₂	LIFAR	espinheira santa	-	-
A ₃	Lab. Flora da Índia	cancerosa	-	-

TABELA 2 - Descrição das amostras sob a forma de tintura adquiridas no mercado.

AMOSTRA	FABRICANTE	NOME POPULAR	LOTE	DATA DE FABRICAÇÃO
T ₁	Lab. Flora da Índia	espinheira divina	-	11.02.87
T ₂	Lab. R. Paraná	espinheira santa	006/86	03.86
T ₃	Lab. Klein	espinheira divina	-	-

2.1.2 Aparelhos e Equipamentos

- Aparelho de tamisação vibratório RETSCH com tamises segundo a DIN 4188.
- Aerômetro DIN 12791 - série M100 473768 e 473870.
- Espectrofotômetro ultravioleta VARIAN - série 634 com registrador linear.

- . Estufa de ar circulante HERAEUS - B 5042 - tipo RVT 360.
- . Estufas termostatzadas BIOMATIC.
- . Evaporador rotatório BÜCHI - RV2.
- . Lâmpada universal de quartzo FLUOREST 254 e 365nm.
- . Moinho de martelos RETSCH.
- . pHmetro KNICK pH-mV-METER - tipo 520.
- . Prensa hidráulica manual HAFICO
- . Turbolizador ARNO super.
- . Microscópio fotográfico CARL ZEISS/JENA com câmara embutida.

2.1.3 Substâncias Referências, Soluções e Reagentes

Os solventes e reagentes utilizados possuem grau de pureza pró-análise, salvo os especificados no texto.

Substâncias de Referência

- Estricnina (Carlo Erba)
- Emodina (Merck)
- Digitoxina (Wellcome)
- Ácido tânico
- Saponina branca (Merck)
- Catequina (Roth)
- Rutina (Merck)
- Cumarina (Merck)
- Crisofanol (fornecido pelo laboratório de farmacognosia UFRGS).
- Emetina (Merck)
- Esparteína (Merck)

- Saponinas de *Thinouia coriacea* BRITTON (fornecidas pelo Prof. Dr. Eloir Paulo Schenkel).
- Cafeína (Carlo Erba)
- Teofilina
- Teobromina
- Pirogalol
- Taninos (SETA).

Soluções

- Ácido fosfotúngstico (Reagente Folin-Denis)
- Ácido sulfúrico 1N.
- Carbonato de sódio, 21,52% (m/V) e 1M.
- Cloreto de alumínio 5%
- Cloreto férrico 1%
- Ferrocianeto de potássio 1% (m/V)
- Gelatina 1%
- Hidróxido de amônio 6N
- Hidróxido de cálcio e sulfato de cobre 20% (m/V)
- Hidróxido de potássio 0,5N (m/V)
- Hidroalcoólica 50:50; 40:60; 30:70 (V/V)
- Peróxido de hidrogênio 5% (V/V)
- Tampão borato pH 7,0
- Tampão acetato pH 4,0
- Hipoclorito de sódio 5%.

Reativos, Substâncias Reagentes e Outros

- Reativo de Kedde (MARINI-BETTOLO, 1971)
- Magnésio em pó (Merck)

- Pó de pele levemente cromada (Merck)
- Extrelut = terra diatomácea (Merck)
- Azul de astra 1% (F. B. IV)
- Safranina 1% (F. B. IV)
- Hipoclorito de sódio 5%.

2.1.4 Sistemas Cromatográficos

Os cromatogramas em CCD foram desenvolvidos, quando não especificado diferentemente, em placas de vidro (20x20cm), preparadas em laboratório com suportes descritos abaixo em uma espessura de 0,25mm, empregando os eluentes respectivos (proporções volumétricas).

- I - Acetato de etila: ácido fórmico: água (95:5:5)
Silicagel GF₂₅₄
- II - Clorofórmio
Silicagel GF₂₅₄
- III - Água
Celulose microcristalina - Merck
- IV - Butanol-1: ácido acético: água (45:0,5:50 - Fase superior)
Celulose microcristalina - Merck
- V - Clorofórmio: etanol (99:1 - CS)
Silicagel GF₂₅₄
- VI - Metanol: hidróxido de amônio (100:1,5)
Cromatoplasmas HPTLC para nanocromatografia em camada delgada. Silicagel 60 F₂₅₄ 10x10cm.

- VII - Butanol-1: ácido acético: água (45:5:50 - fase superior)
Silicagel GF₂₅₄.
- VIII - Clorofórmio: acetato de etila: ácido fórmico (45:45:1,2)
Silicagel GF₂₅₄.
- IX - Ácido acético 2%
Papel filtro comum
- X - Ácido acético 2%
Celulose microcristalina - Merck
- XI - Clorofórmio: ácido acético: água (50:45:5)
Silicagel GF₂₅₄.
- XII - Tolueno: acetona: clorofórmio (40:25:35)
Silicagel GF₂₅₄.
- XIII - Acetato de etila: ácido fórmico: água (90:5:5)
Silicagel GF₂₅₄.
- XIV - Ciclohexano: dietilamina (9:1)
Silicagel GF₂₅₄.
- XV - Ciclohexano: dietilamina (9:1)
Celulose microcristalina - Merck
- XVI - Metanol: hidróxido de amônio (100:1,5)
Cromatoplasmas HPTLC para nanocromatografia em camada delgada sem indicador de fluorescência 10X10cm, silicagel 60G.

2.1.5 Agentes Cromogênicos

- R1 - Vanilina 1%: ácido clorídrico - 37% (0,5:1,0, V/V)
- R2 - Anisaldeído em ácido acético: ácido sulfúrico (0,5:1,0)
(BÖLLIGER & KÖNIG, 1969)
- R3 - Cloreto de antimônio III: clorofórmio (1:3) (STAHL, 1969)
- R4 - Solução de hidróxido de sódio 1N
- R5 - Reagente Dragendorff (MARINI-BÉTTOLO, 1971)
Solução A: (0,85g subnitrito de bismuto + 40,0 água destilada + 10,0 ml ácido acético)
Solução B: (8g iodeto de potássio + 20 ml de água).
Misturar A e B no momento do uso.
- R6 - Reagente sulfato cérico (STAHL, 1969)
- R7 - Solução alcoólica de iodo 2%: solução de ácido clorídrico (25%) em etanol 96° GL (1:1, V/V - STAHL, 1975).
- R8 - Ácido nítrico: 25% (V/V)
- R9 - Hidróxido de potássio 5% (m/V) em etanol
- R10- Ácido sulfúrico 49% (V/V) (STAHL, 1969).

2.2 METODOLOGIA

2.2.1 Caracterização Morfológica

Para análise morfológica foram consideradas as seguintes características: comprimento de folha, tipo de bordo, número de pares de espinhos, textura (folhas secas), tipo de nervura, comparando com descrições de LOURTEIG (1955), CABRERA (1965), MATTOS (1965), MIQUEL (1965-7).

2.2.2 Caracterização Anatômica

Os estudos anatômicos foram realizados de acordo com a metodologia tradicional de microtécnica vegetal: os cortes foram realizados em material seco incluído em suportes de cortiça, seccionados com lâmina, no sentido transversal, na região mediana da folha, incluindo parte da nervura central. Foi realizada clarificação dos cortes numa solução de hipoclorito de sódio (5%), lavados em água destilada e corados com sistema safranina 1% e azul de astra, após montadas as lâminas semi-permanentes em glicerina 33% (OLIVEIRA & AKISUE, 1983; BOMTEMPI JÚNIOR, 1988 - modificado).

2.2.3 "Screening" Fitoquímico

2.2.3.1 Testes químicos preliminares

2.2.3.1.1 Alcalóides*

Em tubo de ensaio contendo 2,0g da droga moída (200), adicionou-se 10,0ml de ácido clorídrico 1%, deixando 30 minutos em banho-maria. A suspensão foi filtrada sobre algodão para dois tubos de ensaio (A e B).

Ao tubo A adicionaram-se 5 gotas do reativo de Dragendorff. Para verificar se havia ocorrência de precipitação, utilizou-se como referência, solução de sulfato de estricnina 0,05%.

Ao tubo B adicionou-se solução saturada de carbonato de

* MARINI-BÉTOLO, 1971.

sódio 21,52%, até pH 8-9 e então adicionaram-se 4 ml de clorofórmio. A fase superior (B) foi retirada e tratada com gotas de ácido acético até aparecimento de cor marron amarelada (pH 5). Após, adicionaram-se 5 gotas de reativo de Dragendorff (R5). A formação de precipitado indica presença de **alcalóides quaternários**.

A fase clorofórmica (B) foi tratada com 2 ml de ácido clorídrico 1%. A camada superior formada, foram adicionados 5 gotas de reativo Dragendorff. A presença de precipitado indica existência de **alcalóides terciários**.

2.2.3.1.2 Antranóides

Em tubo de ensaio contendo 0,2g da droga moída (200), foram adicionados 5 ml de hidróxido de potássio 0,5N e 0,5 ml de peróxido de hidrogênio 5% e a seguir, a solução foi fervida em banho-maria durante dois minutos. Após esfriar, foi filtrada através de lã de vidro. Ao filtrado adicionou-se ácido acético glacial até pH 5. Foram misturados à solução resultante 5 ml de tolueno. A fração superior foi retirada e adicionada de 2 ml de hidróxido de potássio 0,5N. O aparecimento de cor vermelha indica presença de **antranóides**. O teste foi realizado usando emodina padrão 0,05% em tolueno.

2.2.3.1.3 Polifenóis

A 2,0 ml de solução obtida com 1,0g de planta moída (200-300) adicionada de 10,0 ml de água e aquecida em ba-

nho-maria por 30 minutos, adicionaram-se 2,0 ml de mistura recém-preparada de cloreto férrico 1% e ferrocianeto de potássio 1%.

2.2.3.1.4 Cardenolídeos*

Em tubo de ensaio contendo 3,0g de droga moída (200) adicionaram-se 10 ml de água destilada. Deixou-se à temperatura ambiente por duas horas, filtrou-se sobre algodão e dividiu-se em 2 tubos de ensaio (A e B).

Ao tubo A adicionaram-se 4 gotas do reativo de Kedde. Verificou-se o aparecimento de cor azul violeta.

Ao tubo B adicionaram-se 2 ml de clorofórmio. À fase inferior adicionaram-se 4 gotas do reagente de Kedde. Observou-se o aparecimento de cor. Utilizou-se como substância referência, solução de digitoxina 0,025% em metanol.

2.2.3.1.5 Taninos*

Foram aquecidos em um tubo de ensaio 3,0g da droga moída (200) com 10,0 ml de água por 5 minutos. Após esfriar a solução foi filtrada em papel filtro e adicionada de 5,0 ml de cloreto de sódio 2% para clarificar o filtrado e 5,0 ml de solução de gelatina 1%. Verificou-se possível precipitação. Utilizou-se como padrão, solução de ácido tânico 0,5%.

* MARINI-BÉTOLO, 1971.

2.2.3.1.6 Flavonóides - (DOMINGUEZ, 1973)

A 2,0 ml de solução obtida segundo o item 2.2.3.1.3, adicionaram-se alguns pedaços de magnésio e 10 gotas de ácido clorídrico concentrado. Agitou-se e observou-se o aparecimento de cor.

2.2.3.1.7 Saponinas (FARMACOPÉIA, 1988)

3,0g da droga moída (200) foram aquecidos em um tubo de ensaio com 10,0 ml de água destilada. A solução foi filtrada através de papel filtro à temperatura ambiente. O filtrado foi colocado em uma proveta e agitado por 5 minutos, após formar espuma. Adicionaram-se 5 gotas de ácido clorídrico. Foi observado se houve diminuição da espuma.

2.2.3.2 "Screening" por cromatografia sobre camada delgada

2.2.3.2.1 Preparo das Soluções

Cerca de 2-3g da planta moída (200) foram extraídos sequencialmente com 10,0 ml do sistema de solventes, a 50°C em banho-maria, por 5 minutos.

Inicialmente, procedeu-se ao desengorduramento com éter de petróleo (60-80°C). A fase de éter de petróleo foi descartada e o marco foi tratado com solução de clorofórmio: ácido acético (99:1, V/V) e após filtrar obteve-se a solução A.

O marco foi então extraído com solução de metanol: clo-

rofórmio: ácido acético (49,5:49,5:1,0;V/V), filtrou-se e obteve-se a solução B.

Para obtenção da solução C, tratou-se o marco com solução de metanol: água (1:1, V/V), filtrou-se e descartou-se o marco.

Na análise de alcalóides cerca de 2g da droga foram tratadas com 10,0 ml de ácido clorídrico 1% (V/V) à 40°C em banho-maria durante 30 minutos. Filtrou-se e alcalinizou-se com carbonato de sódio 1M até pH 8-9 e extraiu-se com clorofórmio (10,0 ml). A fase clorofórmica foi extraída com 5,0 ml de ácido clorídrico 1%. Esta solução ácida foi denominada solução D.

A fase aquosa foi neutralizada com ácido acético glacial e obteve-se a solução E.

2.2.3.2.2 Análise cromatográfica

Para pesquisar taninos cromatografou-se a solução B no sistema XI, e após eluição, detectou-se no ultravioleta (365 e 254nm), nebulizou-se com vanilina clorídrica (R1). Como padrão utilizou-se catequina.

Para o teste de saponinas foi cromatografada a solução B no sistema XII, tendo como substância referência saponinas extraídas de *Thinouia coriaceae* Britton, e saponina como padrão. A detecção foi realizada no ultravioleta (254 e 365nm) tendo como agente cromogênico anisaldeído sulfúrico (R2 - STAHL, 1969).

Para teste de saponinas, cumarinas e flavonóides, cromatografaram-se as soluções B e C no sistema VII, tendo como pa-

drões saponina (*Thinouia coriaceae*), rutina, cumarina, sendo detectadas no UV (254 e 365nm) e pelo agente cromogênico anisaldeído sulfúrico (R2).

As soluções A e B foram cromatografadas no sistema XIII, para pesquisar quinonas, tendo como padrão o crisofanol. As manchas foram detectadas no UV (365nm) e nebulizadas com ácido nítrico 25% (R8), com posterior aquecimento a 100°C por 10 minutos e com hidróxido de potássio 5% em etanol (R9).

As soluções D e E foram cromatografadas nos sistemas XI, XIV, XV, tendo como padrões a emetina e esparteína, detectadas no UV (254 e 365nm) e nebulizadas com agente cromogênico R5.

2.2.4 Caracterização Cromatográfica de *M. ilicifolia*

2.2.4.1 Perfil cromatográfico de *M. ilicifolia*

Cerca de 30µl dos extratos etanólico e hidroalcoólico 5% (V/V) e aquoso (infuso), preparados com 10% da droga, segundo itens 2.2.11.1 e 2.2.11.3 respectivamente, foram cromatografados sobre camada delgada, utilizando os sistemas cromatográficos I, II, III, IV, VIII, IX e X, detectados sob luz ultravioleta (254 e 365nm) e como agentes cromogênicos a vanilina clorídrica (R1) (aquecimento 110°C, 5-10 minutos), solução de hidróxido de sódio 1N (R4) para revelação das cromatoplasmas eluídas nos sistemas I, III, IV, VIII, IX, X e, para o sistema II, com cloreto de antimônio (R3), solução de ácido sulfúrico 49% (V/V) (R10) (aquecimento 110°C, 5-10 minutos) (BÖLLINGER, 1969; MACEK, 1972).

2.2.4.2 Comparação de *M. ilicifolia* com outras drogas e produtos comercializados sob a sinonímia de espinheira santa, espinheira divina, cancerosa

Foram preparados macerados das drogas rasuradas e da amostra autêntica com 1,0g da droga e 10,0g de etanol 93,8 INPM, ou solução hidroalcoólica a 50% (V/V), em frasco âmbar, com tampa rosqueada, ao abrigo da luz, com agitações diárias, por 14 dias.

Foram cromatografados cerca de 30µl dos extratos hidroalcoólicos 50% (V/V) preparados com 10% das drogas: M1, M2, M3 utilizando os sistemas cromatográficos I e II. As amostras cromatografadas tiveram suas manchas detectadas no visível (sistema II) e sob luz ultravioleta 254 e 365nm (sistemas I e II), tendo como agentes cromogênicos vanilina clorídrica (R1 - sistema I). Para o sistema II, cloreto de antimônio (R3), solução de ácido sulfúrico 49% (R10).

Para avaliar as tinturas adquiridas no mercado foram preparados extratos de *M. ilicifolia* por maceração com 2,0g da droga e 10,0g de etanol 93,8 INPM ou solução hidroalcoólica 50% (V/V), nas mesmas condições que para os extratos anteriores. Após maceração os extratos foram filtrados sobre algodão e cerca de 30µl submetidos a CCD no sistema I. As manchas foram detectadas sob luz ultravioleta (254 e 365nm) e após nebulizadas com vanilina clorídrica (R1) com posterior aquecimento a 110°C por 5-10 minutos.

Como substância marcadora empregou-se catequina em solução etanólica 1,0mg/ml.

2.2.5 Secagem e Moagem do Material Vegetal

A droga após ser lavada, foi pesada e secada a 40°C, em estufa de ar circulante, durante uma semana. A secagem foi acompanhada pela pesagem de todo o material vegetal nos 1º, 4º e 8º dias. Após, foi moída e acondicionada em caixas de papelão, ao abrigo da luz e umidade.

2.2.6 Perda por Dessecação

Em pesa-filtros previamente tarados, pesaram-se exatamente 3,0g de planta moída e colocou-se em estufa a 105°C, por duas horas. Foram resfriados em dessecador durante 20 minutos e pesados. Após repetiu-se o procedimento até que não variasse mais que 0,25% (FARMACOPÉIA, 1977).

2.2.7 Perda por Secagem

Cerca de 5,0g da droga sem rasurar, exatamente pesados, foram colocados em placas de petri (diâmetro 10 cm) em estufa de ar circulante a 40°C por 8 dias, sendo retiradas diariamente para pesagem a partir do 4º dia de secagem. O resultado expressa a média de 3 determinações.

2.2.8 Análise Granulométrica por Tamisação (VOIGT, 1979; OLIVEIRO, 1982)

A técnica consiste em submeter 100,0g da droga à passa-

gem forçada por vibração, através de tamises previamente pesados com abertura de malhas correspondentes a 800; 315; 200; 71; 63µm, utilizando tamisador vibratório a 60 vibrações por minuto durante 15 minutos. Após, as frações retiradas nos tamises, bem como o coletor foram pesadas e calculadas as porcentagens. Os resultados são a média de 6 determinações.

2.2.9 Determinação do Teor Extrativo (BUNDESVEREINIGUNG, 1979)

Foram pesados exatamente 1,0g de planta moída (315-800) e 100g de água e levadas à fervura por 10 minutos. Após resfriar, completou-se o volume e filtrou-se, desprezando-se os primeiros 20 ml do filtrado.

Cerca de 20,0g de extrato, foram exatamente pesados em pesa-filtros previamente tarados, evaporados em banho-maria, sob agitação. Colocou-se em estufa a 105°C por duas horas. Esfriou-se em dessecador durante 20 minutos e pesou-se. O teor extrativo foi calculado segundo a fórmula (1):

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

onde:

g - massa do resíduo seco (g)

p - massa da droga (g).

Os resultados são obtidos pela média de 3-6 determinações.

Para determinação do teor extrativo das folhas verdes, levou-se em consideração, a perda por dessecação (PD), alterando a equação (1) através da multiplicação de "p" por (1-a),

onde $a = \frac{PD}{100}$ Assim: $t = \frac{g \times 500}{p(1-a)}$

Repetiu-se a mesma metodologia sem considerar a granulometria.

2.2.10 Determinação de Taninos (BÖHME & HARTKE, 1976)

Foram aquecidos 0,750g da droga moída (315), exatamente pesados com cerca de 100 ml de água destilada, em banho-maria por 30 minutos. Esfriou-se sob água corrente, transferiu-se para balão volumétrico de 250,0 ml e completou-se o volume com água destilada. Filtrou-se em papel filtro de 12 cm de diâmetro e desprezou-se os primeiros 50 ml do filtrado.

Para determinação de taninos totais, retirou-se alíquota de 5,0 ml do filtrado e completou-se o volume para 25,0 ml com água destilada. Em bequer de 50 ml adicionaram-se 2,0 ml da amostra, 1,0 ml de ácido fosfotúngstico R (reagente de Folin-Denis) e 170 ml de carbonato de sódio R. Determinou-se a extinção à 750nm, exatamente 2 minutos após adição de último reagente, utilizando água como branco (E_1).

Para determinação de taninos não precipitáveis por pó de pele (fração não tanante), adicionou-se 0,1g de pó de pele levemente cromada, para 10,0 ml do filtrado. Agitou-se durante uma hora em agitador mecânico e filtrou-se em papel filtro com diâmetro de 5,0 cm. Retirou-se alíquota de 5,0 ml do filtrado e completou-se o volume com água em balão de 25,0 ml. Repetiu-se o mesmo procedimento utilizado para taninos totais e obtendo-se a extinção E_2 .

Como substância referência pesaram-se 50,0 mg de pirogalol que foram dissolvidos em 100,0 ml de água. Desta solução, retirou-se alíquota de 5,0 ml e diluiu-se para 100,0 ml. Após 30 minutos procedeu-se à leitura como descrito acima, obtendo-se a extinção E_3 .

Utilizou-se como droga referência, raiz de ratânia (*Krameria argentea*) e taninos SETA. Calculou-se a porcentagem dos taninos pelas fórmulas (3), (4) e (5):

$$TT = \frac{13,125 \times E_1}{p \times E_3} \quad (3)$$

$$T = \frac{13,125 \times (E_1 - E_2)}{p \times E_3} \quad (4)$$

$$NT = TT - T \quad (5)$$

onde:

p = massa da droga (g)

E_1, E_2, E_3 = extinção das soluções

TT = taninos totais (%)

T = fração tanante (%)

NT = fração não tanante (%).

Os resultados expressam a média de 5 determinações.

2.2.11 Métodos de Extração

2.2.11.1 Turbolisação

Foram turbolisados 10,0g da droga com 90,0g de solução

hidroalcoólica 50% (V/V) e etanol 93,8 INPM, em turbolizador durante 15 minutos. Objetivando manter a temperatura abaixo de 40°C, colocou-se uma placa de gelo sobre a tampa do turbolizador.

Após extração, completou-se a massa com a referida solução e prensou-se o turbolizado em prensa hidráulica manual. Em seguida o extrato foi filtrado à vácuo, acondicionado ao abrigo da luz.

O extrato contendo solução hidroalcoólica 50% foi utilizado como extrato referência (ER) nas análises preliminares e para todas determinações subsequentes, sendo preparado para cada análise desenvolvida.

2.2.11.2 Maceração

Foram macerados 20,0g da droga moída (315) com 180,0g de etanol 50, 60 e 70% (V/V) e etanol sem diluição (93,8 INPM) em frasco âmbar, com tampa esmerilhada, agitando diariamente durante 5 e 10 dias.

Após o tempo necessário de maceração para cada extrato, procedeu-se a prensagem e filtração como no item 2.2.11.1.

2.2.11.3 Infusão

Foram adicionados 90,0g de água destilada fervente sobre 10,0g da droga rasurada e abafou-se até esfriar, completou-se a massa, filtrou-se em papel filtro e acondicionou-se em frasco escuro.

2.2.12 Caracterização dos Extratos

2.2.12.1 Determinação do resíduo seco (RS) (BÖHME & HARTKE, 1981)

Em pesa-filtros previamente tarados, pesaram-se exatamente cerca de 20,0g dos extratos turbolizados e macerados a 10% (m/m) com soluções hidroalcoólicas 50, 60, 70% (V/V) e etanol sem diluição (93,8 INPM). Foram levados a secura em banho-maria sob agitação constante e colocados em estufa a 105°C, por duas horas. Foram esfriados em dessecador por 20 minutos e pesados. O resultado foi calculado e expresso em porcentagem simples. Foram realizadas de 3-6 determinações.

2.2.12.2 Determinação da densidade

Foi determinada a densidade através de areômetro a 25°C em proveta contendo 100,0 ml de extrato e por picnômetro de 25,0 ml à 25°C com aferição do mesmo (FARMACOPEIA, 1977).

2.2.12.3 Determinação do teor alcoólico (FARMACOPEIA, 1977)

O teor alcoólico foi calculado pela densidade, auxiliado pela tabela alcoométrica. O resultado é fornecido em percentual volumétrico a 15,56°C.

2.2.12.4 Determinação do pH

Foi determinado em pHmetro calibrado com soluções tampão de borato e acetato, com pH 7,0 e 4,0 respectivamente. As

determinações foram realizadas para os extratos macerados e extratos referência.

2.2.13 Quantificação dos Macerados

2.2.13.1 Doseamento químico de taninos (BÖHME & HARTKE, 1976)

Em um balão volumétrico de 250,0ml adicionaram-se 7,5 ml de extrato e completou-se o volume com água. Procedeu-se como no item 2.1.10, para obtenção das extinções E_1 , E_2 , E_3 . Utilizou-se pó de pele e caseína como agentes precipitantes dos taninos. Foram realizadas 3 determinações para cada macerado e para os extrato referência.

2.2.13.2 Doseamento para cafeína (STAHL, 1975)

Em bequer colocou-se alíquota de 20,0 ml do extrato, levou-se à secura em banho-maria e retomou-se com 50,0 ml de solução de ácido sulfúrico 2N, aqueceu-se até a fervura (3-5 minutos) e filtrou-se quente. O filtro foi lavado com cerca de 10 ml de água fervente, e após esfriar, adicionaram-se cerca de 50 ml de hidróxido de amônio 6N até pH 10. Extraíu-se rapidamente com clorofórmio (4x50,0 ml), levou-se à resíduo seco e retomou-se em etanol absoluto. A absorvância foi lida a 272,8nm.

Concomitantemente repetiu-se a técnica para o extrato referência e para uma concentração determinada do padrão. Todas extrações foram feitas em triplicata e os resultados expressos em $\mu\text{g/ml}$ de extrato.

Foi preparada uma solução-mãe de cafeína 1,0 mg/ml em

etanol absoluto e diluída para obter-se as concentrações de 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 10,0; 11,0; 12,0 µg/ml em etanol absoluto. A linearidade da curva foi comprovada pelo método de RINGBOM (AYRES, 1970). Cada ponto da curva corresponde à média de 5 determinações.

2.2.13.3 Quantificação para cafeína após cromatografia em coluna Extrelut

Foram colocados em bēquer 20,0 ml do extrato, levados à resíduo seco e retomado com 20,0 ml de água sendo após, aquecido em banho-maria e resfriado. Adicionaram-se 2,0 ml de suspensão de hidróxido de cálcio e sulfato de cobre a 20%. Agitou-se em agitador mecânico durante uma hora (170 minutos⁻¹) e centrifugou-se a 2500 rotações por minuto. Retirou-se alíquota de 10,0 ml do sobrenadante e aplicou-se na coluna EXTRELUT, contendo 4,0g do material de enchimento.

Após absorção completa da solução na coluna, procedeu-se à extração com diclorometano, adicionando inicialmente alíquota de 40,0 ml seguido de 3 outras de 20,0 ml. Completou-se o volume a 100,0 ml. As absorvâncias foram determinadas a 272 nm. Os resultados foram obtidos pela média de 3 determinações. Do mesmo modo prepararam-se soluções de cafeína padrão com diluições adequadas para obter-se as concentrações de 2,5; 5,0; 7,5 µg/ml. Determinou-se as absorvâncias a 272nm.

Para acompanhamento do método foram determinadas as absorvâncias de cafeína padrão nas mesmas concentrações. Foram realizadas 3 determinações para cada concentração.

2.2.14. Avaliação da Presença de Cafeína

2.2.14.1 Extração com solventes (STAHL, 1975)

A 1,0g da droga exatamente pesado adicionaram-se 50,0 ml de solução de ácido sulfúrico 1N, aqueceu-se à fervura por 5 minutos, resfriou-se e em funil de separação adicionaram-se 50,0 ml de hidróxido de amônia 6N. Extraíu-se rapidamente com clorofórmio, levou-se a resíduo seco e retomou-se em 1,0 ml clorofórmio: metanol (6:4). A solução foi cromatografada no sistema V, em câmara saturada de hidróxido de amônia. Após eluição e secagem, nebulizou-se com agente cromogênico R7.

2.2.14.2 CCD - Bidimensional

A solução obtida no item 2.2.14.1 foi submetida a cromatografia bidimensional, eluindo no sistema I (1ª direção) e sistema V (2ª direção). Após eluição foram detectadas as substâncias no ultravioleta 365nm, foram calculados os valores de R_f e a placa foi nebulizada com agente cromogênico R7.

Após doseamento da cafeína pelos métodos extração com solventes e através de coluna Extrelut, as soluções foram levadas a resíduo; retomadas em clorofórmio e cromatografadas utilizando o sistema VI método ascendente. Após eluição foram detectadas as substâncias no ultravioleta e utilizou-se como agente cromogênico o reagente Dragendorff (R5), em 5 minutos, nebulizou-se com sulfato cérico (R6). Foram cromatografadas também no sistema V, detectando sob luz ultravioleta (254 e 365nm), tendo como agente cromogênico, solução de iodo com ácido clorídrico:

etanol (R7), utilizando padrões de cafeína, teofilina, teobromina (STAHL, 1975).

Durante o processo extrativo do padrão (cafeína) em coluna Extrelut (validação do método) tomaram-se alíquotas do sobrenadante da suspensão de sulfato de cobre e hidróxido de cálcio e extraíram-se com clorofórmio, reduziu-se o volume a xarope e cromatografaram-se, comparando-se com cafeína padrão após passagem por colunas Extrelut, e cafeína padrão dissolvida em clorofórmio. As amostras foram detectadas sob luz ultravioleta e nebulizadas com agentes cromogênicos e em seguida expostas a vapores de iodo, Dragendorff (R5) e sulfato cérico (R6).

2.2.15 Espectroscopia no Ultravioleta e Visível de Substâncias isoladas de *M. ilicifolia*

2.2.15.1 Substância M1

Foi cromatografado extrato alcoólico turbolizado no sistema II. Após eluição, foi retirada a mancha número 4 (Figura 8), que apresenta coloração amarelo forte no visível e sombreado no ultravioleta 365nm. Extraiu-se a substância da sílica com clorofórmio e obteve-se o espectro no visível (380-750nm).

2.2.15.2 Substância M2

O extrato hidroalcoólico turbolizado foi submetido à CCD no sistema IX (Figura 10a). Após eluição (15-16 cm), secou-se a cromatoplaça e foi detectada sob luz ultravioleta 365nm. Foi isolada a mancha nº 6, com Rf próximo 0,8 de colora-

ção amarelo escuro no ultravioleta e quando exposto aos vapores de amônia adquiriu cor amarelo fluorescente. Foi feita a extração da celulose com n-butanol durante 2 horas com agitações ocasionais. A solução filtrada em filtro milipore FALP de porosidade 0,22 μm e foi levada a resíduo seco em banho-maria. O resíduo foi retomado em metanol e traçado o espectro no ultravioleta. À solução foram adicionadas 8 gotas de cloreto de alumínio e obtido o espectro após 1 minuto. À mesma solução foram adicionadas 3 gotas de ácido clorídrico e traçado o espectro.

2.2.16 Avaliação Tecnológica do Extrato de *M. ilicifolia*

Foi realizada análise estatística dos resultados obtidos, objetivando a avaliação dos fatores que influem na obtenção dos extratos.

No experimento as variáveis independentes são concentrações etanólica (A) e tempo de maceração (B), as variáveis dependentes são resíduo seco e teor de taninos.

Para análise do resíduo seco adotou-se um fatorial 4 x 2 (YATES, 1937; BROWNLEE, 1965), constituído por 4 concentrações de etanol (50, 60, 70 e 96) e dois tempos de maceração (5 e 10 dias). Para a determinação de taninos utilizou-se fatorial 3 x 2, constituído de três concentrações etanólicas do líquido extrator (50, 70 e 96) e por dois tempos de maceração (5 e 10 dias). Foram realizadas análises de variâncias segundo delineamento de blocos casualizados. Cada unidade experimental foi designada como Y_{ijk} , onde i refere-se ao iésimo nível de combinação do fator A, j refere-se ao jtaésimo nível do fator B e k designa a kaésima repetição (BROWNLEE, 1965; COCHRAN & BOX,

1950; OSLE, 1977). A Tabela 3 ilustra as análises de variância realizadas segundo o delineamento de blocos casualizados.

TABELA 3 - Análise de variância dos fatoriais 4x2 e 3x2 tendo como variáveis dependentes resíduo seco (RS), taninos totais (TT) e tanantes (T).

ORIGEM DA VARIÇÃO	SOMA DOS QUÁDRADOS	GL	QUADRADO MÉDIO	F
Etanol (A)	SQ_A	(r-1)	s_A^2	s_A^2/s_e^2
Tempo de Maceração (B)	SQ_B	(a-1)	s_B^2	s_B^2/s_e^2
Interação entre AxB	SQ_I	(a-1)(b-1)	s_I^2	s_I^2/s_e^2
Erro	SQ_e	ab(c-1)	s_e^2	
TOTAL	ST	abc-1		

As observações são usualmente apresentadas na forma tabelar (Tabela 4).

Para análise entre os níveis, utilizou-se o teste multiseriado de Newman-Keuls, onde se objetiva detectar diferenças significativas entre as médias. Os cálculos foram realizados utilizando testes do programa STATITCF.

TABELA 4 - Representação das observações do fatorial 4x2 (4 concentrações etanólicas - A e 2 tempos de maceração -B), A1 - 50%; A2 - 60%; A3 - 70%; A4 - 96% e B1 - 5 dias e B2 - 10 dias, sendo que Y corresponde ao valor obtido no experimento (GUPTA e MATTAI, 1980).

FATOR B FATOR A	B1	B2
A1	Y111	Y121
	Y112	Y122
	Y113	Y123
A2	Y211	Y221
	Y212	Y222
	Y213	Y223
A3	Y311	Y321
	Y312	Y322
	Y313	Y323
A4	Y411	Y421
	Y412	Y422
	Y413	Y423

2.2.17 Estudos Preliminares da Estabilidade

Após obtenção do extrato padronizado, contendo 50% de etanol e com 5 dias de maceração (item 2.6) colocaram-se em frascos escuros, com tampa rosqueada, 7,5 ml do referido extrato, submeteram-se às temperaturas de 30, 40 e 60°C 2, sendo retiradas amostras para doseamento de taninos totais, tanantes e

não-tanantes, pelo método descrito no item 2.2.10, nos dias 0, 7, 14, 24, 30 e 44 para as temperaturas de 30 e 40°C e nos dias 0, 7, 10, 14, 17, 24, 30, 37 e 44 para as temperaturas de 60°C.

Para acompanhamento das reações, retiram-se amostras a cada 7 dias e cromatografaram-se os extratos utilizando o sistema IV, nebulizando com agente cromogênico R1.

3. RESULTADOS

3.1 CARACTERIZAÇÃO DA DROGA

3.1.1 Caracterização Botânica

3.1.1.1 Anatômica

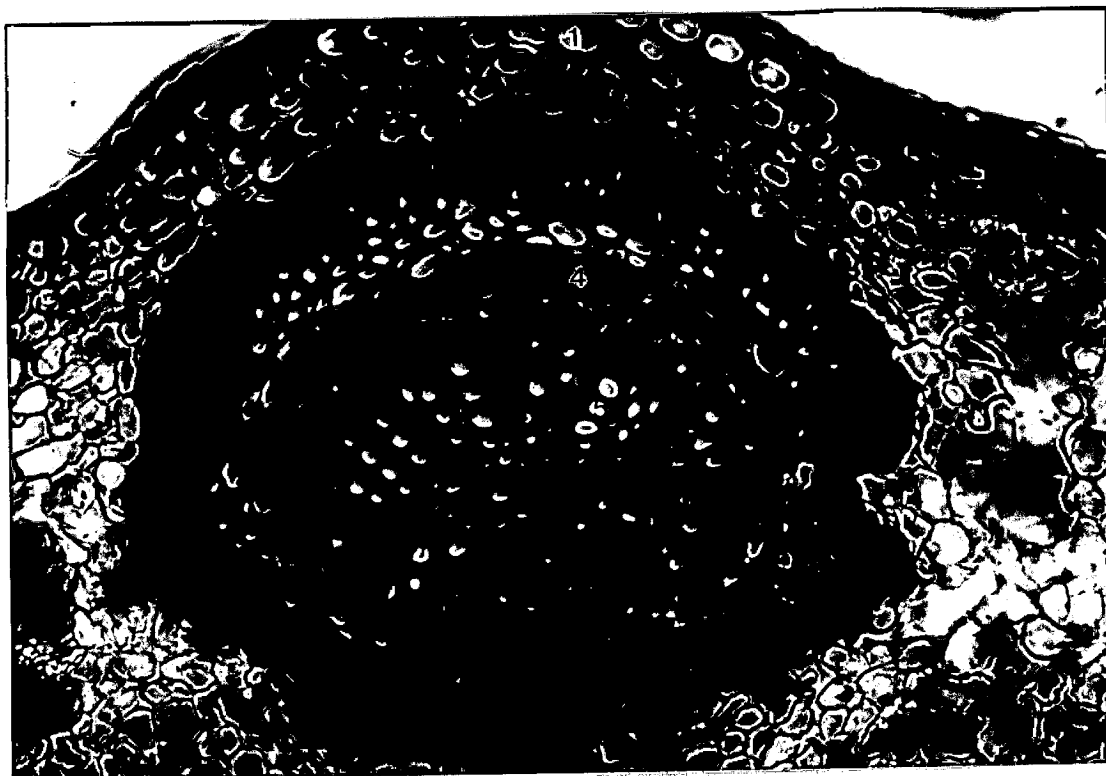


FIGURA 1 - Corte transversal da nervura central de *Maytenus ilicifolia*. 1. Colênquima; 2. Parênquima fundamental; 3. Fibras esclerenquimáticas; 4. Floema; 5. Xilema (X 160).

Na Figura 1, observa-se colênquima anelar em dois pontos (nº 1), parênquima fundamental (nº 2) seguido de feixe contínuo de fibras esclerenquimáticas (nº 3) e feixe vascular semicircular fechado com floema disposto lateral, inferiormente com relação ao xilema.

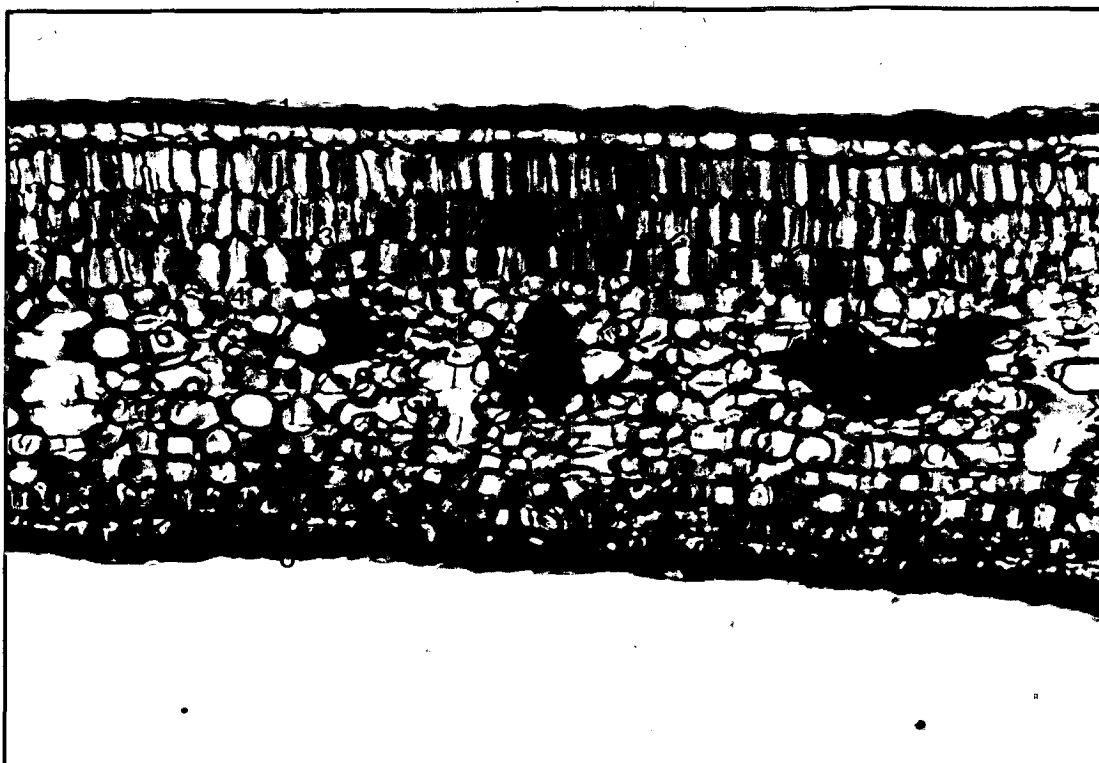


FIGURA 2 - Corte transversal do limbo de *Maytenus ilicifolia*. 1. Cutícula; 2. Epiderme superior; 3. Parênquima paliçádico; 4.a e 4.b Parênquima esponjoso; 5. Epiderme inferior; 6. Cutícula (X 160).

O corte transversal do limbo (Figura 2), apresenta sistema dérmico constituído por epidermes superior (nº 2) e inferior (nº 5) com cutícula espessa (1 e 6), sendo que a epiderme inferior apresenta estômatos. O mesófilo é constituído por parênquima paliçádico em três camadas e parênquima esponjoso constituído de 4 a 5 camadas de células mais frouxas (4.a)

e 3 a 4 camadas de células mais compactadas e superpostas (4.b). Estas estruturas podem ser melhor visualizadas na Figura 3.



FIGURA 3 - Corte transversal do limbo de *Maytenus ilicifolia*. Mesófilo em detalhe. 1. Cutícula; 2. Epiderme superior; 3. Parênquima paliçádico; 4a e 4b. Parênquima esponjoso; 5. Epiderme inferior; 6. Cutícula (X 320).

3.1.1.2 Morfológica

TABELA 5 - Caracterização morfológica de *Maytenus ilicifolia*, *Sorocea bonplandii*, *Iodina rhombifolia*, *Citronella gongonha* e amostras M1, M2 e M3.

VEGETAL	CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA	COMPRIMENTO DA FOLHA (cm)	TIPO DE BORDO	Nº PARES DE ESPINHOS	TEXTURA (folhas secas)	NERVURAS
	<i>M. ilicifolia</i> (LOURTEIG, 1955)	4 - 12	Marginado, notadamente sinuodentado com espinhos agudos regularmente distribuídos	4 - 7 12 - 17	Coriácea	Proeminentes nas duas faces, reticuladas.
	<i>M. ilicifolia</i> (AMOSTRA)	3 - 8	Confere com descrição	4 - 10	Confere com descrição	Confere com descrição
	<i>C. gongonha</i> (MATTOS, 1965)	2,5-12,5	Marginoso, espinhoso, dentados	-	Coriácea	Impressa ou subplana na face superior e saliente na face inferior
	<i>C. gongonha</i> (AMOSTRA)	5 - 9	Confere com descrição	-	Confere	Confere com descrição
	<i>I. rhombifolia</i> (CABRERA, 1965)	3 - 5	-	1 espinho agudo- <u>ner</u> vura central e outros 2-3 laterais	Coriácea	-
	<i>I. rhombifolia</i> (AMOSTRA)	3	Marginoso, espinhoso dentado	Confere	Confere	-
	<i>S. bonplandii</i> (MIQUEL, 1965-7)	6 - 9	Serrado e com espinhos curtos	-	-	-
	<i>S. bonplandii</i> (AMOSTRA)	6 - 12	Confere com descrição	12 - 14	Quebradiça	Proeminentes na face inferior, soldados próximo ao bordo.
M1		10 - 12	Confere com descrição de <u>M. ilicifolia</u>	13 - 15	Confere <u>M. ilicifolia</u>	Confere com <u>M. ilicifolia</u>
M2		16 - 17	Confere <u>Maytenus ilicifolia</u> , apenas com espinhos menores	18 - 24	Quebradiça	Nervuras pouco proeminentes, reticuladas
M3		12 - 14	Semelhante a M2	16-18	Quebradiça	Nervuras pouco proeminentes, reticuladas

3.1.2 Caracterização Química

3.1.2.1 Testes químicos preliminares (MARINI-BÉTTOLO, 1971)

3.1.2.1.1 Alcalóides

Após a adição do reagente de Dragendorff ao filtrado A, houve aparecimento de cor amarelo-laranja com posterior precipitação e turvação. O padrão adquiriu cor laranja ficando o sobrenadante incolor com maior intensidade.

O filtrado B - fase superior adquiriu cor castanho avermelhado com turvação forte. A fase inferior adquiriu cor amarela, com turvação, indicativo de alcalóides terciários.

3.1.2.1.2 Antranóides

Ao adicionar hidróxido de potássio na fase toluênica, não ocorreu aparecimento de cor, não detectando antranóides.

A fase toluênica do padrão (emodina) ao adicionar hidróxido de potássio adquiriu coloração vermelha.

3.1.2.1.3 Substâncias fenólicas

Ocorreu aparecimento de cor azul esverdeada indicando presença de polifenóis.

3.1.2.1.4 Taninos

Após adição da solução de gelatina 1%, houve precipitação intensa.

O ácido tânico apresentou turvação média.

3.1.2.1.5 Flavonóides

Aparecimento de cor vermelha azulada média, indicativo da presença de flavonóides.

3.1.2.1.6 Cardenolídeos

Ocorreu aparecimento de cor laranja, tendendo ao vermelho. Negativo para cardenolídeos.

A solução contendo digitoxina passou de incolor a azul.

3.1.2.1.7 Saponinas

Formação de espuma após agitação, com anel de 2 cm.

Quebra da espuma com adição de ácido clorídrico, indicativo da ausência de saponinas.

3.1.2.2 "Screening" - Cromatografia em camada delgada

3.1.2.2.1 Taninos

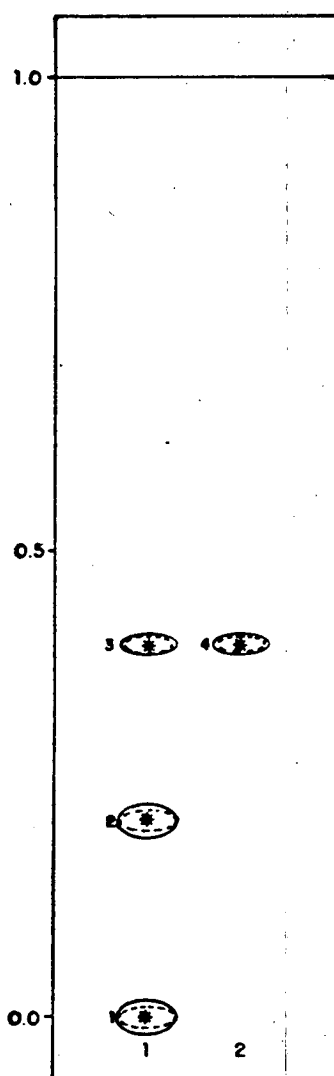


FIGURA 4 - Análise cromatográfica preliminar para taninos de *M. ilicifolia*. Sistema XI. 1. Solução B; 2. Catequina padrão. Detecção: (---) UV254nm; (—) UV365nm. Agente cromogênico R1 (*Tabela 6).

TABELA 6 - Análise cromatográfica para taninos em *M. ilicifolia*.

MANCHA Nº	Rf	UV ₃₆₅	R1
1	0,00	mar.claro	rosa forte
2	0,21	mar.claro	rosa forte
3	0,40	mar.claro	rosa forte
4	0,40	mar.claro	rosa forte

3.1.2.2.2 Saponinas

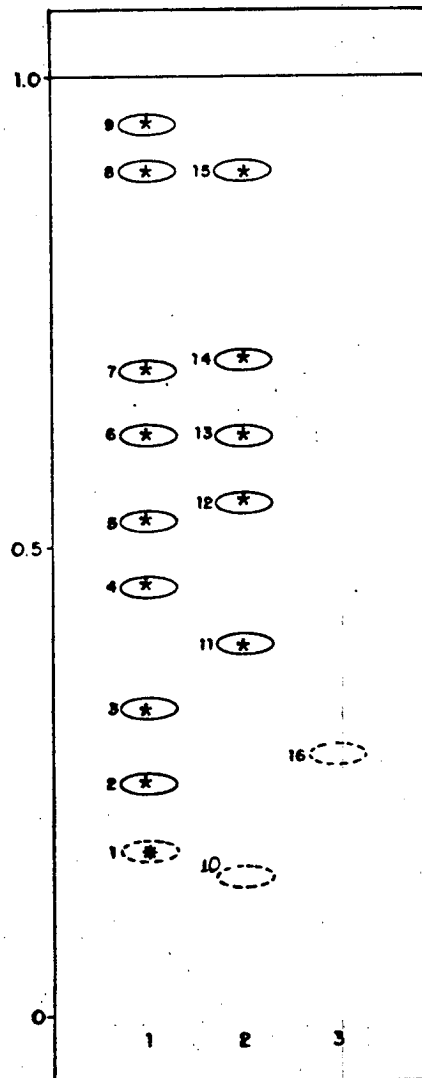


FIGURA 5 - Análise cromatográfica preliminar para saponinas em *M. ilicifolia*. Sistema XII. 1. Solução B; 2. Saponinas extraídas de *Thinouia coriaceae*; 3. Saponina Merck. Detecção: UV₂₅₄ (---); UV₃₆₅ (—), Agente cromogênico R2 (*Tabela 7).

TABELA 7 - Comportamento frente ao agente cromogênico R2 de substâncias detectadas em *M. ilicifolia*.

MANCHA Nº	Rf	R2
1	0,12	azul
2	0,25	amarelo
3	0,33	amarelo
4	0,46	amarelo
5	0,53	amarelo
6	0,62	rosa forte
7	0,69	rosa forte
8	0,90	rosa forte
9	0,95	roxo
10	0,15	-
11	0,40	cinza escuro
12	0,55	cinza escuro
13	0,62	roxo
14	0,70	roxo
15	0,90	roxo
16	0,28	azul/amarelo

3.1.2.2.3 Saponinas, cumarinas e flavonóides

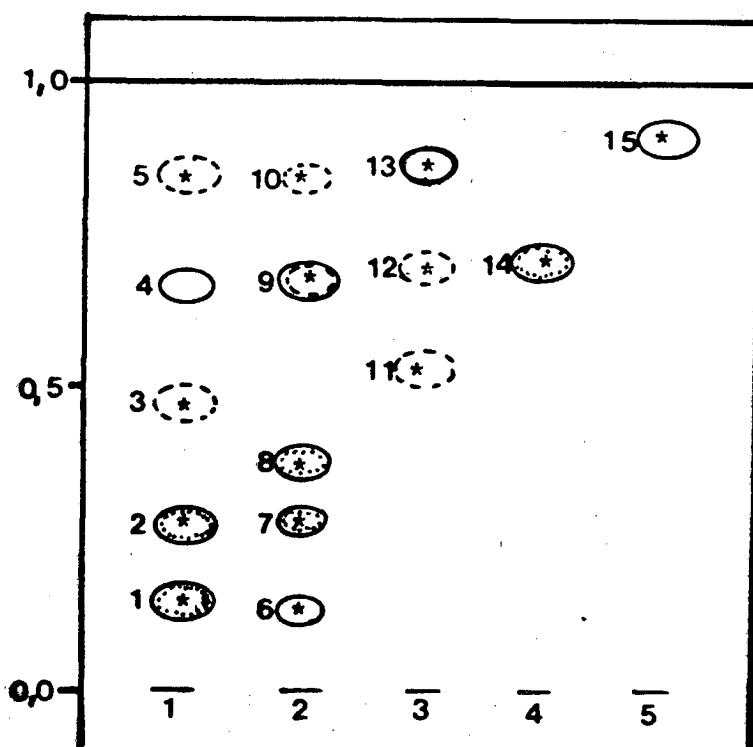


FIGURA 6 - Análise cromatográfica de saponinas, cumarinas e flavonóides em *M. ilicifolia*. Sistema VII. 1. Solução B; 2. Solução C. 3. Saponinas extraídas de *Thinouia conaceae*; 4. Rutina; 5. Cumarina. Detecção: (---) UV254nm; (—) UV365nm. Agente cromogênico R2 (* Tabela 8).

TABELA 8 - Comportamento cromatográfico das substâncias detectadas em *M. ilicifolia* (+) Sombra no UV365nm.

MANCHA Nº	Rf	UV365	R2
1	0,15	+	amarelo
2	0,27	+	amarelo
3	0,48	+	amarelo
4	0,66	azul	-
5	0,85	+	roxo
6	0,13	amarelo	marron
7	0,27	amarelo	amarelo
8	0,38	marron claro	amarelo
9	0,68	amarelo	amarelo
10	0,85	+	roxo
11	0,53	+	roxo
12	0,70	+	roxo
13	0,86	+	roxo
14	0,71	+	amarelo
15	0,90	+	roxo

3.1.2.2.4 Quinonas

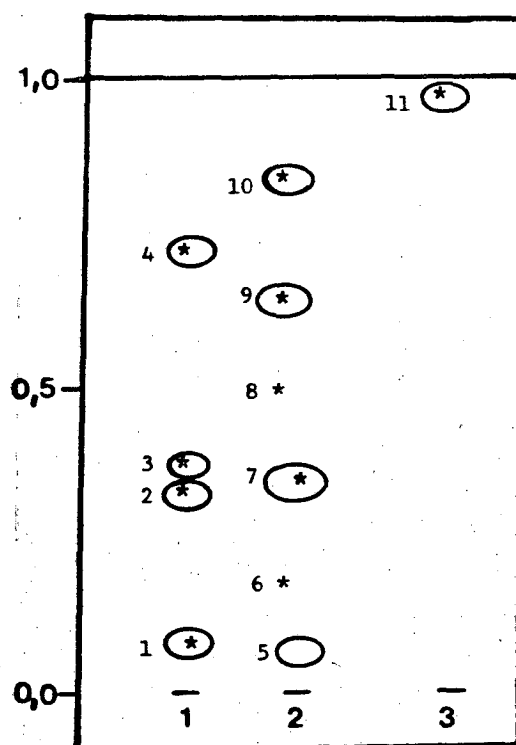


FIGURA 7 - Análise cromatográfica para quinonas em *M. ilicifolia*. Sistema XIII. 1. Solução A; 2. Solução B; 3. Crisofanol. Detecção: (—) UV365nm e nebulização com agente comogênico R8, com aquecimento 10 minutos à 100°C e após R9 (* Tabela 9).

TABELA 9 - Comportamento cromatográfico das substâncias detectadas em *M. ilicifolia* após nebulização com R8 e R9.

MANCHA Nº	Rf	R8 e R9
1	0,08	amarelo marron
2	0,32	amarelo marron
3	0,37	amarelo marron
4	0,81	marron claro
5	0,07	—
6	cauda	amarela
7	0,35	amarelo
8	cauda	amarela
9	0,65	amarelo
10	0,83	marrom claro
11	0,99	amarelo forte

3.1.3 Perfis Cromatográficos de *Maytenus ilicifolia*

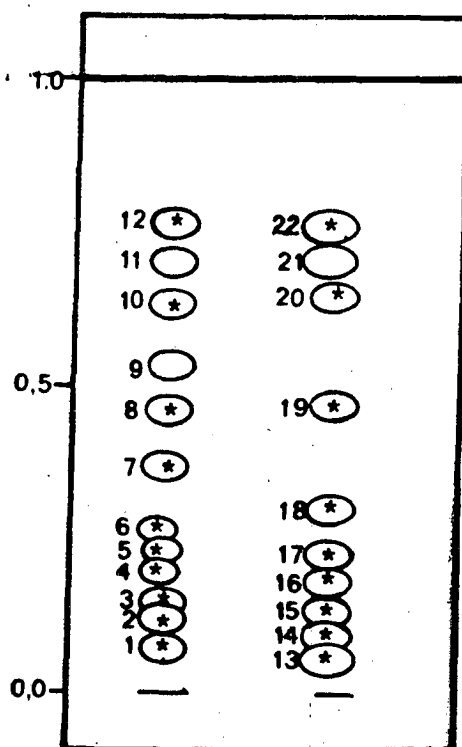


FIGURA 8 - Comportamento das manchas na análise cromatográfica de *M. ilicifolia*. Sistema II. 1. Extrato alcoólico de folhas frescas; 2. Extrato alcoólico de folhas secas; Detecção: visível UV365nm e agente cromogênico R3 (*Tabela 10). Os extratos foram preparados com 10% (m/m) da droga.

TABELA 10- Comportamento cromatográfico de *Maytenus ilicifolia*
no sistema II.

MANCHA Nº	Rf	VISÍVEL	UV	R3
1	0,09	verde	vermelho	verde
2	0,12	amarelo	sombra	azul
3	0,14	verde	vermelho	verde
4	0,17	verde	vermelho	verde
5	0,23	amarelo	sombra	azul
6	0,24	verde cinza	vermelho	verde
7	0,38	amarelo	sombra	rosa/violeta
8	0,46	verde	vermelha	verde
9	0,52	-	Azul fluoresc.	-
10	0,63	-	Azul fluoresc.	rosa/violeta
11	0,70	-	Azul fluoresc.	-
12	0,76	amarelo	sombra	azul-superior rosa-inferior
13	0,05	verde	vermelho	verde
14	0,09	verde	vermelho	verde
15	0,13	verde	vermelho	verde
16	0,18	verde	vermelho	verde
17	0,23	-	Azul fluoresc.	rosa/violeta
18	0,30	verde	vermelho	verde
19	0,47	verde	vermelho	verde
20	0,64	-	Azul fluoresc.	rosa/violeta
21	0,70	-	Azul fluoresc.	-
22	0,75	amarelo	sombra	rosa/violeta
23	0,0	marron	escuro	cinza
24	0,0	marron claro	escuro	vermelho

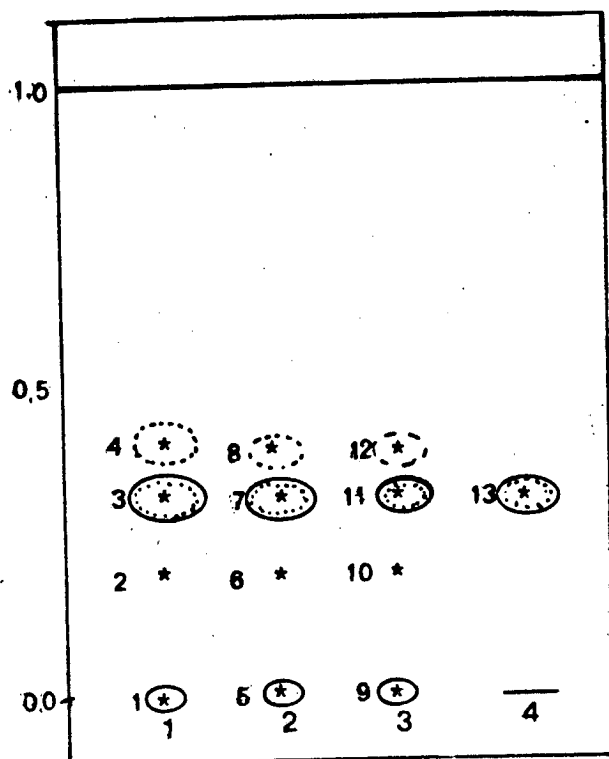


FIGURA 9 - Cromatografia de *M. ilicifolia*. Sistema VIII. 1. Extrato alcoólico; 2. Extrato hidroalcoólico; 3. Extrato aquoso; 4. Catequina. Detecção: (---) UV254; (—) UV365. Revelação R1 (*Tabela 11). Todos extratos contêm 10% da droga vegetal.

TABELA 11 - Comportamento cromatográfico de *M. ilicifolia*, no sistema VIII, (+) Sombra no UV365nm.

MANCHAS Nº	Rf	UV365nm	R1
1	0,00	+	rosa forte
2	0,20	-	amarelo
3	0,32	marron	rosa forte
4	0,41	+	amarelo
5	0,00	+	rosa forte
6	0,20	+	amarelo
7	0,32	marron	rosa forte
8	0,40	+	amarelo
9	0,00	+	rosa forte
10	0,20	+	amarelo
11	0,32	marron	rosa forte
12	0,41	+	amarelo
13	0,31	marron	rosa forte

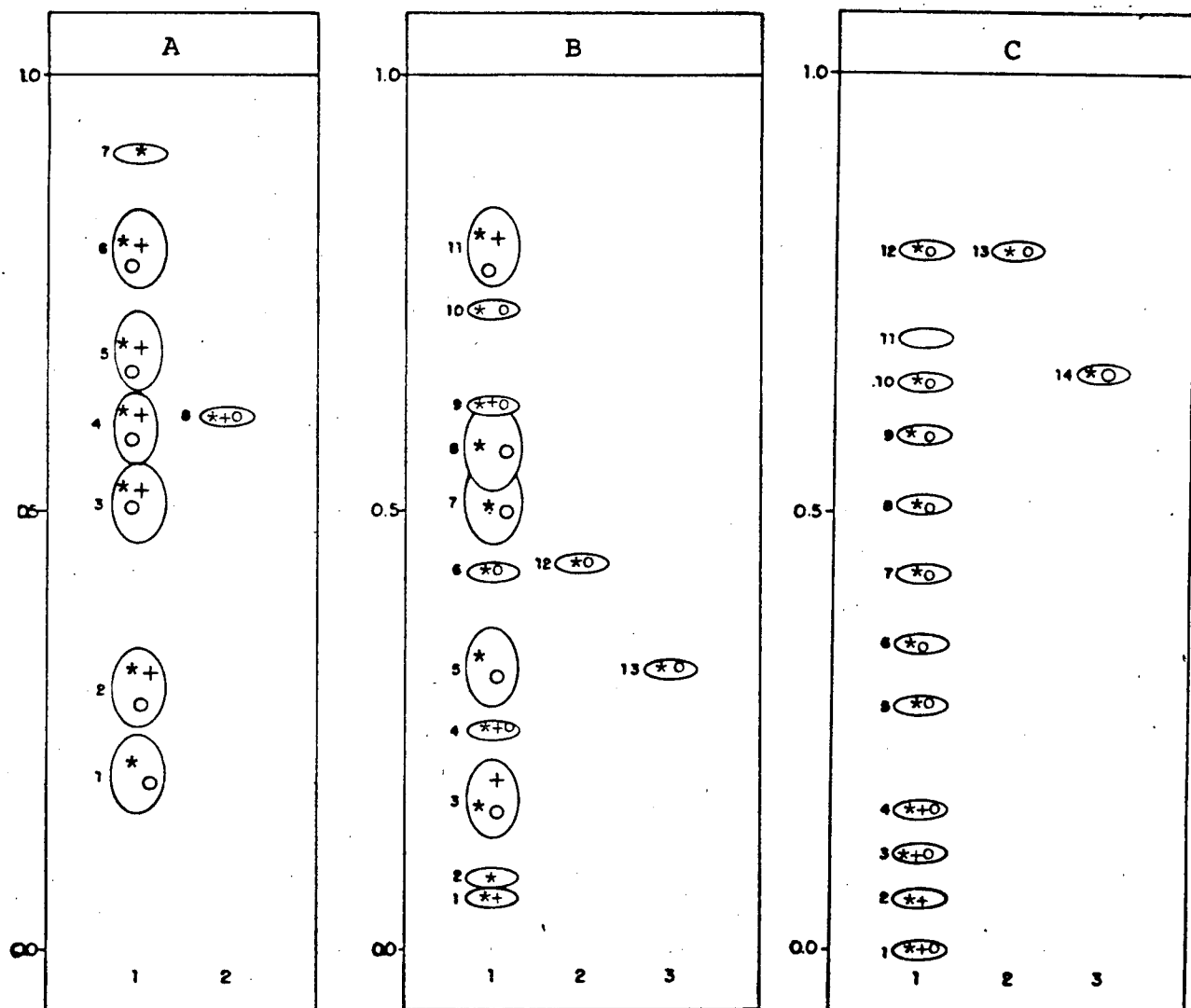


FIGURA 10 - Análise cromatográfica de *M. ilicifolia*, nos sistemas A = IX; B = V; C = IV. 1. Extrato hidroalcoólico 50%, com 10% da droga; 2. Catequina; 3. Epicatequina. Detecção UV365nm (—); UV365/NH₃ (+) e agentes cromogênicos R1 (*) e R4 (o, Tabela 12).

TABELA 12 - Comportamento cromatográfico dos extratos de *M. ilicifolia* nos sistemas IX, X e IV, utilizando como agentes cromogênicos R1 e R4 (+) Sombra no UV₃₆₅nm.

SISTEMAS CROMA-TOGRÁFICOS	MANCHAS Nº	Rf	UV ₃₆₅	UV ₃₆₅ /NH ₃	R1	R4
A	1	0,20	+	-	Rosa forte	Laranja
	2	0,30	+	-	Rosa forte	Laranja
	3	0,51	+	-	Rosa forte	Laranja
	4	0,60	marron	Azul fluoresc.	Rosa forte	Laranja
	5	0,68	marron	Azul Fluoresc.	Rosa forte	Laranja
	6	0,80	marron	Azul fluoresc.	Marron	Amarelo
	7	0,91	Amarelo	Amarelo fluoresc.	Amarelo	Amarelo
	8	0,61	Marron	Azul fluoresc.	Rosa forte	Laranja
B	1	0,06	Azul fluoresc.	Intensifica	Rosa forte	-
	2	0,08	+	-	Amarelo sujo	-
	3	0,17	Azul fluoresc.	Intensifica a cor	Amarelo sujo	Amarelo
	4	0,25	Azul fluoresc.	Intensifica a cor	Rosa forte	Laranja
	5	0,32	Marron	+	Rosa forte	Laranja
	6	0,43	Marron	-	Rosa forte	Laranja
	7	0,51	+	-	Rosa forte	Amarelo sujo
	8	0,57	+	-	Rosa forte	Amarelo sujo
	9	0,62	Azul fluoresc.	Intensifica a cor	Rosa forte	Amarelo sujo
	10	0,73	Marron	-	Amarelo sujo	Amarelo
	11	0,80	Amarelo fosco	Amarelo fluoresc.	Amarelo	Amarelo
	12	0,44	Marron	-	Rosa forte	Laranja
	13	0,32	Marron	-	Rosa forte	Laranja
C	1	0,00	Amarelo fluor	Intensifica a cor	Rosa forte	Amarelo sujo
	2	0,06	Azul fluor	Intensifica a cor	Amarelo sujo	-
	3	0,11	Marron	-	Amarelo sujo	Amarelo sujo
	4	0,16	Marron	-	Amarelo sujo	Amarelo sujo
	5	0,28	+	-	Rosa forte	Amarelo sujo
	6	0,35	+	-	Rosa forte	Amarelo sujo
	7	0,43	+	-	Rosa forte	Amarelo sujo
	8	0,51	+	-	Rosa forte	Amarelo sujo
	9	0,59	+	-	Rosa forte	Amarelo sujo
	10	0,65	+	+	Rosa forte	Laranja
	11	0,70	Amarelo	-	-	-
	12	0,80	+	+	Rosa forte	Laranja
	13	0,80	+	+	Rosa forte	Laranja
	14	0,66	+	+	Rosa forte	Laranja

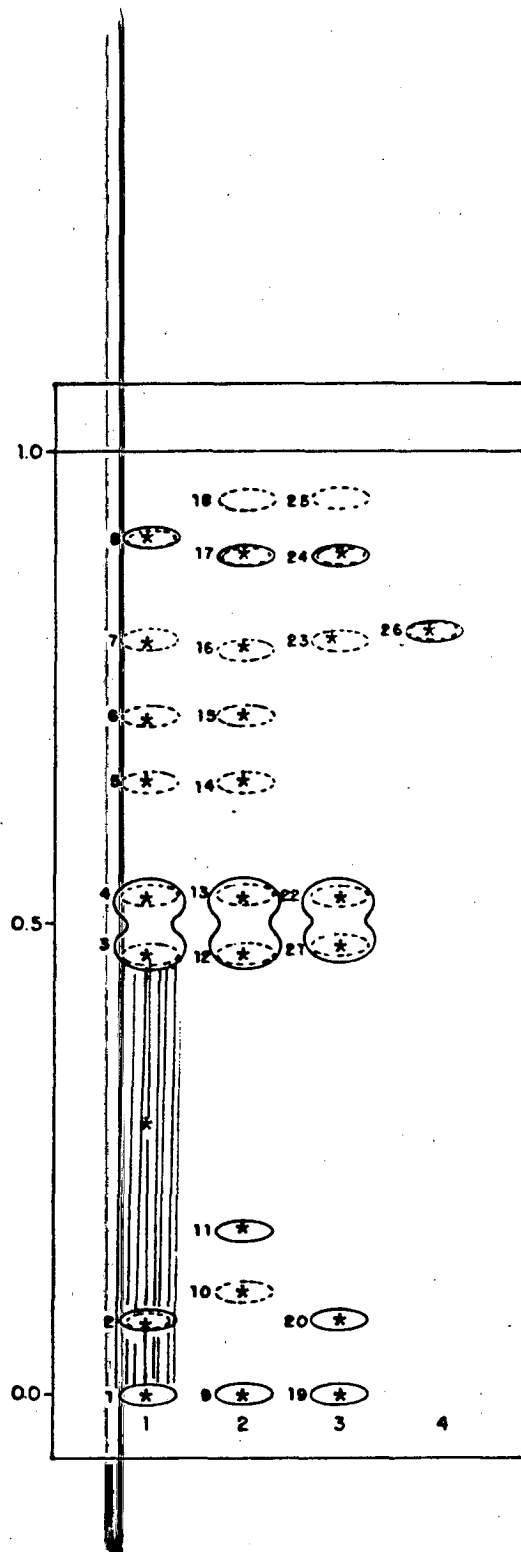


FIGURA 11 - Análise cromatográfica de *M. ilicifolia* em função do líquido extrator. Sistema I. 1. Extrato Alcoólico; 2. Extrato hidroalcoólico 50% (V/V); 3. Extrato aquoso; 4. Catequina. Detecção: (---) UV_{254nm} (—) UV_{365nm}. Revelação R1 (* Tabela 13). Todos extratos contêm 10% de droga vegetal.

TABELA 13 - Comportamento cromatográfico dos extratos alcoólico, hidroalcoólico e aguoso de *M. ilicifolia*. Detecção: UV365nm e após nebulização com R1, no sistema I (+) Sombra no UV365nm.

MANCHA Nº	Rf	UV365	R1
1	0,00	Marron	Rosa forte
2	0,08	Marron escuro	Amarelo
3	0,47	+	Amarelo sujo
4	0,53	+	Amarelo sujo
5	0,65	Marron escuro	Rosa forte
6	0,72	Marron escuro	Rosa forte
7	0,80	Marron	Rosa forte
8	0,91	Marron	Rosa forte
9	0,00	+	Rosa forte
10	0,11	Marron	Amarelo
11	0,17	Marron	Rosa forte
12	0,47	+	Amarelo sujo
13	0,53	+	Amarelo sujo
14	0,65	+	Rosa forte
15	0,72	+	Rosa forte
16	0,79	+	Rosa forte
17	0,89	Marron	Rosa forte
18	0,95	+	-
19	0,00	+	Rosa forte
20	0,08	Marron	Amarelo
21	0,48	+	Amarelo sujo
22	0,53	+	Amarelo sujo
23	0,80	+	Rosa forte
24	0,89	+	Rosa forte
25	0,95	+	-
26	0,81	Marron	Rosa forte

3.1.3.1 Comparação cromatográfica de *Maytenus ilicifolia* com outras espécies

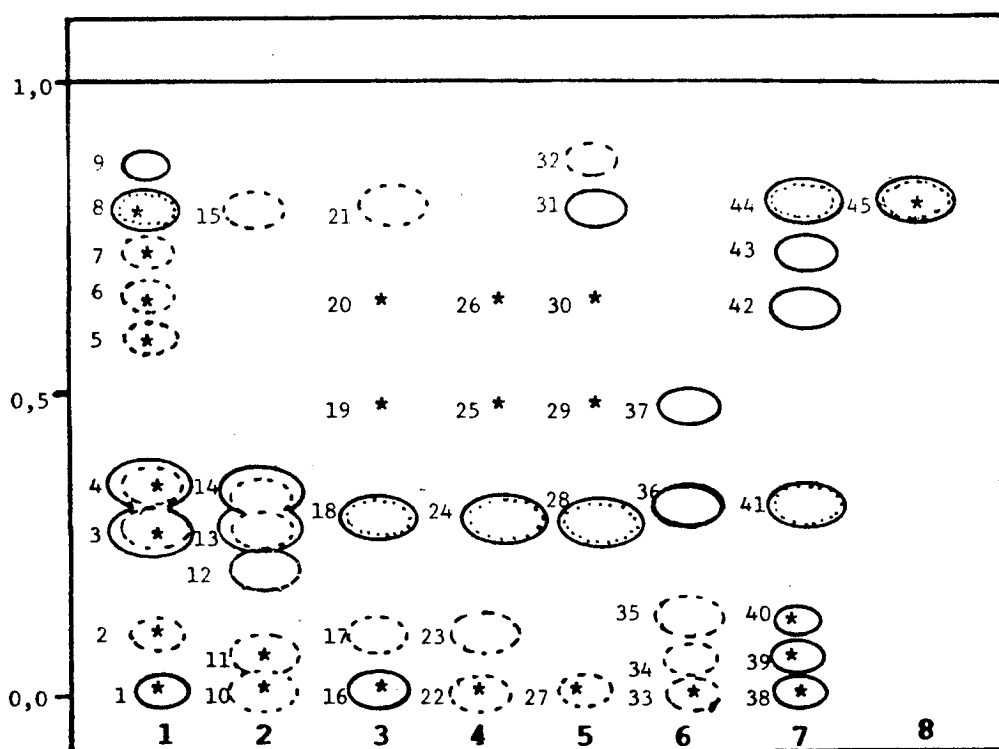


FIGURA 12 - Cromatografia comparativa. Sistema I. 1. Extrato de *Maytenus ilicifolia*; 2. Extrato de *Jodina rhombifolia*; 3. Extrato de M_1 ; 4. Extrato de M_2 ; 5. Extrato de M_3 ; 6. Extrato de *Sorocea bonplandii*; 7. Extrato de *Citronella gongonha*; 8. Catequina. Detecção: UV_{254nm}; (---); UV_{365nm} (—). Agente cromogênico: R1 (*Tabela 14). Os extratos hidroalcoólicos 50% (V/V), 10% (m/m) da droga.

TABELA 14 - Comportamento cromatográfico no sistema I (+) Sombra no UV365nm.

MANCHA Nº	Rf	UV ₃₆₅	R1	MANCHA Nº	Rf	UV ₃₆₅	R1
1	0,00	Marron claro	Rosa forte	24	0,32	Azul fluoresc.	-
2	0,17	Marron	Amarelo	25	0,56	+	Branco
3	0,47	+	Amarelo sujo	26	0,69	+	Branco
4	0,53	+	Am. sujo	27	0,00	+	Cinza
5	0,65	+	Rosa forte	28	0,32	Azul fluoresc.	-
6	0,72	+	Rosa forte	29	0,56	+	Branco
7	0,80	+	Rosa forte	30	0,69	+	Branco
8	0,86	Marron	Rosa forte	31	0,78	+	-
9	0,95	+	-	32	0,86	+	-
10	0,00	+	Marron	33	0,00	+	Cinza
11	0,06	+	Amarelo	34	0,06	+	-
12	0,22	+	-	35	0,13	Azul fluoresc.	-
13	0,30	+	-	36	0,33	+	-
14	0,36	+	-	37	0,52	+	-
15	0,80	+	-	38	0,00	+	Amarelo sujo
16	0,00	+	Cinza	39	0,06	Azul fluoresc.	Amarelo sujo
17	0,11	+	-	40	0,13	+	Amarelo sujo
18	0,32	Azul fluorescente	-	41	0,32	Azul fluoresc.	-
19	0,56	+	Branco	42	0,60	Marron	-
20	0,69	+	Branco	43	0,69	Azul fluoresc.	-
21	0,78	+	-	44	0,84	Marron	-
22	0,00	+	Cinza	45	0,87	Marron	Rosa forte
23	0,11	+	-				

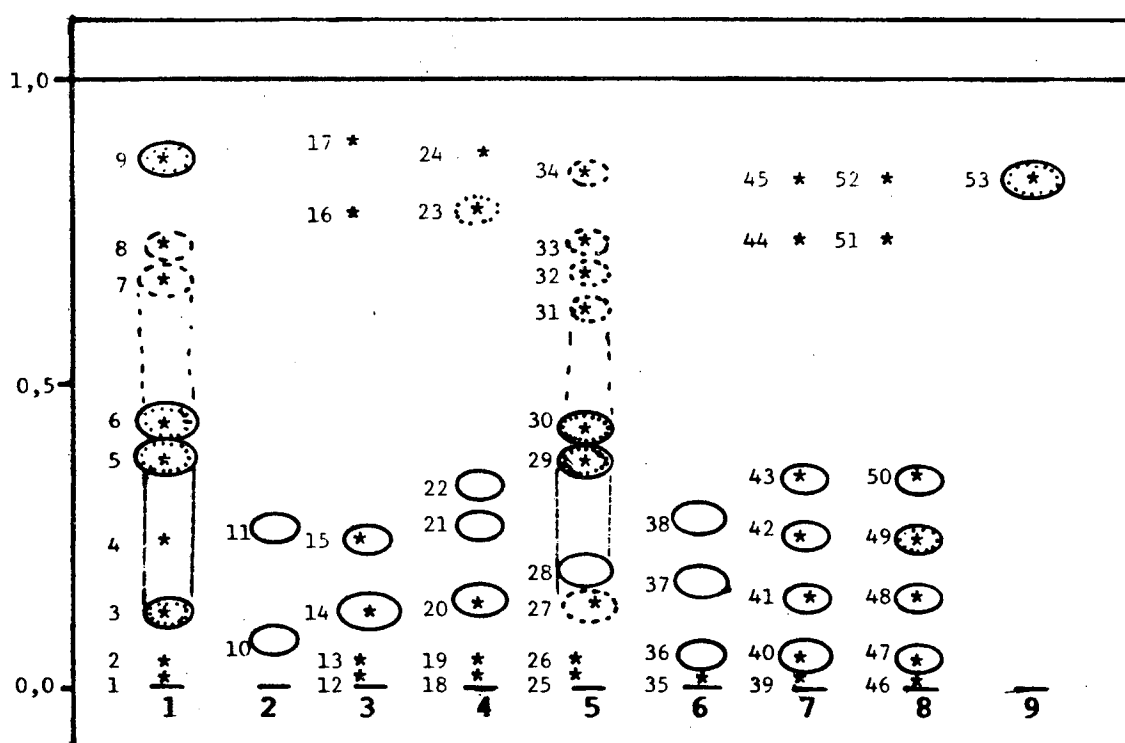


FIGURA 13 - Cromatografia comparativa de *M. ilicifolia* com drogas adquiridas no mercado. Sistema I. Detecção: UV254nm (---); UV365nm (—) e nebulização com agente cromogênico R1 (* Tabela 15). 1. Extrato alcoólico de *M. ilicifolia* 10% (m/m); 2. Extrato alcoólico de A₁; 3. Extrato alcoólico de A₂; 4. Extrato alcoólico de A₃; 5. Extrato hidroalcoólico de *M. ilicifolia*; 6. Extrato hidroalcoólico de A₁; 7. Extrato hidroalcoólico de A₂; 8. Extrato hidroalcoólico de A₃; 9. Catequina. Os extratos foram obtidos com 10% de droga.

TABELA 15 - Comportamento cromatográfico de substâncias detectadas no cromatograma da Figura 13. Sistema I. (+) Sombra no UV_{365nm}.

MANCHA Nº	Rf	UV _{365nm}	R1	MANCHA Nº	Rf	UV _{365nm}	R1
1	0,00	+	Rosa forte	27	0,13	Marron	Amarelo sujo
2	0,03	+	Amarelo sujo	28	0,19	Marron	-
3	0,12	Marron	Amarelo sujo	29	0,38	+	Amarelo sujo
4	cauda	+	Rosa claro	30	0,46	+	Amarelo sujo
5	0,38	+	Amarelo sujo	31	0,63	+	Rosa forte
6	0,45	+	Amarelo sujo	32	0,67	+	Rosa forte
7	0,68	+	Rosa forte	33	0,73	+	Rosa forte
8	0,71	+	Rosa forte	34	0,84	+	Rosa forte
9	0,84	Marron	Rosa forte	35	0,00	+	Amarelo sujo
10	0,09	Azul fluorescente	-	36	0,05	Marron	-
11	0,26	Azul fluorescente	-	37	0,16	Marron fluorescente	-
12	0,00	+	Rosa forte	38	0,27	Azul fluorescente	-
13	0,03	+	Amarelo sujo	39	0,00	+	Rosa forte
14	0,13	Marron	Cauda rosa	40	0,06	Azul fluorescente	Amarelo sujo
15	0,24	Marron	Cauda rosa	41	0,15	Marron	Cauda rosa
16	0,78	-	Rosa forte	42	0,24	Marron	Cauda rosa
17	0,89	+	Rosa forte	43	0,34	+	Cauda rosa
18	0,00	+	Rosa forte	44	0,72	-	Rosa forte
19	0,03	-	Amarelo sujo	45	0,82	-	Rosa forte
20	0,14	Marron	Cauda rosa	46	0,00	-	Rosa forte
21	0,25	+		47	0,05	Azul fluorescente	Amarelo sujo
22	0,33	Azul fluorescente	-	48	0,15	Marron	Cauda rosa
23	0,77	+	Rosa forte	49	0,24	Marron	Cauda rosa
24	0,88	-	Rosa forte	50	0,34	Marron	Cauda rosa
25	0,00	+	Rosa forte	51	0,72	-	Cauda rosa
26	0,03	+	Amarelo sujo	52	0,82	Marron	Cauda rosa
				53	0,83	Marron	Cauda rosa

3.1.4 Detecção de Substâncias em *M. ilicifolia*

3.1.4.1 Detecção da cafeína

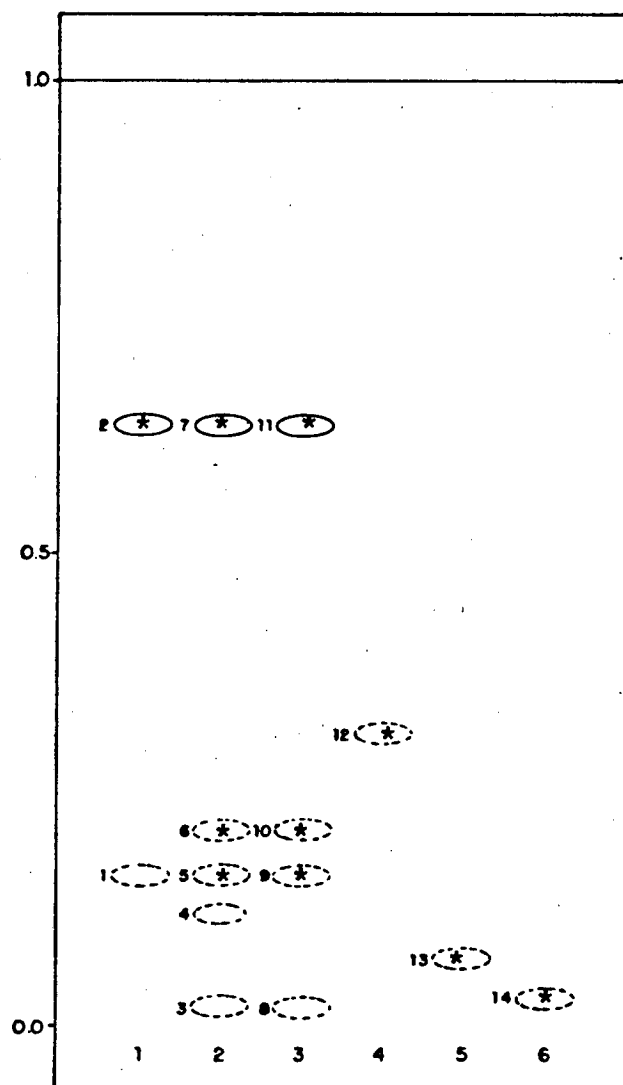


FIGURA 14 - Cromatografia para xantinas. Sistema IV. 1. Cafeína após passagem por coluna Extrelut^R. 2. Fração de *M. ilicifolia* (2.4.2.1); 3. Fração do macegado de *M. ilicifolia* (2.4.2.3); 4. Cafeína em etanol; 5. Teobromina em clorofórmio; 6. Teofilina em clorofórmio. Detecção: UV254nm (---); UV365nm (—). Agente cromogênico R7 (*Tabela 16).

TABELA 16 - Dados do cromatograma para xantinas. (+) Sombra no UV365nm.

MANCHA Nº	Rf	UV365nm	R7	MANCHA Nº	Rf	UV365nm	R7
1	0,16	+	Vermelho tijolo	8	0,02	+	-
2	0,64	Azul fluorescente	Amarelo sujo	9	0,16		Vermelho tijolo
3	0,02	+	-	10	0,21	+	-
4	0,12	+	-	11	0,64	Azul fluorescente	Amarelo sujo
5	0,16	+	Vermelho tijolo	12	0,31	+	Vermelho tijolo
6	0,21	+	Amarelo sujo	13	0,07	+	Roxo
7	0,64	Azul fluorescente	Amarelo sujo	14	0,03	+	Marron

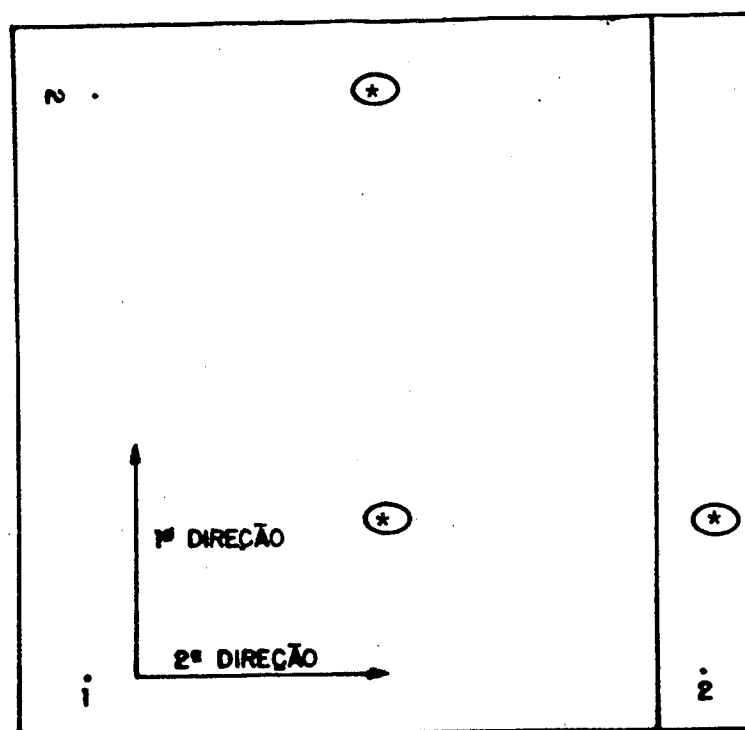


FIGURA 15 - Cromatografia bidimensional para comprovação de xantinas. 1ª Direção - Sistema I; 2ª Direção - Sistema V. 1. Amostra extraída de *M. ilicifolia* (STAHL, 1975). 2. cafeína. Detecção: UV365nm e agente cromogênico: R7 (*Tabela 17).

TABELA 17 - Dados da cromatografia bidimensional para xantinas.

	MANCHA	Rf	UV ₃₆₅	R7
1ª Direção	Amostra	0,26	Roxo	Marron
	Padrão	0,26	Roxo	Marron
2ª Direção	Amostra	0,46	Roxo	Marron
	Padrão	0,45	Roxo	Marron

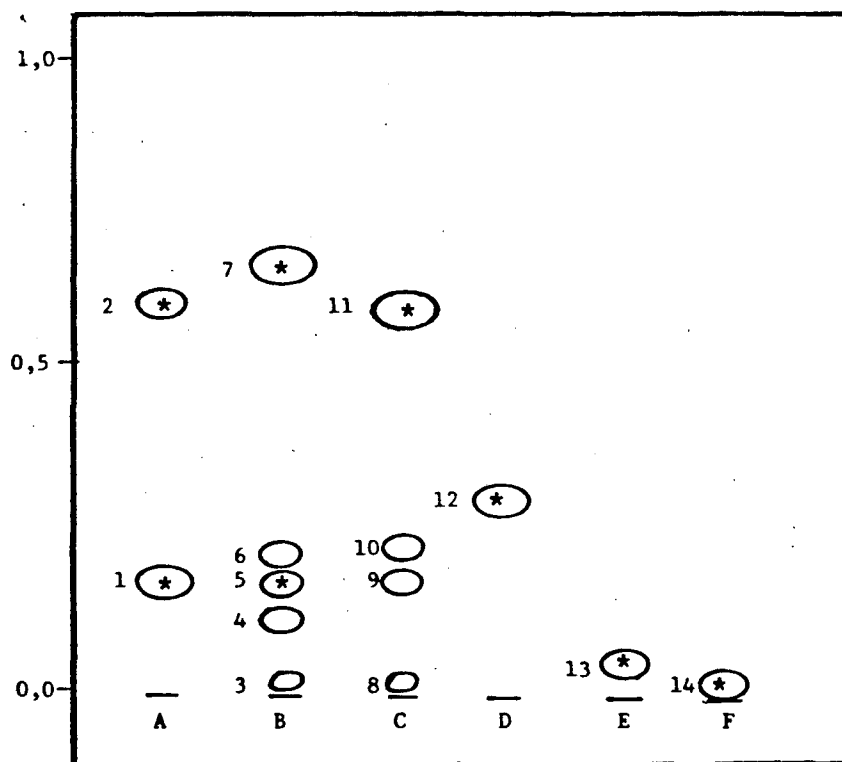


FIGURA 16 - Cromatografia comparativa entre amostras obtidas na quantificação e padrões de metilxantinas. Sistema V. A. Cafeína padrão passada por coluna Extrelut (item 2.2.13.3); B. Solução extraída da droga - método STAHL (1975) (item 2.2.13.2); C. Solução extraída do macerado em coluna Extrelut (item 2.2.13.3); D. Cafeína padrão em clorofórmio; E. Teobromina em clorofórmio; F. Teofilina em clorofórmio. Detecção: (-) UV₃₆₅nm. Agente cromogênico R7 (* Tabela 18).

TABELA 18 - Comportamento cromatográfico na análise de xantinas em *M. ilicifolia*. Sistema V.

MANCHA Nº	Rf	UV	R7
1	0,17	Roxo	Marron tijolo
2	0,63	Azul fluoresc.	Amarelo sujo
3	0,02	Roxo	-
4	0,11	Roxo	-
5	0,17	Roxo	Marron tijolo
6	0,21	Roxo	-
7	0,70	Azul fluoresc.	Amarelo sujo
8	0,02	Roxo	-
9	0,19	Roxo	-
10	0,25	Roxo	-
11	0,63	Azul fluoresc.	Amarelo sujo
12	0,31	Roxo	Marron tijolo
13	0,06	Roxo	Roxo
14	0,03	Roxo	Marron escuro

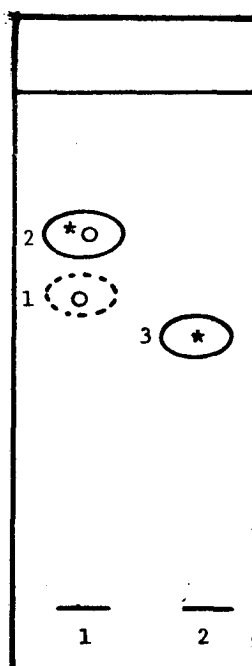


FIGURA 17 - Cromatografia de detecção da degradação da substância M3. Sistema XVI. 1. Sobrenadante extraído com clorofórmio. (item 2.2.14.2); 2. cafeína em clorofórmio. Agentes cromogênicos R5 (*) e R6 (o) (Tabela 19).

TABELA 19 - Comportamento cromatográfico de substâncias detectadas no sobrenadante da análise de xantinas. Sistema XVI. (+) Sombra no UV_{365nm}.

Nº MANCHA	UV _{365nm}	iodo + R5	R6
1	+	-	Rosa salmão
2	+	Marron claro	Marron
3	+	Roxo	-

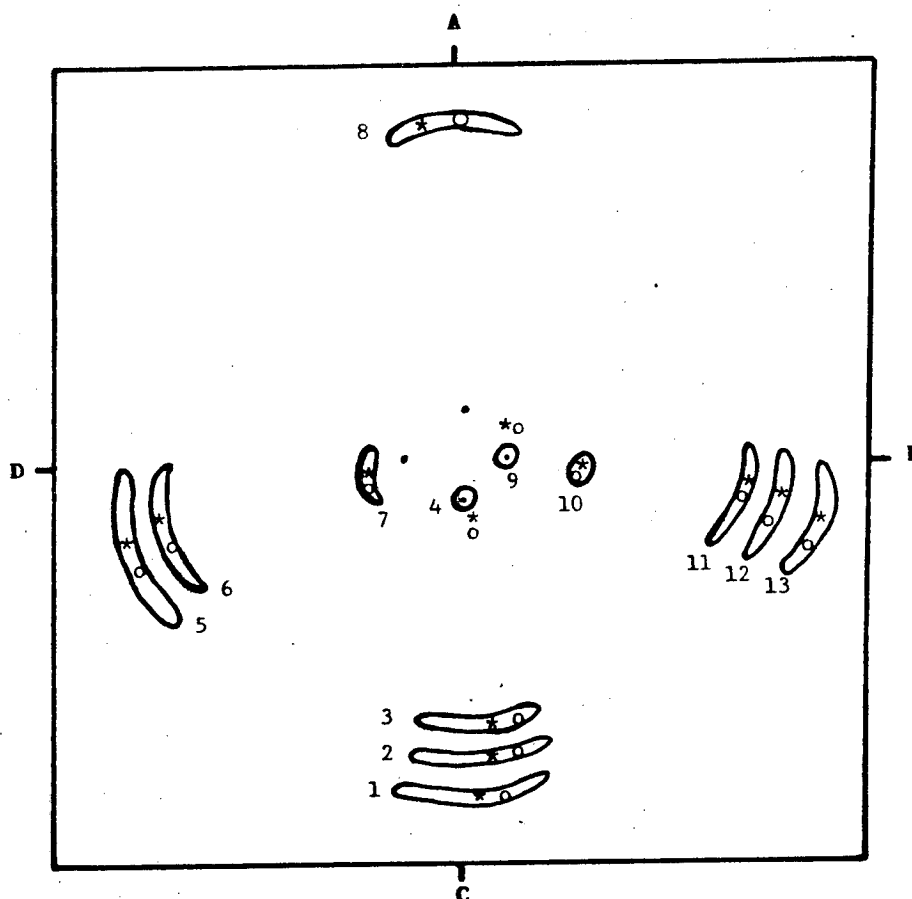


FIGURA 18 - Cromatografia circular para detecção de xantinas. Sistema VI. A. Cafeína padrão em clorofórmio; B. Solução extraída do macerado em coluna Extrelut (item 2.2.13.3); C. Solução extraída da droga - método STHAL (item 2.2.13.2); D. Cafeína padrão passada por coluna Extrelut (item 2.2.13.3). Revelação R5 (*) e R6 (o - Tabela 20).

TABELA 20 - Comportamento cromatográfico de substâncias detectadas em cromatografia circular. Sistema VI (Figura 18).

MANCHAS	UV _{365nm}	I ₂	R5 + R6
2, 6, 12	Azul fluorescente	Marron	Marron
3, 11	Roxo	-	Roxo
1,5,8,13	Roxo	Marron	Marron
7, 10	Roxo	Marron	Rosa salmão
4, 9	Vermelho	Verde	Verde

3.1.4.2 Caracterização de M1, M2 e M3

3.1.4.2.1 Substância M1

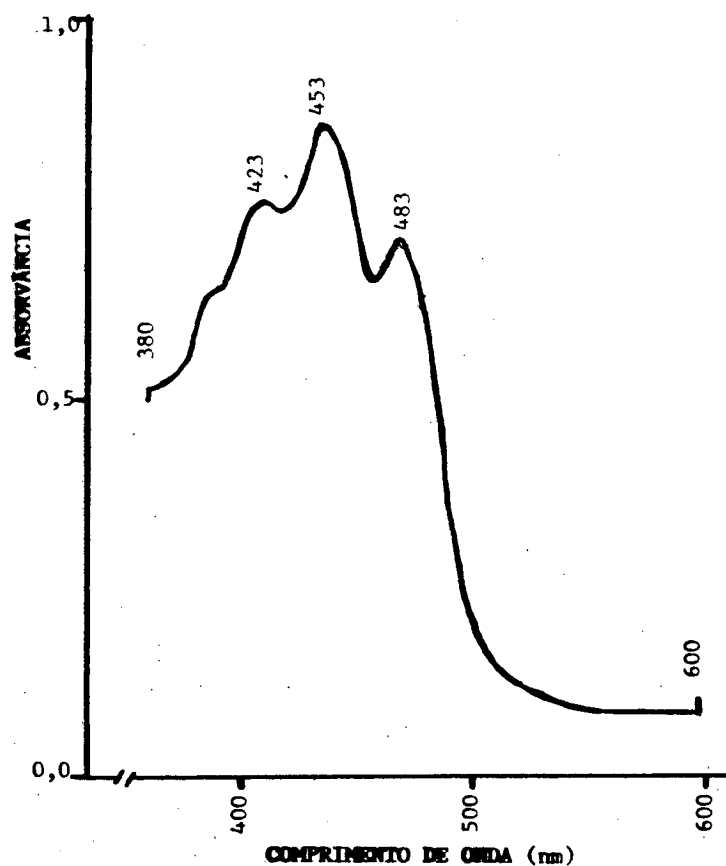


FIGURA 19 - Espectro no visível de M1 em clorofórmio.

Características:

Substância amarelo forte, de consistência pastosa, lipófila, muito solúvel em clorofórmio, hexano, solúvel em etanol, metanol, insolúvel em água. Em contato com ácido sulfúrico 49% e cloreto de antimônio, adquire cor azul.

3.1.4.2.2 Substância M2

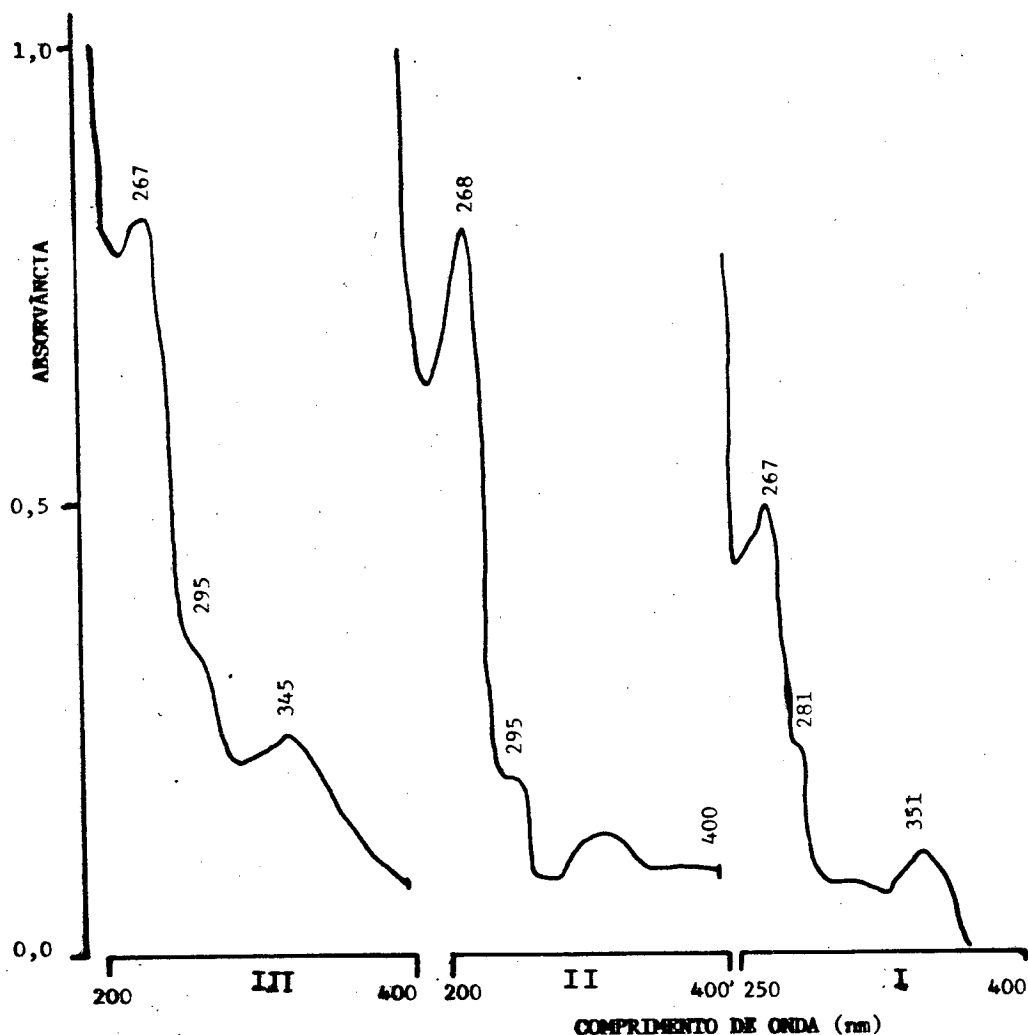


FIGURA 20 - Espectro no ultravioleta de M2. I. Metanol; II. Metanol + AlCl₃; III. Metanol + AlCl₃.

Características:

Substância amarelo pálido, solúvel em água, água acidificada, etanol, metanol, acetato de etila. Em contato com amônia passa a amarelo fluorescente.

TABELA 21 - Comportamento espectroscópico no ultravioleta de M2 em metanol.

CONDIÇÃO	SOLVENTES E REAGENTES	MÁXIMO (nm)	OBSERVAÇÕES
I	Metanol	267, 281sh, 351	-
II	Metanol + cloreto de alumínio	268, 295sh, 350	Desvio (banda I), Desvio hipercrômico (banda II)
III	Metanol + cloreto de alumínio + ácido clorídrico	268, 295sh, 354	Desvio hipsocrômico (350-345)

3.1.4.2.3 Substância M3

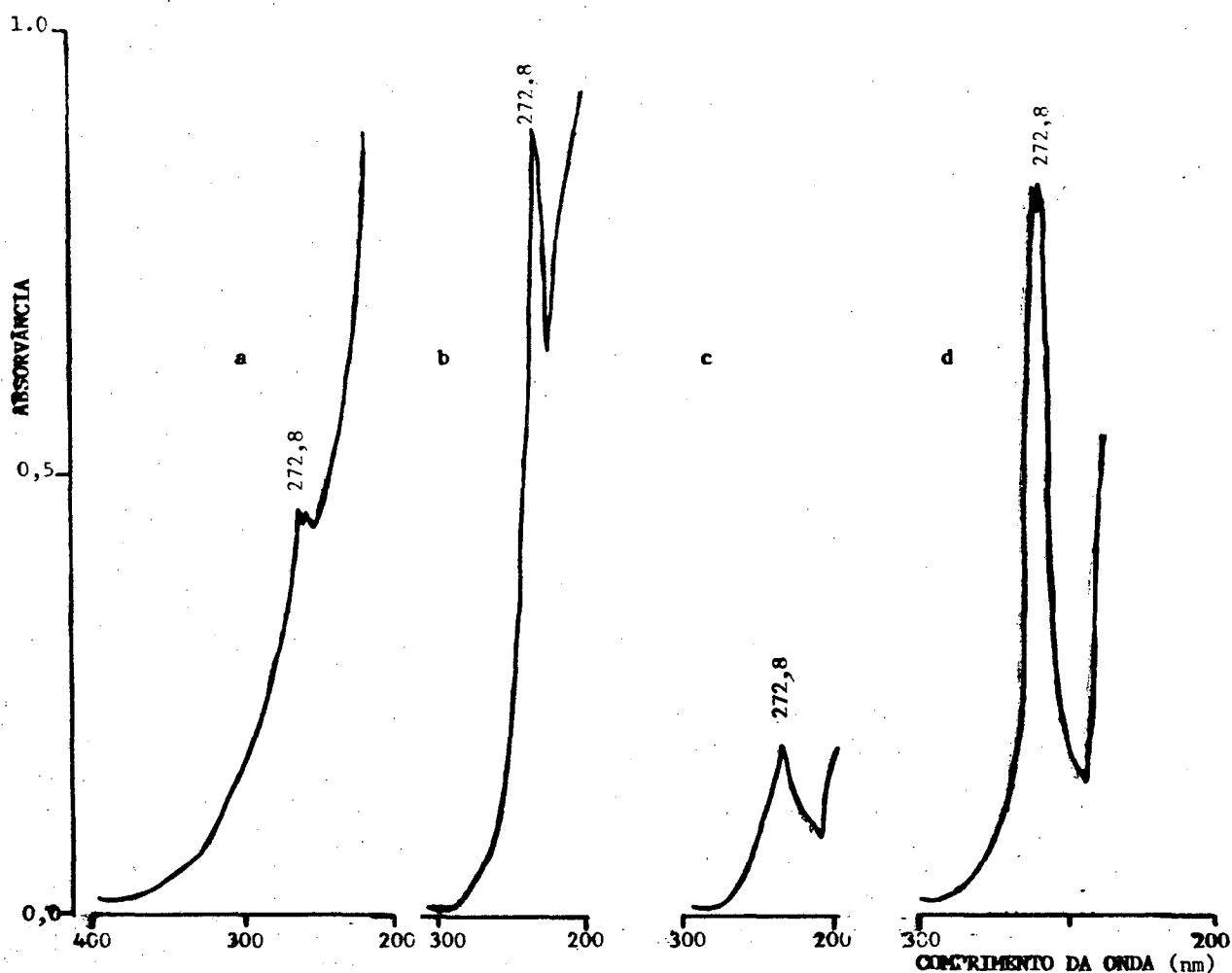


FIGURA 21 - Espectros no ultravioleta da substância M3 em etanol. (a e b): substância M3 extraída pelo método STAHL (1975); (c e d): cafeína nas concentrações de 2,5 e 12 µg/ml respectivamente, após submeter ao mesmo processo extrativo.

Características:

Substância incolor, solúvel em água, etanol, clorofórmio e bases.

3.1.5 Perda por Secagem

TABELA 22 - Perda por secagem (PS) das folhas de *M. ilicifolia* sem rasurar, em estufa de ar circulante a 40°C, em função do tempo.

t (dias)	PS (%)	± s	CV%
4	38,79	0,7883	2,03
5	40,35	0,9575	2,42
6	41,76	1,2400	2,97
7	41,76	1,2400	2,97
8	41,76	1,2400	2,97

3.1.6 Perda por Dessecação

TABELA 23 - Perda por dessecação (PD) das folhas rasuradas de *M. ilicifolia* a 105°C (FARMACOPÉIA, 1977). Os resultados obtidos são a média de 8 determinações.

CICLO	PD %	± s	CV%
1º	19,85	0,7646	3,85
2º	20,03	0,8503	4,25
3º	20,16	0,8204	4,07

3.1.7 Análise Granulométrica

TABELA 24 - Análise granulométrica por tamisação de *M. ilicifolia*. Os valores obtidos são médias de 6 determinações.

M (malha) (mm)	CLASSE GRANULOMÉTRICA (mm)	DIMENSÃO MÉDIA M	INTERVALO DE ABERTURA M	FRAÇÃO TAMISADA T (%)	FRAÇÃO RESÍDUO R (%)	FRAÇÃO PASSAGEM P (%)
0,800	0,800-1,250	1,0250	0,450	0,76	0,76	99,24
0,315	0,315-0,800	0,5575	0,485	35,33	36,09	63,91
0,200	0,200-0,315	0,2575	0,115	25,27	61,36	38,64
0,071	0,071-0,200	0,1355	0,129	22,30	83,66	16,34
0,063	0,063-0,071	0,0670	0,008	3,54	87,20	12,80
COLETOR	0,000-0,063	0,0315	0,0315	12,27	99,47	0,53

3.1.8 Determinação do Teor Extrativo (TE) de folhas de *M. ilicifolia* (BUNDESVEREINIGUNG, 1979)

TABELA 25 - Determinação do teor extrativo de folhas frescas de *M. ilicifolia* (n = 6)

TE % (m/m)	± s	CV%
27,04	0,9216	3,41

TABELA 26 - Determinação do teor extrativo de folhas secas de *M. ilicifolia* em função da granulometria (n = 5).

FAIXA GRANULOMÉTRICA	TE (%)	± s	CV%
0,800-0,300	26,09	0,3125	1,20
2,000-0	24,10	0,3488	1,45

TABELA 27 - Determinação do teor extrativo de folhas secas de *M. ilicifolia* em função do tempo de armazenamento (n = 5).

TEMPO DE ARMAZENAMENTO (meses)	TE (%)	± s	CV%
0	24,10	0,3488	1,45
1	27,57	0,8871	3,00
2	28,80	0,5969	2,07

3.1.9 Determinação de Taninos (BÖHME & HARTKE, 1976)

TABELA 28 - Validação do método de doseamento para taninos, utilizando taninos SETA e *Rathania radix* (n = 5).

AMOSTRA	TANINOS SETA				<i>Rathania radix</i>			
	VALOR ESPERADO %	VALOR OBSERVADO \bar{x}	$\pm s$	CV%	VALOR ESPERADO %	VALOR OBSERVADO \bar{x}	$\pm s$	CV%
TANINOS TOTAIS (%)	94,00	84,14	0,8373	0,99	15,00 - 20,00	17,72	0,3808	2,15
TANANTES (%)	72,00	75,35	0,6283	0,83		15,85	0,2318	1,46
NÃO TANANTES (%)	22,00	8,79	0,4345	4,90		1,88	0,1680	8,94

TABELA 29 - Determinação quantitativa de taninos em folhas de *Maytenus ilicifolia* (n = 3).

	\bar{x}	$\pm s$	CV%
Taninos Totais (%)	12,28	0,3915	3,18
Fração Tanante (%)	8,10	0,0907	1,12
Fração não tanante (%)	4,18	0,3225	7,71

3.2 CARCTERIZAÇÃO DOS MACERADOS

3.2.1 Determinação do Resíduo Seco (RS)

TABELA 30 - Resíduo seco (RS) dos extratos macerados em função da concentração etanólica (CE) e do tempo de maceração (TM) e do extrato referência (ER) (n=6).

CE (% V/V)	TM (dias)	RS (%; m/m)	$\pm s$	CV%
50	5	2,97	0,0741	2,51
	10	2,94	0,0978	3,32
60	5	2,95	0,1129	3,83
	10	2,88	0,080	2,79
70	5	2,85	0,0126	0,44
	10	2,32	0,0122	0,53
96	5	1,79	0,0124	0,69
	10	1,81	0,0742	4,37
ER	-	2,75	0,0350	1,27

3.2.2 Determinação da Densidade dos Macerados e Extrato Referência (ER)

TABELA 31 - Densidade dos macerados após 5 dias de contato e do ER determinada por areômetro e por picnômetro em função da concentração etanólica (CE), (n = 3).

CE (%; V/V)	AREÔMETRO			PICNÔMETRO		
	\bar{x}	$\pm s$	CV%	\bar{x}	$\pm s$	CV%
50	0,935	0,0016	0,17	0,936	0,012	0,13
60	0,927	0,0012	0,13	0,927	0,017	0,18
70	0,904	0,0006	0,06	0,904	0,0004	0,04
96	0,813	0,0010	0,12	0,809	0,0059	0,73
ER	0,937	0,0014	0,15	0,938	0,0010	0,11

TABELA 32 - Densidade dos macerados após 10 dias de contato e do ER determinada por areômetro e por picnômetro, em função da concentração etanólica (CE), do líquido extrator (n = 3).

CE (%; V/V)	AREÔMETRO			PICNÔMETRO		
	\bar{x}	$\pm s$	CV%	\bar{x}	$\pm s$	CV%
50	0,933	0,0012	0,13	0,936	0,0015	0,16
60	0,932	0,0020	0,21	0,938	0,0010	0,11
70	0,887	0,0018	0,20	0,889	0,0013	0,15
96	0,811	0,0012	0,14	0,812	0,0010	0,12
ER	0,937	0,0014	0,15	0,938	0,0010	0,11

3.2.3 Determinação do Teor Alcoólico

TABELA 33 - Teor alcoólico (TA) dos extratos após 5 dias de maceração, em função da concentração etanólica (CE) do mênstruo e do extrato referência (ER), determinado pelo método da FARMACOPÉIA (1977), empregando areômetro e picnômetro (n = 5).

CE (%; V/V)	AREÔMETRO			PICNÔMETRO		
	TA (%;V/V)	$\pm s$	CV%	TA (%;V/V)	$\pm s$	CV%
50	47	0,0799	0,17	46	0,0598	0,13
60	51	0,0663	0,13	51	0,0918	0,18
70	61	0,0366	0,06	61	0,0244	0,04
96	94	0,1128	0,12	95	0,6935	0,73
ER	46	0,0690	0,15	45	0,0485	0,11

TABELA 34 - Teor alcoólico (TA) dos extratos após 10 dias de maceração em função da concentração etanólica (CE) do mênstruo e do extrato referência (ER), determinado pelo método da FARMACOPEIA (1977), empregando areômetro e picnômetro (n = 5).

CE (%;V/V)	TA	AREÔMETRO ± s	CV%	TA	PICNÔMETRO ± s	CV%
50	48	0,0763	0,13	46	0,2392	0,52
60	49	0,638	1,30	46	0,3588	0,78
70	72	0,0372	0,52	68	0,0816	0,12
96	94	0,1590	0,17	94	1,081	1,15
ER	47	0,0687	0,15	46	0,2254	0,49

3.2.4 Determinação do pH

TABELA 35 - Valores de pH dos extratos em função da concentração etanólica (CE) do mênstruo e do tempo de maceração (TM), do extrato referência (ER), dos mênstruos e da água (n = 3).

AMOSTRA	TM (dias)	CE (%)	pH	± s	CV%
EXTRATO	5	50	6,14	0,0173	0,28
		60	6,14	0,0212	0,35
		70	6,24	0,0173	0,28
		96	6,38	0,0231	0,36
EXTRATO	10	50	6,27	0,0580	0,92
		60	6,17	0,0312	0,51
		70	6,32	0,0289	0,47
		96	6,20	0,0057	0,09
ER		50	6,14	0,0045	0,73
ETANOL		50	4,72	0,0462	0,98
		60	4,93	0,0689	1,40
		70	5,25	0,0695	1,32
		96	6,90	0,0057	0,83
ÁGUA		-	5,52	0,076	1,38

3.2.5 Coloração dos Extratos

TABELA 36 - Coloração dos extratos em função do tempo de maceração (TM) e concentração etanólica (CE) do mênstruo.

TM (dias)	CE			
	50	60	70	96
5	marron escuro	marron esverdeado	verde	verde oliva
10	marron escuro	marron escuro	verde cana escuro	verde oliva

3.3 QUANTIFICAÇÃO DOS MACERADOS

3.3.1 Doseamento Químico de Taninos

TABELA 37 - Doseamento de taninos nos extratos de *M. ilicifolia*, após 5 dias de maceração, em função da concentração etanólica (CE) do mênstruo (BÖHME & HARTKE, 1976) com pó de pele (n = 3).

CE %	TANINOS TOTAIS			FRAÇÃO TANANTE			FRAÇÃO NÃO TANANTE		
	\bar{x} (%)	$\pm s$	CV%	\bar{x} (%)	$\pm s$	CV%	\bar{x} (%)	$\pm s$	CV%
50	13,09	0,1002	0,77	9,53	0,0608	0,64	3,57	0,1058	2,96
70	11,50	0,1305	1,14	8,53	0,1270	1,49	2,97	0,0557	1,88
96	9,59	0,0889	0,93	7,36	0,0964	1,31	2,23	0,0436	2,25

TABELA 38 - Doseamento de taninos nos extratos de *M. ilicifolia* após 5 dias de maceração, em função da concentração etanólica do Mênstruo (CE), utilizando como substância precipitante a caseína.

CE (%)	TANINOS TOTAIS			FRAÇÃO TANANTE			FRAÇÃO NÃO TANANTE		
	\bar{x} (%)	$\pm s$	CV%	\bar{x} (%)	$\pm s$	CV%	\bar{x} (%)	$\pm s$	CV%
50	13,09	0,1002	0,77	9,21	0,3982	4,33	3,88	0,3477	8,96
70	11,50	0,1305	1,14	8,39	6,7343	8,75	3,11	0,6222	20,00
96	9,59	0,0889	0,93	6,52	0,2511	3,85	3,07	0,1793	5,84

TABELA 39 - Doseamento de taninos nos extratos de *M. ilicifolia* após 10 dias de maceração, em função da concentração etanólica do mênstruo (CE), empregando pó de pele como precipitante (n = 3).

CE (%)	TANINOS TOTAIS			FRAÇÃO TANANTE			FRAÇÃO NÃO TANANTE		
	\bar{x}	$\pm s$	CV%	\bar{x}	$\pm s$	CV%	\bar{x}	$\pm s$	CV%
50	13,02	0,1554	1,19	9,38	0,2191	2,44	3,64	0,0751	2,06
70	10,65	0,1007	0,95	7,77	0,0794	1,02	2,88	0,1078	3,75
96	10,08	0,0961	0,95	8,16	0,1387	1,70	1,92	0,0436	2,25

TABELA 40 - Doseamento de taninos dos extratos de *M. ilicifolia* após 10 dias de maceração, em função da concentração etanólica do mênstruo (CE), empregando caseína como precipitante (n = 3).

CE (%)	TANINOS TOTAIS			FRAÇÃO TANANTE			FRAÇÃO NÃO TANANTE		
	\bar{x}	$\pm s$	CV%	\bar{x}	$\pm s$	CV%	\bar{x}	$\pm s$	CV%
50	13,02	0,1554	1,19	8,83	0,3808	4,31	3,49	0,1159	3,32
70	10,65	0,1007	0,95	7,05	0,7343	3,20	3,60	0,2914	8,09
96	10,08	0,0961	0,95	7,44	0,1680	2,26	2,72	0,1554	5,71

TABELA 41 - Doseamento de taninos no extrato referência (ER) de *M. ilicifolia* empregando como substâncias precipitantes pó de pele e caseína (n = 3).

SUBSTÂNCIA PRECIPITANTE	TANINOS TOTAIS			FRAÇÃO TANANTE			FRAÇÃO NÃO TANANTE		
	\bar{x}	$\pm s$	CV%	\bar{x}	$\pm s$	CV%	\bar{x}	$\pm s$	CV%
PÓ DE PELE	16,14	0,1155	0,72	13,21	0,0635	0,48	2,93	0,0520	1,77
CASEÍNA	16,14	0,1155	0,72	11,88	0,3487	2,94	4,26	0,3208	7,53

3.3.2 Avaliação Espectrofotométrica para Cafeína

3.3.2.1 Avaliação para cafeína no ultravioleta - extração com solvente

TABELA 42 - Avaliação da cafeína em UV a 272,8 nm após extração (STAHL, 1975 - modificado para extratos), em função do tempo de maceração (TM) e concentração etanólica (CE) do mênstruo.

EXTRATO TM (dias)	CE (%)	CONCENTRAÇÃO DE CAFEÍNA ($\mu\text{g/ml}$)	$\pm s$	CV%
5	50	13,27	0,3260	2,46
	60	19,47	1,1133	5,72
10	50	8,30	0,3126	3,77
	60	17,26	0,6236	3,61

TABELA 43- Dados da curva de calibração de cafeína em etanol absoluto a 272,8 nm (n = 5).

CAFEÍNA ($\mu\text{g/ml}$)	\bar{A} OBTIDA	ABSORVÂNCIA		\bar{A} CALCULADA
		$\pm s$	CV%	
1,0	0,054	0,0019	3,46	0,040
1,5	0,076	0,0016	2,08	0,064
2,0	0,099	0,0011	1,11	0,087
2,5	0,120	0,0032	2,67	0,111
3,0	0,145	0,0016	1,09	0,134
4,0	0,164	0,0046	2,79	0,180
5,0	0,213	0,0029	1,34	0,227
6,0	0,267	0,0025	0,98	0,274
7,0	0,314	0,0106	3,37	0,321
8,0	0,367	0,0149	4,08	0,368
9,0	0,409	0,0126	3,08	0,414
10,0	0,460	0,0093	2,03	0,461
11,0	0,521	0,0144	2,76	0,508
12,0	0,567	0,0111	1,96	0,554

$$r = 0,9974$$

$$y = 0,046x - 0,00064$$

3.3.2.2 Doseamento para cafeína através de coluna Extrelut/UV

TABELA 44 - Concentração de cafeína nos macerados em função do tempo de maceração (TM) e da concentração etanólica (CE) do mênstruo por espectrometria no ultravioleta a 272 nm, após extração e purificação por coluna Extrelut (n = 3).

EXTRATO		CAFEÍNA ($\mu\text{g/ml}$)	$\pm s$	CV%
TM (dias)	CE (%)			
5	50	6,32	0,0720	1,14
	60	6,01	0,1973	3,28
10	50	4,56	0,1637	3,50
	60	3,85	0,1848	4,79

TABELA 45 - Curva de calibração de cafeína padrão após passagem por coluna Extrelut a 272 nm.

CAFEÍNA ($\mu\text{g/ml}$)	ABSORVÂNCIA			
	\bar{A} OBTIDA	$\pm s$	CV%	\bar{A} CALCULADA
1,0	-	-	-	-
1,5	-	-	-	-
2,0	0,051	0,0015	2,94	0,050
2,5	0,068	0,0006	0,85	0,070
5,0	0,173	0,0046	2,60	0,171
7,5	0,271	0,0063	1,68	0,272

$$r = 0,9998$$

$$y = 0,040x - 0,0307$$

TABELA 46 - Curva de calibração de cafeína em diclorometano a 272nm (n = 3).

CAFEÍNA (mg/ml)	\bar{A} OBTIDA	ABSORVÂNCIA $\pm s$	CV%	\bar{A} CALCULADA
1,5	0,068	0,0028	4,11	0,063
2,5	0,100	0,0031	3,10	0,107
5,0	0,218	0,0025	1,15	0,218
7,5	0,329	0,0043	1,31	0,328

$$r = 0,9991$$

$$y = 0,0443x - 0,0387$$

3.4 ESTUDOS PRELIMINARES DA ESTABILIDADE

Abaixo de cada tabela estão apresentados equação da reta e coeficiente de correlação (r), calculados considerando a reta de degradação de 1ª ordem.

Extrato Padronizado Submetido à 30°C

TABELA 47 - Concentração de taninos totais (TT) no extrato de *M. ilicifolia* quando submetido a 30°C, em função do tempo de exposição.

TEMPO (dias)	TT (%)	$\pm s$	CV%	CONCENTRAÇÃO		K_1 ($10^{-3} \cdot d^{-1}$)
				% OBTIDA	% CALCULADA	
0	13,01	0,0964	0,74	100,00	101,37	-
7	12,75	0,0777	0,61	98,00	96,44	2,8861
14	11,62	0,0400	0,34	89,32	91,52	8,0675
24	10,89	0,1168	1,07	83,71	84,47	7,4088
30	10,66	0,1825	1,71	81,94	80,25	6,6394
44	9,12	0,0557	0,61	70,12	70,40	8,067

$$r = -0,9871$$

$$y = -0,70x + 101,37$$

TABELA 48 - Concentração da fração **tanante** (T) no extrato de *M. ilicifolia*, quando submetido à 30°C, em função do tempo de exposição (n = 3).

TEMPO (dias)	T (%)	± s	CV%	CONCENTRAÇÃO		K ₁ (10 ⁻³ . d ⁻¹)
				% OBTIDA	% CALCULADA	
0	9,87	0,1168	1,18	100,00	102,38	-
7	9,76	0,1124	1,15	98,89	96,74	1,6946
14	8,76	0,1825	2,08	88,75	91,09	8,5248
24	8,03	0,0611	0,76	81,36	83,02	8,5953
30	7,89	0,0567	0,72	79,43	78,18	7,6765
44	6,61	0,1655	2,50	67,01	66,89	9,0984

$$r = -0,9853$$

$$y = -0,81x + 102,38$$

TABELA 49 - Concentração da fração **não-tanante** (NT) no extrato de *M. ilicifolia*, quando submetido à 30°C, em função do tempo de exposição (n = 3).

TEMPO (dias)	NT (%)	± s	CV%	CONCENTRAÇÃO		K ₁ (10 ⁻³ . d ⁻¹)
				% OBTIDA	% CALCULADA	
0	3,14	0,0025	0,08	100,00	98,34	-
7	2,99	0,0095	0,32	95,22	95,59	6,9972
14	2,86	0,0010	0,04	91,08	92,84	6,6737
24	2,86	0,0087	0,31	91,08	88,91	3,8930
30	2,77	0,0082	0,30	88,22	86,56	4,1779
44	2,51	0,0017	0,07	79,36	81,06	5,2540

$$r = -0,9506$$

$$y = -0,39x + 98,34$$

Extrato Padronizado a 40°C

TABELA 50 - Concentração de taninos totais (TT) no extrato de *M. ilicifolia*, quando submetido a 40°C, em função do tempo de exposição (n = 3).

TEMPO (dias)	TT (%)	± s	CV%	CONCENTRAÇÃO		K ₁ (x 10 ⁻³ . d ⁻¹)
				% OBTIDA	% CALCULADA	
0	13,01	0,00208	0,02	100,00	98,25	-
7	12,53	0,00216	0,02	96,39	93,93	5,2525
14	11,33	0,00915	0,08	87,09	89,62	9,8734
24	10,74	0,00874	0,08	82,55	83,45	7,9903
30	10,32	0,01921	0,19	79,32	79,75	7,7227
37	9,98	0,0210	0,21	76,71	75,44	7,1659
44	9,27	0,01102	0,12	71,25	71,12	7,7040

$$r = -0,9802$$

$$y = -0,62x + 98,25$$

TABELA 51 - Concentração da fração tanante (T) no extrato de *M. ilicifolia*, quando submetido a 40°C, em função do tempo de exposição (n = 3).

TEMPO (dias)	T (%)	± s	CV%	CONCENTRAÇÃO		K ₁ (x 10 ⁻³ . d ⁻¹)
				% OBTIDA	% CALCULADA	
0	9,87	0,00116	0,02	100,00	98,48	-
7	9,45	0,00217	0,02	95,75	94,24	6,2042
14	8,66	0,002309	0,03	87,74	90,01	9,3423
24	8,32	0,00897	0,11	84,30	83,96	7,116
30	7,93	0,01258	0,16	80,35	80,32	7,2926
37	7,58	0,01089	0,14	76,80	76,09	7,1342
44	7,06	0,01185	0,17	71,53	71,85	7,6148

$$r = -0,9887$$

$$y = -0,61x + 98,48$$

TABELA 52 - Concentração da fração não-tanante (NT) no extrato de *M. ilicifolia*, quando submetido a 40°C, em função do tempo de exposição (n = 3).

TEMPO (dias)	NT (%)	± s	CV%	CONCENTRAÇÃO		K ₁ (x 10 ⁻³ . d ⁻¹)
				% OBTIDA	% CALCULADA	
0	3,14	0,002517	0,08	100,00	97,52	-
7	3,09	0,006810	0,22	98,41	92,96	2,2897
14	2,67	0,001000	0,04	85,03	88,40	11,5833
24	2,42	0,008310	0,34	77,07	81,88	10,8523
30	2,39	0,007768	0,33	76,12	77,97	0,0953
37	2,40	0,006314	0,26	76,43	73,40	7,2647
44	2,21	0,003512	0,16	70,38	70,38	8,4860

$$r = -0,9160$$

$$y = -0,65x + 97,52$$

Extrato Padronizado a 60°C

TABELA 53 - Concentração de taninos totais (NT) no extrato de *M. ilicifolia*, quando submetido a 60°C, em função do tempo de exposição (n = 3).

TEMPO (dias)	TT (%)	± s	CV%	CONCENTRAÇÃO		K ₁ (x 10 ⁻³ . d ⁻¹)
				% OBTIDA	% CALCULADA	
0	13,01	0,0964	0,74	100,00	80,43	-
7	9,69	0,1168	1,21	74,48	75,73	4,209
14	9,44	0,0751	0,79	72,56	71,02	2,291
17	8,66	0,1387	1,60	66,56	69,00	2,240
24	8,44	0,0983	1,17	64,90	64,30	1,801
30	8,34	0,0777	0,93	64,10	60,26	1,482
44	6,32	0,2075	2,53	48,56	50,85	1,642

$$r = -0,9633$$

$$y = -0,67x + 80,43$$

TABELA 54 - Concentração da fração **tanante** (T) no extrato de *M. ilicifolia*, quando submetido a 60°C, em função do tempo de exposição (n = 3).

TEMPO (dias)	T (%)	± s	CV%	CONCENTRAÇÃO		K ₁ (x 10 ⁻³ . d ⁻¹)
				% OBTIDA	% CALCULADA	
0	9,87	-	-	100,00	89,18	-
7	8,52	0,0173	0,20	86,32	81,45	2,102
14	6,76	0,1097	1,62	68,49	73,72	2,704
17	6,67	0,0693	1,04	67,58	70,40	2,305
24	6,25	0,1893	3,03	63,32	62,67	1,904
30	5,81	0,0400	0,69	58,87	56,04	1,766
44	3,97	0,2346	3,64	40,27	40,58	2,067

$$r = -0,9694$$

$$y = -1,05x + 89,18$$

TABELA 55 - Concentração da fração **não-tanante** (NT) no extrato de *M. ilicifolia*, quando submetido a 60°C, em função do tempo de exposição (n = 3).

TEMPO (dias)	NT (%)	± s	CV%	CONCENTRAÇÃO		K ₁ (x 10 ⁻³ . d ⁻¹)
				% OBTIDA	% CALCULADA	
0	3,14	0,00252	0,08	100,00	-	-
7	1,17	0,1210	10,00	37,26	-	141,0357
14	2,60	0,0611	2,35	82,20	-	14,0011
17	1,99	0,0892	4,48	63,38	-	26,8248
24	2,19	0,0915	4,18	69,75	-	15,0105
30	2,53	0,0961	3,79	80,57	-	7,2015
44	1,76	0,0818	4,65	56,05	-	13,1574

$$r = -0,2039$$

$$y = 0,26x + 58,98$$

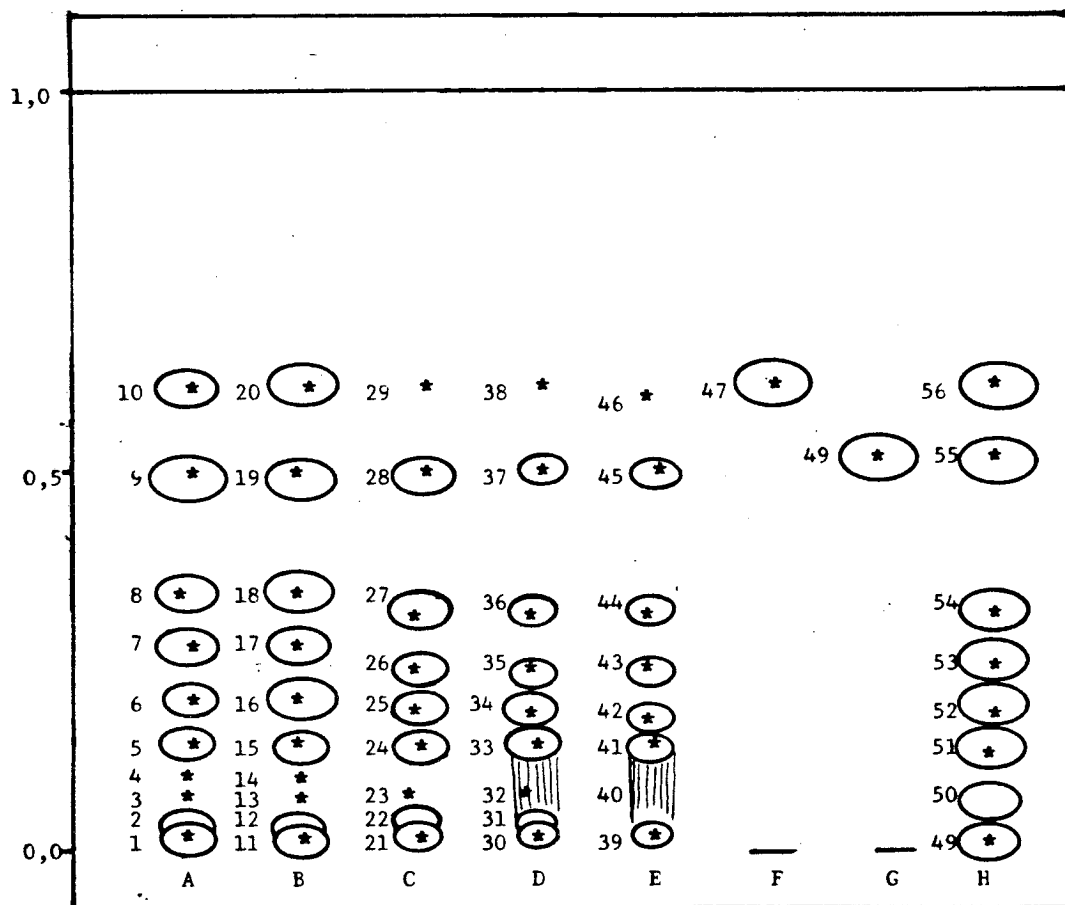


FIGURA 22 - Cromatografia do extrato padronizado submetido a 30°C, em função do tempo de exposição. Sistema IV. Detecção no UV365nm e com agente cromogênico R1 (* Tabela 56). A. 7 dias; B. 14 dias; C. 24 dias; d. 30 dias; E. 44 dias; F. Catequina padrão; G. Epicatequina padrão; H. Dia zero.

TABELA 56 - Comportamento cromatográfico de substâncias detectadas no extrato padronizado de *M. ilicifolia* a 30°C. Detecção: UV_{365nm} e agente cromogênico R1, (+) Sombra no UV_{365nm}.

MANCHA Nº	Rf.	CORES NO UV _{365 nm}	CORES APÓS R1	MANCHA Nº	Rf.	CORES NO UV _{365 nm}	CORES APÓS R1
1	0,00	+	Rosa	29	0,59	-	Rosa forte
2	0,03	Azul fluorescente	-	30	0,00	+	Rosa
3	0,05	-	Rosa forte	31	0,03	Azul fluorescente	-
4	0,05	-	Rosa forte	32	Cauda	Marron claro	Rosa claro
5	0,15	+	Amarelo sujo	33	0,13	Marron	Amarelo sujo
6	0,15	+	Amar. sujo	34	0,18	Marron	Amarelo sujo
7	0,24	+	Rosa forte	35	0,23	Marron	Rosa
8	0,32	+	Rosa forte	36	0,32	+	Rosa forte
9	0,48	+	Rosa forte	37	0,48	+	Rosa forte
10	0,60	+	Rosa forte	38	0,59	-	Rosa
11	0,00	+	Rosa claro	39	0,00	+	Rosa
12	0,03	Azul fluorescente	-	40	Cauda	Marron claro	-
13	0,05	-	Rosa forte	41	0,13	Marron	Amarelo sujo
14	0,05	-	Rosa forte	42	0,18	Marron	Amarelo sujo
15	0,13	+	Amar. sujo	43	0,23	+	Rosa
16	0,18	+	Amar. sujo	44	0,32	+	Rosa forte
17	0,24	+	Rosa forte	45	0,48	+	Rosa forte
18	0,32	+	Rosa forte	46	0,58	-	Rosa forte
19	0,48	+	Rosa forte	47	0,60	+	Rosa forte
20	0,60	+	Rosa forte	48	0,49	+	Rosa forte
21	0,00	+	Rosa claro	49	0,00	+	Rosa forte
22	0,03	Azul fluorescente	-	50	0,03	Azul fluorescente	-
23	Cauda	+	Rosa claro	51	0,13	+	Rosa
24	0,12	+	Amar. sujo	52	0,18	+	Rosa
25	0,17	+	Amar. sujo	53	0,24	+	Rosa
26	0,23	+	Rosa forte	54	0,33	+	Rosa
27	0,30	+	Rosa forte	55	0,48	+	Rosa forte
28	0,49	+	Rosa forte	56	0,60	+	Rosa forte

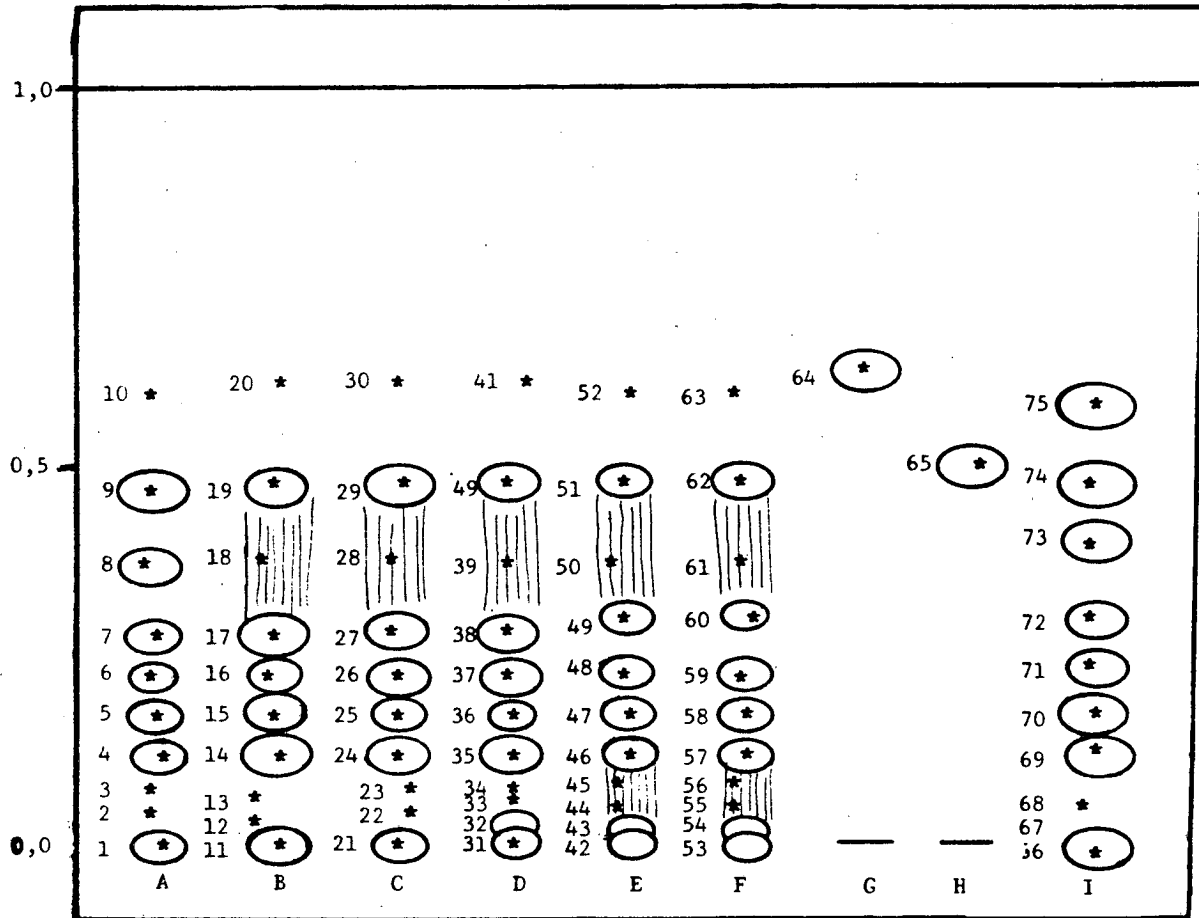


FIGURA 23 - Cromatografia do extrato padronizado de *M. ilicifolia* submetido à temperatura de 40°C. Sistema IV. A. 7 dias; B. 14 dias; C. 17 dias; D. 24 dias; E. 30 dias; F. 44 dias; G. Catequina padrão; H. Epicatequina padrão; I. Dia zero. Detecção UV365nm, agente cromogênico R1 (* Tabela 57).

TABELA 57 - Comportamento cromatográfico das substâncias detectadas no extrato padronizado de *M. ilicifolia* exposto à temperatura de 40°C (+) Sombra no UV365nm.

MANCHA Nº	Rf.	CORES NO UV365 nm	CORES APÓS R1	MANCHA Nº	Rf.	CORES NO UV365 nm	CORES APÓS R1
1	0,00	Azul Fluoresc.	Rosa forte	41	0,63	-	Amarelo sujo
2	0,05	-	Rosa forte	42	0,00	Amarelo	-
3	0,09	-	Rosa forte	43	0,03	Azul fluorescente	-
4	0,12	+	Amarelo sujo	44	0,05	-	Rosa forte
5	0,16	+	Amarelo sujo	45	Cauda	-	Rosa claro
6	0,22	+	Amarelo sujo	46	0,14	+	Amarelo sujo
7	0,29	+	Rosa forte	47	0,18	+	Amarelo sujo
8	0,38	+	Rosa forte	48	0,23	+	Amarelo sujo
9	0,48	+	Rosa forte	49	0,30	+	Rosa forte
10	0,63	-	Rosa forte	50	Cauda	+	Rosa claro
11	0,00	Azul fluorescente	Rosa forte	51	0,49	+	Rosa forte
12	0,05	-	Rosa forte	52	0,62	+	Rosa forte
13	0,08	-	Rosa forte	53	0,00	Marron	-
14	0,12	+	Amarelo sujo	54	0,03	Azul fluorescente	-
15	0,16	+	Amarelo sujo	55	0,05	+	Rosa forte
16	0,21	+	Amarelo sujo	56	Cauda	+	Rosa claro
17	0,28	+	Rosa forte	57	0,14	+	Amarelo sujo
18	Cauda	+	Rosa forte	58	0,19	+	Amarelo sujo
19	0,48	+	Rosa forte	59	0,24	+	Amarelo sujo
20	0,61	-	Rosa forte	60	0,30	+	Rosa forte
21	0,00	Azul fluorescente	Rosa forte	61	Cauda	+	Rosa claro
22	0,05	-	Rosa forte	62	0,48	+	Rosa forte
23	0,09	-	Rosa forte	63	0,61	+	Rosa forte
24	0,12	+	Amarelo sujo	64	0,62	+	Rosa forte
25	0,17	+	Amarelo sujo	65	0,48	+	Rosa forte
26	0,22	+	Amarelo sujo	66	0,00	+	Rosa forte
27	0,29	+	Rosa forte	67	0,03	+	-
28	Cauda	+	Rosa forte	68	0,08	-	Rosa forte
29	0,48	+	Rosa forte	69	0,13	+	Amarelo sujo
30	0,63	+	Rosa forte	70	0,18	+	Amarelo sujo
31	0,00	Marron claro	Rosa	71	0,23	+	Amarelo sujo
32	0,03	Azul fluorescente	-	72	0,30	+	Amarelo sujo
33	0,05	-	Rosa forte	73	0,42	+	Amarelo sujo
34	0,09	-	Rosa forte	74	0,48	+	Amarelo sujo
35	0,15	+	Amarelo sujo	75	0,57	+	Amarelo sujo
36	0,17	+	Amarelo sujo				
37	0,22	+	Amarelo sujo				
38	0,29	+	Rosa forte				
39	Cauda	+	Rosa claro				
40	0,48	+	Rosa forte				

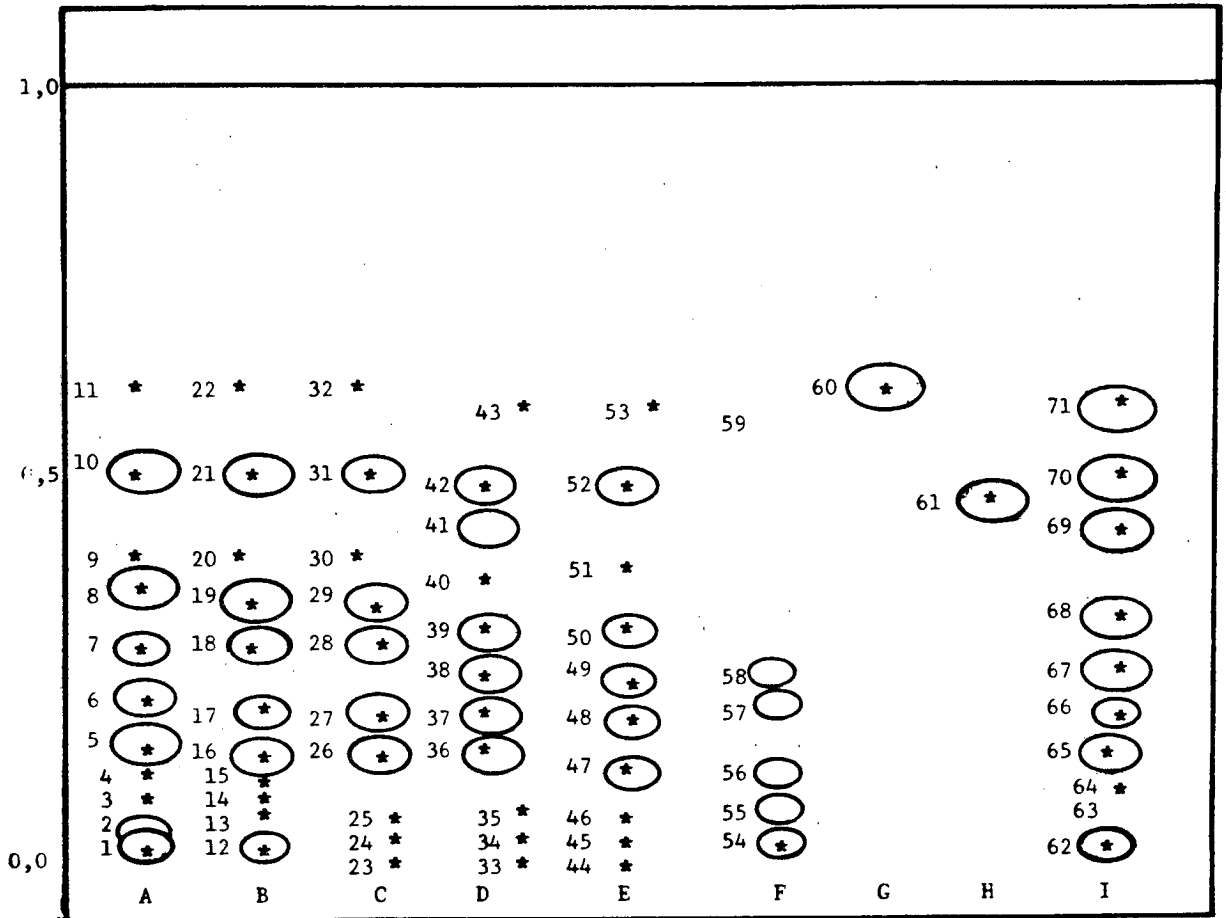


FIGURA 24 - Cromatografia do extrato padronizado de *M. ilicifolia* submetido à 60°C. Sistema IV. A. 7 dias; B. 14 dias; C. 17 dias; D. 24 dias; E. 30 dias; F. 44 dias; G. Catequina padrão; H. Epicatequina padrão; I. Dia zero. Detecção: UV365nm; agente cromogênico R1 (* Tabela 58).

TABELA 58 - Comportamento cromatográfico das substâncias detectadas no extrato padronizado de *M. ilicifolia* exposto à temperatura de 60°C (+) Sombra no UV.

MANCHA Nº	Rf	UV ₃₆₅ nm	R1	MANCHA Nº	Rf	UV ₃₆₅ nm	R1
1	0,00	+	Marron	38	0,22	+	Amarelo sujo
2	0,02	Azul fluoresc.	-	39	0,28	+	Amarelo sujo
3	0,06	-	Rosa forte	40	Cauda	Azul fluoresc.	Rosa claro
4	0,07	-	Rosa forte	41	0,43	+	-
5	0,14	+	Amarelo sujo	42	0,47	+	Rosa forte
6	0,19	+	Rosa forte	43	0,58	-	Rosa forte
7	0,24	+	Rosa forte	44	0,00	+	Marron
8	0,33	+	Rosa forte	45	0,03	+	Rosa claro
9	Cauda	Azul fluoresc.	Rosa forte	46	0,07	+	Rosa claro
10	0,50			47	0,10	+	Amarelo sujo
11	0,62	-	Rosa forte	48	0,17	+	Amarelo sujo
12	0,00	+	Marron	49	0,21	+	Amarelo sujo
13	0,01	Azul fluoresc.	-	50	0,29	+	Amarelo sujo
14	0,04	-	Rosa forte	51	Cauda	Azul fluoresc.	Rosa claro
15	0,08	-	Rosa forte	52	0,46	+	Rosa forte
16	0,12	+	Amarelo sujo	53	0,58	+	Rosa forte
17	0,17	+	Rosa forte	54	0,00	Marron	Marron escuro
18	0,23	+	Rosa forte	55	0,04	+	-
19	0,31	+	Rosa forte	56	0,11	+	-
20	Cauda	Azul fluoresc.	Rosa claro	57	0,18	+	-
21	0,48	+	Rosa forte	58	0,22	+	-
22	0,60	-	Rosa forte	59	Cauda	Azul fluoreasc. até Rf	-
23	0,00	Marron	Marron	60	0,59	+	Rosa forte
24	0,04	Marron caramelo	Rosa forte	61	0,44	+	Rosa forte
25	0,09	Marron caramelo	Rosa forte	62	0,00	+	Rosa forte
26	0,13	+	Amarelo sujo	63	0,05	+	-
27	0,17	+	Amarelo sujo	64	0,08	-	Rosa forte
28				65	0,13	+	Amarelo sujo
29	0,31	+	Rosa forte	66	0,18	+	Amarelo sujo
30	Cauda	Azul fluoresc.	Rosa claro	67	0,23	+	Rosa forte
31	0,49	+	Rosa forte	68	0,30	+	Rosa forte
32	0,59	-	Rosa forte	69	0,42	+	Rosa forte
33	0,00	+	Marron	70	0,48	+	Rosa forte
34	0,04	Marron caramelo	Rosa forte	71	0,57	+	Rosa forte
35	0,08	Marron caramelo	Rosa claro				
36	0,12	+	Amarelo sujo				
37	0,17	+	Amarelo sujo				

DISCUSSÃO

Várias plantas medicinais são comercializadas no Brasil sob o nome popular de cancerosa, cancorosa, espinheira santa, coromilho do campo (SIMÕES e col., 1986; COIMBRA e SILVA, 1958), algumas vezes é *Maytenus ilicifolia*, outras, são espécies pertencentes ao gênero *Maytenus*. Confusões mais sérias ocorrem com espécies de famílias bem distintas como é o caso de *Iodina rhombifolia* (Santalaceae), *Sorocea bonplandii* (Moraceae) e *Citronella gongonha* (Icacinaceae). Assim fez-se necessário a caracterização botânica assessorada pela química e cromatográfica.

Após estudos farmacológicos desenvolvidos com *M. ilicifolia* a Central de Medicamentos (CEME) a coloca como parte do arsenal terapêutico disponível, desconsiderando os problemas da identificação da droga. A descrição de LOURTEIG (1955) é a mais completa e ainda insuficiente, já que para identificação botânica faz-se necessário coletar em período de floração e a indústria fitoterápica tem necessidade de coletar a droga o ano todo. Aliado a isto, não existe monografia de *M. ilicifolia* na Farmacopéia Brasileira. Assim optou-se, neste trabalho, por comparar *Maytenus ilicifolia* através das folhas (Tabela 5), seguindo a descrição botânica de LOURTEIG (1955), e para as outras espécies as descrições de CABRERA (1965), MIQUEL (1965-7) e, dentro

das possibilidades, fornecer subsídios farmacognósticos para IV Edição da Farmacopéia Brasileira.

Segundo a descrição de LOURTEIG (1955) para *M. ilicifolia* (Tabela 5), a amostra de *Iodina rhombifolia* poderia ser descartada face as diferenças significativas quanto ao número de pares de espinhos e ao formato losangular da folha. A *Soroceae bonplandii* pela textura quebradiça da folha e por apresentar gêmulas axiais no pendúculo.

As amostras M1, M2 e M3 apresentam grande semelhança com *M. ilicifolia*, com pequenas diferenças quanto ao número de pares de espinhos e comprimento da folha, as quais poderiam ser atribuídas às variações climáticas. Estas amostras após análise botânica (Departamento de Botânica - UFRGS), foram identificadas no gênero *Maytenus*.

A caracterização anatômica é um recurso que leva a um reconhecimento da droga, através de cortes transversais no material, utilizando as estruturas características como pontos de identificação e diferenciação.

Com relação a droga *M. ilicifolia* há dois relatos, um mais antigo (BERNARDI & WASICKY, 1959) e outro mais recente (NAKAYMA & AKISUE, 1988). Através da análise anatômica (Figuras 1, 2 e 3) foi possível comprovar a descrição de BERNARDI & WASICKY (1959), sendo que as três camadas do parênquima paliçádico e as células do parênquima esponjoso caracterizam a droga *M. ilicifolia*.

BERNARDI e WASICKY (1959) descrevem ainda um parênquima medular, o qual não foi observado na droga em estudo, porém estu-

dos anatômicos anteriores (CUTTER, 1986), demonstraram que as células parenquimáticas podem apresentar posterior lignificação. A problemática reforça a necessidade de estudos ontogenéticos da droga *Maytenus ilicifolia*.

As informações concernentes à constituição química das folhas de *Maytenus ilicifolia* são limitadas assim tornou-se necessária a caracterização de sua composição química iniciada por um "screening" fitoquímico proposto por MARINI-BÉTTOLO (1971).

O método consiste em reações químicas clássicas, com extratos recém-preparados, com pequenas quantidades da droga, acompanhadas por reações com padrões representantes de grupos estruturais, caracterizando classes de substâncias tais como, antranóides, fenóis, taninóides, cardenolídeos, alcalóides terciários e quaternários, flavonóides,

Em uma segunda etapa, a droga é submetida a um processo de extração seletiva, com solventes de polaridade crescente, associada ao aquecimento (50°C), por curto período e as soluções obtidas são cromatografadas.

Através destes métodos associados observou-se no teste para alcalóides, presença de alcalóides terciários e quaternários, não comprovada na análise cromatográfica (item 3.1.2.5). Tal resultado poderia ser causado por outras substâncias contendo nitrogênio como por exemplo, aminoácidos ou metilxantinas.

Por comparação com as soluções padrões, observou-se reação positiva para substâncias polifenólicas ao reagir a solução com cloreto férrico (item 2.2.3.1.3) e observou-se precipitação ao adicionar solução de gelatina, indicando a presença de

taninóides (2.2.3.1.5). Na análise cromatográfica, pode-se notar comportamento semelhante a substância padrão (Figura 4), desenvolvendo coloração rosa forte após nebulização com agente cromogênico R1, indicativo da presença de derivados catéquicos (MARKHAN, 1982).

O resultado positivo do extrato frente a adição de magnésio e ácido clorídrico (reação de Shinoda), sugere a presença de flavonóides. Este resultado foi confirmado após cromatografia da solução C (Figura 6).

Foi observada reação negativa para os testes de antra-nóides e cardenolídeos.

O teste índice da espuma, realizado para detectar saponinas, não permitiu assegurar sua presença. A pequena sensibilidade deste teste pode também fornecer falso-negativo, devida a baixa concentração destas substâncias. Na análise cromatográfica pode-se, no entanto, observar uma mancha com comportamento semelhante ao padrão de saponina (Figura 5). O resultado negativo no teste do índice de hemólise também não contribuiu para dirimir a dúvida, pois, pode ser interpretado como simples ausência de saponinas hemolíticas.

Após realizadas as análises propostas por MARI-NI-BÉTTOLO, pode-se constatar que apenas as substâncias em concentração considerável são detectadas. Provavelmente isto se deva ao restrito período de contato da droga e o líquido extrator, não permitindo traçar um perfil químico mais completo.

A cromatografia em camada delgada possibilita isolamen-

to de substâncias e em muitos casos na identificação das mesmas, garantindo assim seu espaço como método analítico.

Várias espécies do gênero *Maytenus* e mesmo da família *Celastraceae*, têm sido estudadas objetivando encontrar grupo de substâncias triterpênicas pentacíclicas quinonóides, com potente ação anticâncer. LIMA (1971) comprova a presença de maitenina e pristimerina em raízes e CAMPANELLI (1980) relata a maitenina em folhas de *M. ilicifolia* em concentração entre 1,66-1,80%.

Foi tentado reproduzir os métodos de identificação deste grupo de substâncias desenvolvidos por DELLE MONACHE (1976) e LIMA (1971), não logrando êxito devido a presença de carotenóides em proporções consideráveis e com Rf muito próximos. Na Figura 8, observa-se a existência de manchas amarelas com Rf 0,12; 0,23; 0,64 e 0,76 - separadas por clorofilas que ao serem nebulizadas com cloreto de antimônio (R3), passam a azul, indicativo de substâncias carotenóides (BÖLLIGER, 1969; MACEK, 1972) e outras com Rf 0,38 e 0,63, passam a rosa violeta, característico de substâncias triterpênicas pentacíclicas (BÖLLINGER, 1969). A mancha de Rf 0,76 se diferencia em duas manchas, sendo que a superior adquire coloração azul e a inferior passa a rosa violeta frente a R3, indicando que a substância triterpênica se encontra muito próxima ou sobreposta por um carotenóide. Pode ser observado que estas substâncias sofrem alterações com a secagem da droga, por exemplo, as que apresentam Rf 0,12 e 0,38 desaparecem, com Rf 0,23 apresentam alteração de cor, detectável após nebulização com R3.

Devido a instabilidade das substâncias amarelas (desaparecimento da cor) observada durante a execução da cromatogra-

fia sobre camada delgada foram direcionados os estudos para outro grupo de substâncias, sendo que este acima estudado, pode ser auxiliar na caracterização da droga *M. ilicifolia*.

Através do "screening" detectou-se a presença de derivados catéquicos e optou-se por traçar o perfil cromatográfico com este grupo de substâncias, devido ser majoritário na planta e considerando a sugestão de CARLINI et alii (1988), que seja responsável pela ação antiúlcera. Na Figura 9, pode se visualizar os derivados catéquicos, que ao entrar em contato com R1 adquirem coloração rosa forte (manchas nº 1, 3, 5, 7, 9, 11), sendo que, as manchas com Rf próximo a 0,32 apresentam comportamento cromatográfico semelhante ao observado com a catequina (mancha nº 13) (RIBÉREAU-GAYON, 1968). A presença de outras substâncias no ponto de aplicação, evidencia a necessidade de melhorar a migração das substâncias, apesar de alguns derivados catéquicos se apresentarem em destaque no cromatograma.

Embora a cromatografia em papel utilizando como fase móvel, ácido acético em várias concentrações (sistema IX, Figura 10a), seja preconizada na literatura para análise de taninos (HASLAN, 1976; RIBÉREAU-GAYON, 1968), não apresentou resolução aceitável para o extrato hidroalcoólico de *M. ilicifolia*.

A alteração da fase estacionária para celulose (Figura 10b) mantendo o sistema eluente, melhorou a resolução, com coincidência de comportamento entre os padrões de catequina e epicatequina com as manchas nº 6 e 12, respectivamente.

Já no sistema IV, na Figura 10c, obteve-se perfil com manchas bem resolvidas, em número de 12. O emprego destas man-

chas com comportamento bem definido, frente aos sistemas de detecção (UV₃₆₅, vapores de amônia/UV₃₆₅, R1 e R4), permite uma avaliação segura. Para tanto, foram escolhidas as manchas com Rf entre 0,6-0,9 (derivados catêquicos), como substâncias marcadoras, estando entre outras, a catequina e epicatequina. As manchas de Rf 0,11 e 0,16 apresentam comportamento semelhante aos flavonóides frente a R1 e R4 (MABRY, MARKHAN & THOMAS, 1970).

Na Figura 11, observa-se a presença dos derivados catêquicos no ponto de aplicação e entre Rf 0,5-0,9. As substâncias com comportamento de flavonóides se encontram com Rf entre 0,1 e 0,5. Neste sistema cromatográfico, embora não se consiga diferenciar catequina e epicatequina, há um perfil bem estabelecido, reproduzível e facilmente executável. Pode-se ainda detectar que o solvente extrator pouco influi quanto a variação do perfil, com surgimento de duas manchas (nºs 11 e 18) para solução hidroalcoólica e apenas uma mancha (nº 25) quando o líquido extrator é água.

Ao se comparar o extrato de *Maytenus ilicifolia* com extratos alcoólicos e hidroalcoólicos das amostras fornecidas como espinheira santa M1, M2 e M3, *Sorocea bonplandii*, *Iodina rhombifolia* e *Citronella gongonha* (Figura 9) e A1, A2, A3 (figuras, 12 e 13), observou-se a ausência das manchas correspondentes aos derivados catêquicos, bem como das substâncias que adquirem cor amarelo sujo após nebulização com R1, característicos de *M. ilicifolia* (Tabelas 14 e 15), diferenciando quimicamente das drogas *S. bonplandii*, *I. rhombifolia*, *C. gongonha*, M1, M2 e M3.

O mesmo resultado foi obtido quando avaliadas três tin-

turas adquiridas no comércio de Porto Alegre. Para esta avaliação foi utilizado extrato mais concentrado (20% da droga), objetivando atender especificações de códigos oficiais (NATIONAL FORMULARY, 1975) para o preparo de tinturas e observar quaisquer alterações provenientes das tinturas analisadas. Na Figura 13, pode-se observar a manutenção do perfil cromatográfico (sistema I) traçado (manchas de 1-9) anteriormente para *M. ilicifolia* indicando que o aumento da droga não favoreceu a detecção de novos constituintes. Com relação às tinturas em análise, a denominada T1 apresentou um perfil cromatográfico diferenciado do observado para *M. ilicifolia*, sem as manchas correspondentes aos derivados catêquicos e sim outras com características bem diversas, sugerindo que a referida tintura não contém a droga *M. ilicifolia*. Já as tinturas T2 e T3, após nebulização com R1, apresentaram coloração rosa claro, indicativo de baixa concentração dos derivados catêquicos ou mistura de outros farmacógenos de *M. ilicifolia* ou ainda de outras drogas.

O agente cromogênico vanilina em meio ácido (R1) quando em contato com polifenóis tipo flavonóides que contenham o anel A ativado ou seja, não tenham grupamento carbonílico na posição 4, reage com os substituintes em C6 ou C8, desenvolvendo coloração vermelha (RIBÉREAU-GAYON, 1968).

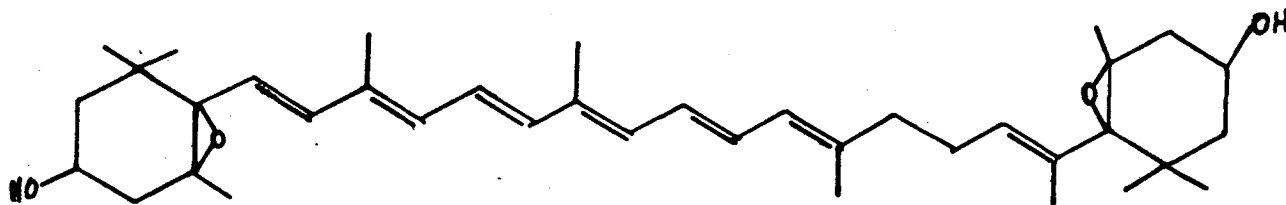
Vale ressaltar que, após testar os vários sistemas cromatográficos, observa-se melhor resolução das manchas no sistema I, com grupos distribuídos em três pontos, uma mancha próxima ao ponto de aplicação, entre Rf 0,45 e 0,55, duas manchas geminadas e entre 0,65 e 0,95 há quatro a cinco manchas bem resolvidas. Este sistema só poderia ser comparado e mesmo suplantado pelo sistema IV, que tem um suporte (celulose) de custo maior. Estes

dois sistemas fornecem perfis cromatográficos bem resolvidos para caracterização da droga, pois evidenciam os derivados catêquicos e flavonoídicos, com grande reprodutibilidade. O sistema IV seria mais indicado quando se tenha interesse em separar catequina de epicatequina, as quais no sistema I provavelmente estão sobrepostas.

Durante o processo de padronização da droga foram isoladas substâncias que podem juntas servir de referencial para sua caracterização (itens 3.1.5.2.1 e 3.1.5.2.2).

A primeira substância denominada M1, apresentando coloração amarelo forte no visível, sombreado no ultravioleta, solúvel em solventes orgânicos apolares como clorofórmio, hexano, éter e polares como etanol e metanol. Ao reagir com ácido sulfúrico e cloreto de antimônio adquirem cor azul escura.

Segundo MACEK (1972) e BÖLLIGER (1969) estas características sugerem ser a substância um carotenóide. O espectro no visível (Figura 19) mostra a probabilidade da substância pertencer ao grupo das xantofilas. Os máximos no ultravioleta coincidem com os relatos da literatura para violanxantina (HARBORNE, 1984).



VIOLAXANTINA

Outra substância isolada, denominada M2, apresentando cor amarelo pálido no visível e amarelo fluorescente no ultravioleta (365nm), intensificando sua cor após exposição aos vapores de amônia. Os máximos no ultravioleta estão apresentados na Tabela 21, observando-se que após adição de cloreto de alumínio e ácido clorídrico, apresentam diminutos desvios hipo e hiper-crômico, respectivamente (Figura 20). O comportamento no ultravioleta desta substância sugere substância flavonoídica do grupo flavonol ou isoflavona (MABRY, MARKHAM e THOMAS, 1970).

O teor extrativo (TE) objetiva a determinação quantitativa das substâncias extraídas sob condições pré-fixadas, tais como, escolha do solvente, método de extração e tempo de contato da droga com o líquido extrator.

A falta de especificidade do TE para quantificar as substâncias existentes na droga, leva a desenvolver e/ou fixar metodologias específicas, neste caso, para substâncias taninóides, utilizando método colorimétrico com pó de pele cromada descrito por BÖHME & HARTKE (1976).

A determinação de taninos condensados (taninos totais - TT e tanantes - T), foi validada pelo doseamento da droga ratânia (*Krameria argentea*) cuja monografia da Farmacopéia Francesa IX (FARMACOPEE FRANÇAISE, 1976), preconiza 15-20% de taninos totais e Taninos SETA (Sociedade Extrativa de Taninos de Acácia - Estância Velha - RS), apresenta 94% de taninos totais, constituído por 72% de fração tanante e 22% de fração não-tanante.

Na Tabela 28, observa-se que para a droga ratânia, o valor obtido se encontra dentro das especificações da Farmaco-

péia Francesa. Com relação aos taninos SETA, foram observados valores diferentes dos descritos pelo fornecedor, apresentando sensível diminuição no teor de taninos totais (TT) e dos não-tanantes (NT), com um leve aumento no valor dos tanantes (T). Esta variação poderia ser devida ao aquecimento que os taninos SETA foram submetidos objetivando igualar o tratamento dado para as drogas *M. ilicifolia* e ratânia. Além disso, há a possibilidade de apresentar diferenças, pelas metodologias de quantificação serem distintas. Este aquecimento pode levar a uma oxidação das substâncias não-tanantes em maior proporção e em seguida a polimerização, haja visto que, o método de quantificação utiliza de uma reação de oxidação entre os ácidos fosfotúngstico e fosfomolibídico com as estruturas fenólicas dos derivados catéquicos. Se a estrutura já se encontra oxidada pelo calor, obviamente haverá resultado inferior ao obtido pelo fabricante.

Ainda na Tabela 28, pode ser observado o alto coeficiente de variação para as determinações de NT, para os taninos SETA, para a ratânia e para *Maytenus ilicifolia*. Isto indica a falta de reprodutibilidade no método para esta fração, prejudicando sua avaliação quantitativa.

A relação entre TE e TT é de 1,6 (conforme tabela abaixo), ou seja, mais da metade das substâncias extraídas no teste teor extrativo é constituída por substâncias polifenólicas, possivelmente taninos condensados (Tabelas 26 e 29). Esta análise

TE	TT (1g droga)	TE/TT
24,10	16,37	1,6

foi obtida elevando a quantidade de TT a 1g de planta para possibilitar a comparação com TE.

Após a caracterização botânica e química da droga, há necessidade de estabelecer critérios de caracterização tecnológica, bem como propor uma forma farmacêutica derivada, ou como produto intermediário de formulações como pomadas, cremes, elixires, xaropes. Para tanto, fez-se necessário em outra etapa, o desenvolvimento galênico, avaliar fatores tais como estabilização da droga, granulometria, quantificações e condições de extração que poderiam influir na qualidade do produto obtido.

A necessidade de estabilizar a droga vegetal, as vantagens e desvantagens dos diversos métodos, foram descritos por diversos autores (PARIS, 1980; HELMAN, 1980; MENßEN, 1979; NGUYEN-HIÊP, 1964; VOIGT, 1982). Neste trabalho foi utilizado o método proposto por NGUYEN-HIÊP (1964), com temperatura fixa a 40°C, em estufa de ar circulante. Esta temperatura foi escolhida em função do desconhecimento dos constituintes ativos da droga e de sua sensibilidade às variações de temperatura.

O acompanhamento da eficiência de estabilização foi realizado pela determinação da perda por secagem (PS) em função do tempo (Figura 25).

A Figura 25, mostra a elevação da PS até o 6º dia, estabilizando o valor nos dias subsequentes demonstrando que a secagem após o 6º dia é desnecessária (Tabela 22).

A perda por secagem (PS) apesar de não ser um método estabelecido nos códigos oficiais, tem grande utilidade como método tecnológico. Já a perda por dessecação (PD) é preconizada

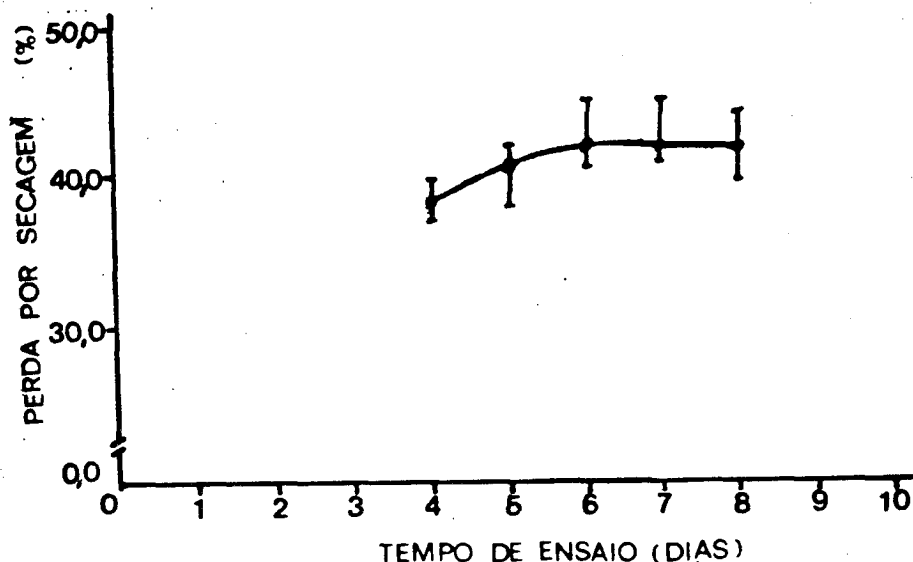


FIGURA 25 - Perda por secagem das folhas de *M. ilicifolia* mantidas em estufa de ar circulante a 40°C, em função do tempo.

em Farmacopéias e determina a perda por evaporação das substâncias voláteis, não sendo específica para a água.

A maior perda pela ação do calor obtida durante a secagem à baixa temperatura, pode ser explicada pela melhoria da evaporação auxiliada pela circulação de ar. Já a 105°C (Figura 26) o aquecimento elevado pode levar ao fechamento dos poros, impedindo a saída de água dos mesmos. A dessecação da droga ocorre três horas após submetê-la ao aquecimento.

Embora PD e PS apresentem valores diferenciados, maiores para PS, não significa maior eficiência, visto que as duas avaliações foram realizadas sob condições diversas (como rasuramento ou não das folhas, tempo de contato em um ou outro método). Para tanto, seria necessário avaliar a estabilidade dos

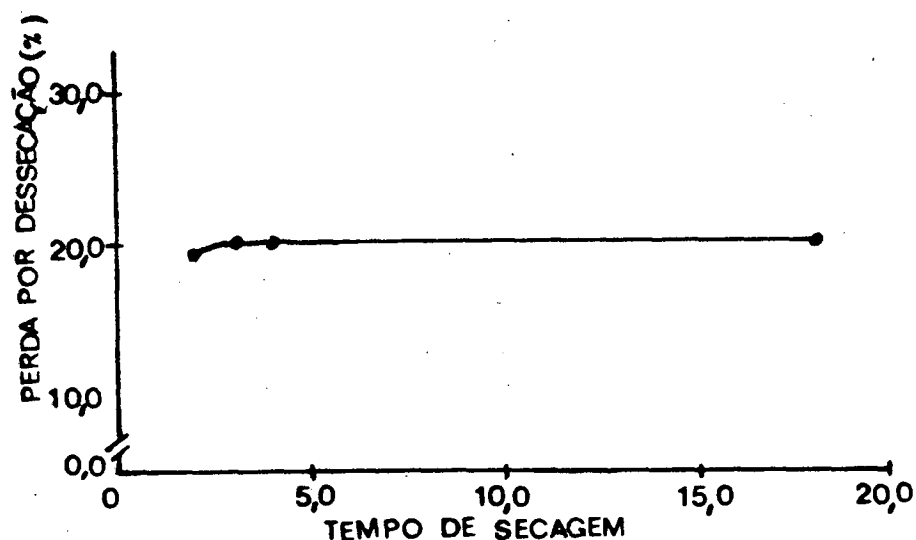


FIGURA 26 - Perda por dessecação (PD) das folhas de *M. ilicifolia* a 105°C em função do tempo de ensaio.

constituíntes frente aos dois métodos, não sendo no momento objetivo deste trabalho.

A variação entre o teor de extrativos das folhas frescas e secas, tendo significância estatística ($\alpha = 0,05$), sendo o maior valor para as folhas frescas, indicando talvez que a secagem promova a liberação de substâncias voláteis. No cromatograma (Figura 5) comparativo entre folhas frescas e secas mostram o desaparecimento de algumas manchas, conforme discutido anteriormente.

A necessidade de estabelecer o parâmetro granulométrico vem de encontro com o objetivo de uma maior extração.

VOIGT (1980) mostra a necessidade de rasurar a droga para que ocorra uma melhor extração, devido a droga não-rasurada apresentar volume grande, com pequena superfície de contato, mas pequena superfície específica, o que dificultaria a penetração

do líquido extrator em toda a droga. Observa, porém, o problema da baixa granulometria (finos), promover a retenção de substâncias ativas aos constituintes celulares por adsorção, dificultando a separação destas pelo líquido extrator.

Esta importância obriga a caracterizar a distribuição granulométrica da droga, com objetivo de padronizar sua tecnologia.

A análise granulométrica da droga rasurada caracterizou este produto intermediário, como compreendido entre as faixas de 0-1,250mm, sendo as classes granulométricas ponderais predominantes àquelas contidas entre tamises 0,800 a 0,071mm (82,9% do total) conforme pode ser visualizado na Figura 27.

A curva característica de retenção (R) e passagem (P) (Figura 28) complementa através das determinações do ângulo de inclinação da reta e da granulometria ponderal média a qualificação da droga (3.1.7).

O TE obtido (Tabela 26) comparando a droga rasurada sem seleção granulométrica e uma faixa granulométrica selecionada (0,800-0,315mm), mostra que para folhas de *M. ilicifolia*, a seleção granulométrica favorece (7,63%) o rendimento de extração significativamente ($\alpha = 0,05$).

Embora já tivesse esta informação, optou-se por trabalhar com a droga toda, pois como pode-se observar na Tabela 24, há apenas cerca de 35% da droga nesta faixa granulométrica, implicando em eliminar dois terços do material vegetal, com grande perda.

A tentativa de deslocar-se a distribuição granulométrica

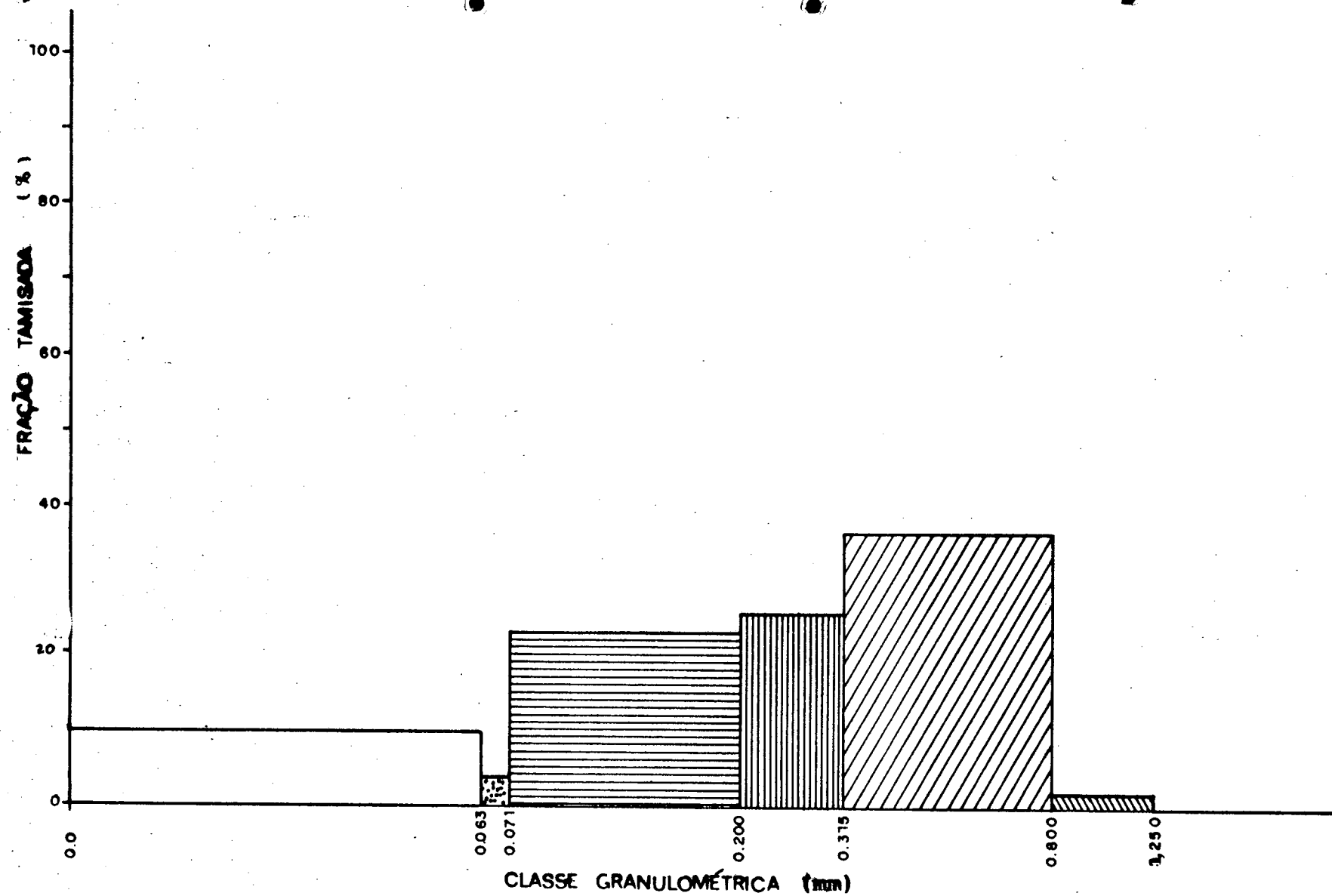


FIGURA 27 - Histograma da distribuição granulométrica da droga rasurada.

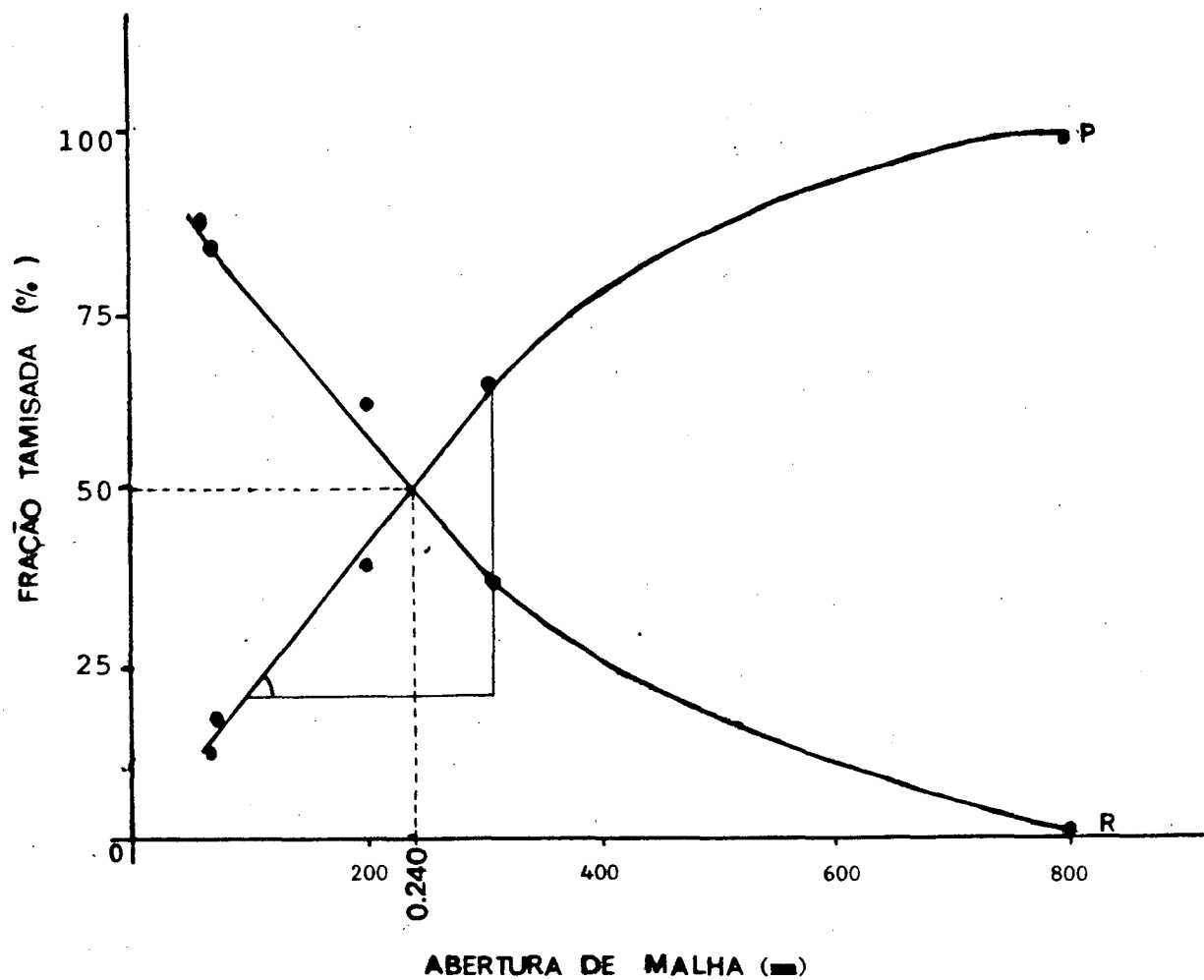


FIGURA 28 - Curvas acumulativas de retenção (R) e passagem (P) após tamisação da matéria-prima vegetal.

ca para obtenção de partículas maiores não apresentou resultados satisfatórios, já que 70% da droga ficou retida no tamis 2.000 μ m. Responsável por este resultado, foi a própria estrutura da folha, de consistência coriácea, com nervuras resistentes ao impacto, pouco friáveis e de alta maleabilidade.

Utilizando como critério de estabilidade da droga com o decorrer do tempo de armazenamento, o teor extrativo, observa-se que há um acréscimo nos valores deste (Figura 29), com o decorrer do tempo (Tabela 27), sugerindo que com o tempo de armazenamento há liberação de substâncias voláteis.

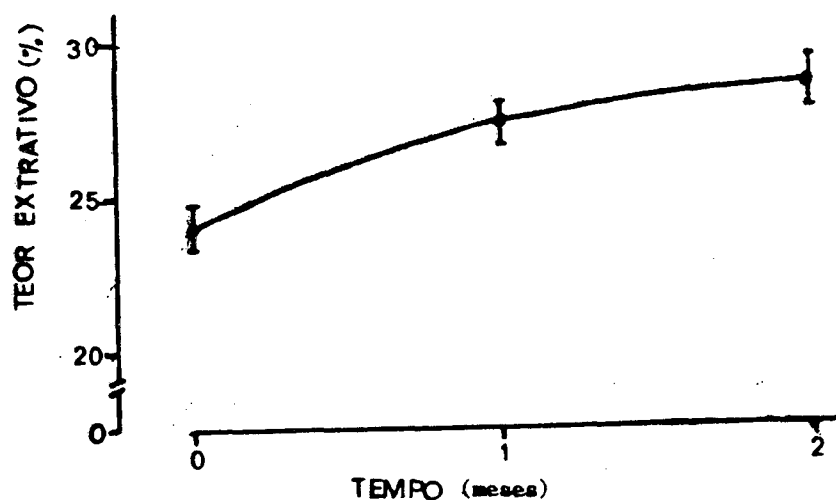


FIGURA 29 - Análise da estabilidade da droga através do teor extrativo (TE) em função do tempo de armazenamento.

Os próximos passos na seqüência do desenvolvimento galênico relacionam-se com métodos de extração, bem como com a padronização do extrato. Para tanto, foram estabelecidos inicialmente critérios quanto a extração e as características do extrato a considerar. Neste trabalho com relação ao líquido extrator, para avaliação da qualidade, optou-se pela determinação do pH, já que este é responsável, em parte, pela estabilidade e manutenção da solubilidade dos constituintes, como também pela

aceitação (tolerância) do organismo ao extrato. Estes fatores devem ser bem avaliados quando se propõe uma forma farmacêutica. Outra característica considerada foi a densidade, pois através desta, pode-se obter o teor alcoólico, fator muito importante para avaliação do rendimento extrativo no desenvolvimento galênico. Para o extrato foram avaliados o pH, o resíduo seco (RS), que permite visualizar o rendimento dos vários métodos extrativos e estabelece, associado a técnicas específicas, parâmetros comparativos da extração. Pode avaliar ainda o rendimento da extração de acordo com as características do solvente e da droga.

A variação do pH do mênstruo é diretamente proporcional ao aumento da concentração etanólica (Tabela 35). Na Figura 30, pode ser observado que após contato do mênstruo com a droga, há aumento do pH (cerca de 6,0) para os que contém 50, 60, 70% de etanol e uma diminuição para o etanol 96, indicando que as substâncias contidas na droga *M. ilicifolia*, possuem características tamponantes.

Com relação ao tempo de maceração, observa-se comportamento semelhante entre os macerados obtidos com 5 ou 10 dias, com exceção do macerado obtido com etanol 96%, que apresenta uma variação significativa com 10 dias. Os macerados obtidos com 5 dias, apresentam um pH independente da concentração etanólica (CE), há correlação razoável entre os fatores ($r = 0,7363$), enquanto para 10 dias o pH é dependente da CE, notando-se uma tendência a diminuir o pH com aumento da concentração etanólica (CE), não apresentando correlação entre os fatores ($r = 0,1440$).

O teor alcoólico (TA) das soluções pode ser determinado por vários métodos preconizados nos códigos oficiais, entre

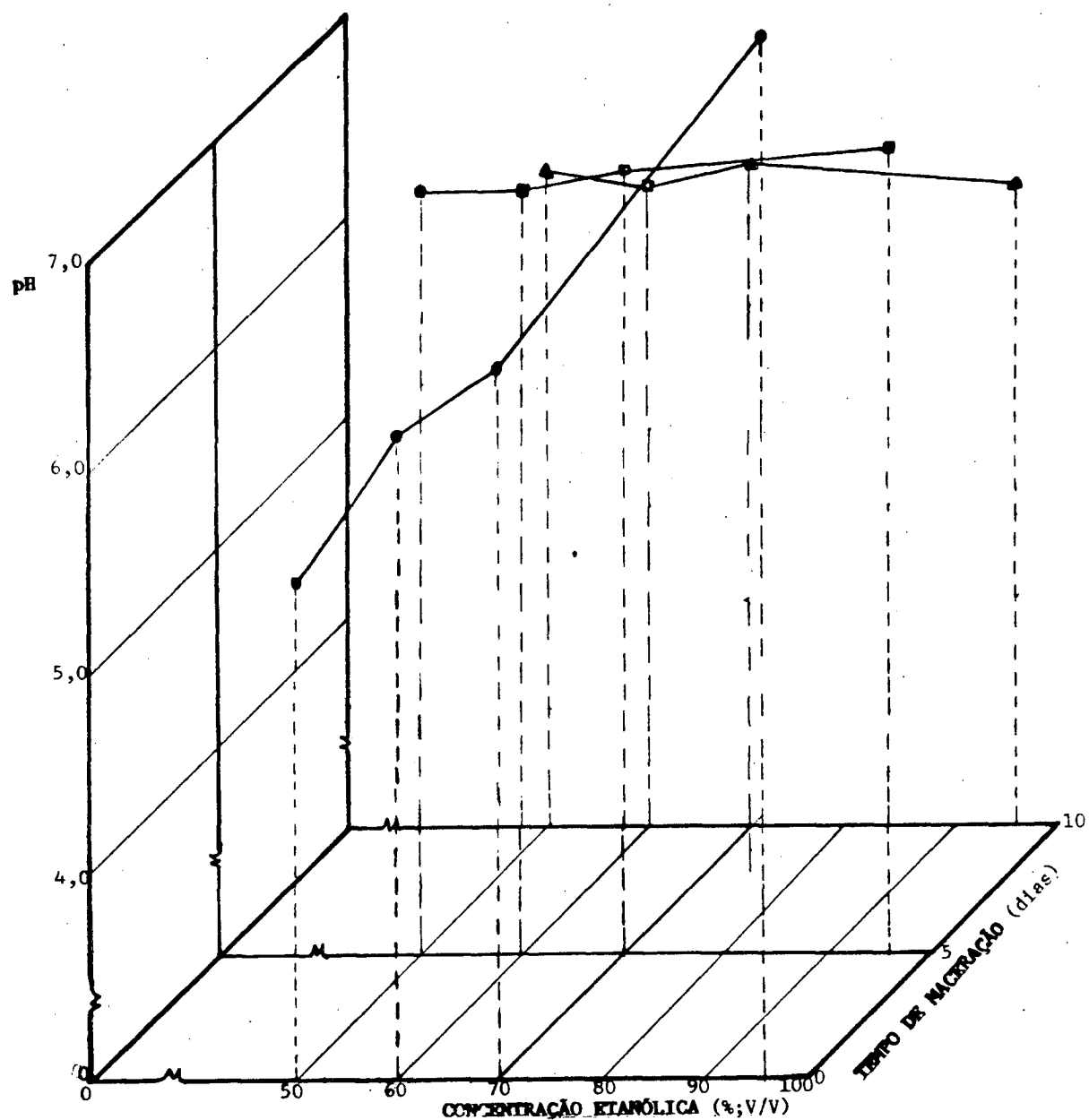


FIGURA 30 - Influência da concentração etanólica (CE) do líquido extrator e tempo de maceração (TM) sobre o pH dos macerados. O TM = 5 dias; Δ TM = 10 dias; \bullet pH do líquido extrator.

eles, pela determinação da densidade utilizando as tabelas alcoométricas.

Para determinar a densidade do extrato, optou-se por comparar o areômetro e o picnômetro, visto que o areômetro apresenta maior rapidez e maior simplicidade, e o picnômetro apresenta maior segurança quanto aos resultados. Constatou-se que a diferença entre os valores das densidades não é estatisticamente significativa ($\alpha = 0,05$). Resultado semelhante foi obtido por MELLO (1989) comparando os densímetros, alcoômetro de Gay-Lussac e areômetro.

O teor alcoólico (TA) dos macerados obtidos com etanol nas várias concentrações (50, 60, 70 e 96%), nos dois tempos de contato entre o líquido extrator e a droga, acompanham a concentração etanólica do mênstruo (Figuras 31 e 32). No entanto, observa-se que os TA dos macerados com 5 dias estão significativamente ($\alpha=0,05$) mais próximos da concentração etanólica teórica do que os maderados com 10 dias de contato. Somente os valores com etanol 60% apresentam comportamento diferenciado.

O resíduo seco (RS) é um parâmetro utilizado na comparação de métodos extrativos e quanto à natureza do líquido extrator, sendo técnica preconizada em códigos oficiais.

O resíduo seco (RS) diminuiu com a elevação do teor etanólico do líquido extrator (Tabela 30), de modo semelhante para os dois tempo de maceração (Figura 33). Não foi observada diferenças significativas ($\alpha = 0,05$) entre os valores de RS nos diferentes tempos de contato, o que indica que o fator concentração etanólica é o determinante neste fenômeno. O valor de RS caiu lentamente entre CE de 50 e 70% e reduz-se bruscamente para

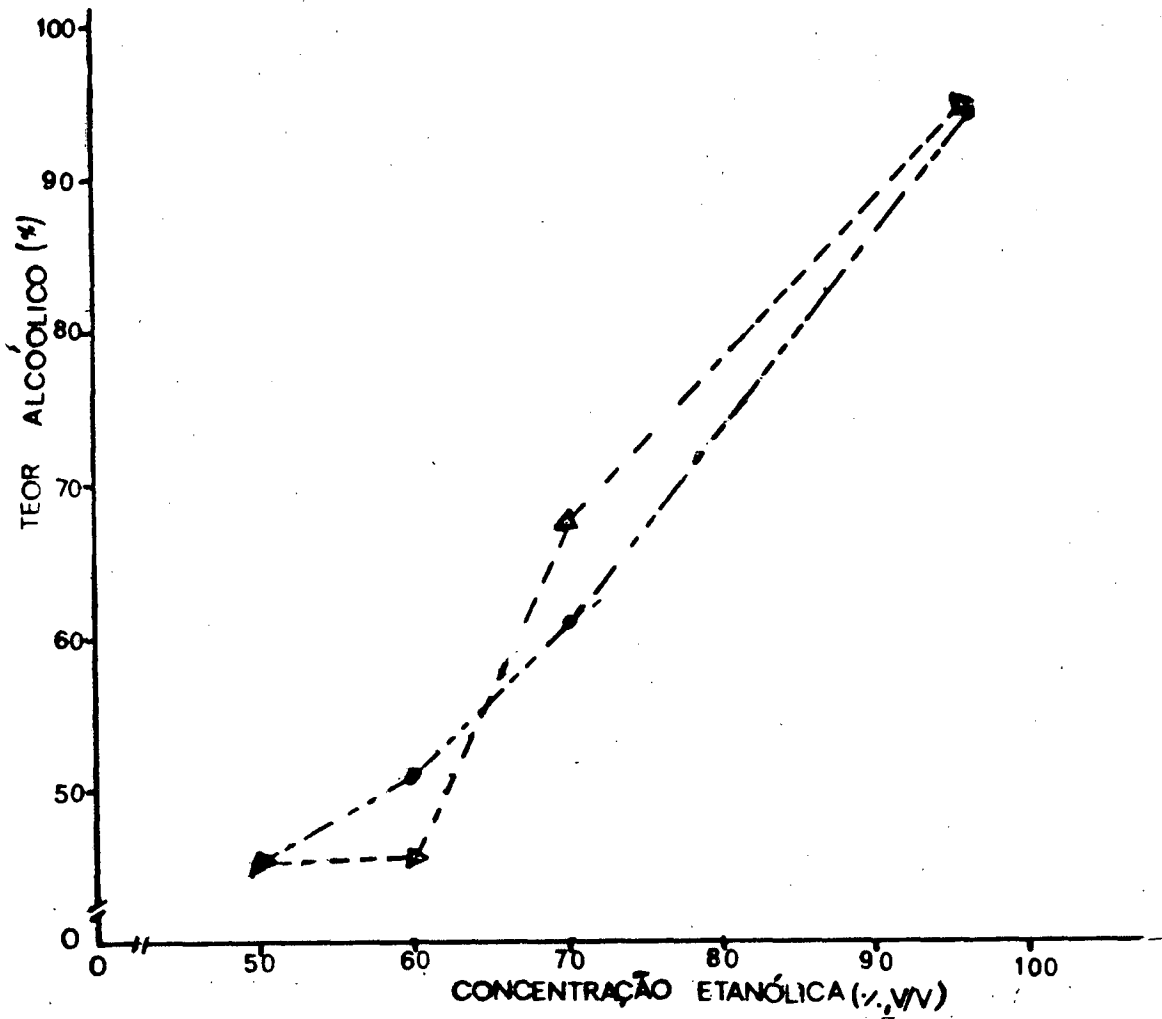


FIGURA 31 - Teor alcoólico com auxílio do picnômetro. ▲ Macerado 5 dias; ● Macerado 10 dias.

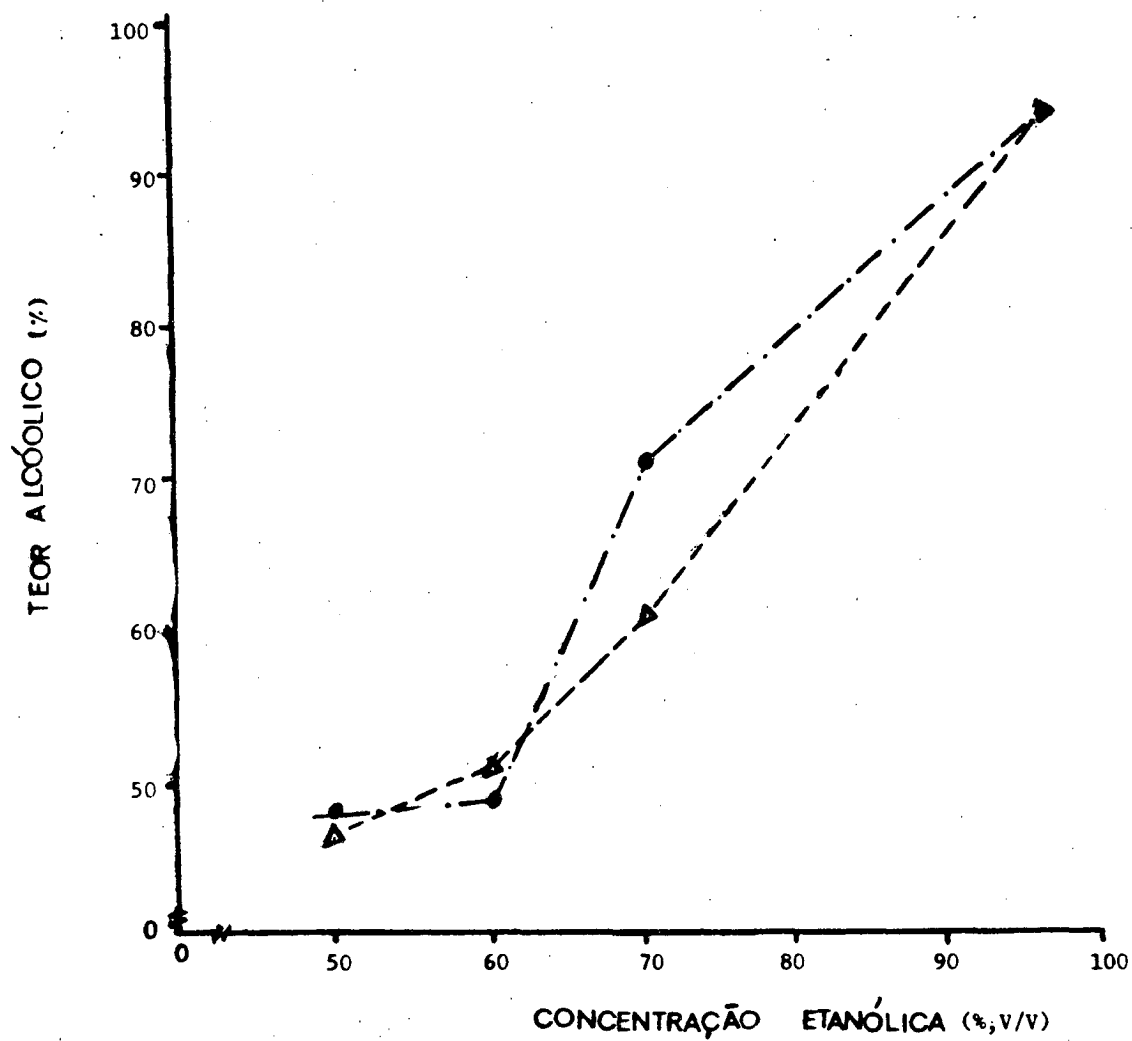


FIGURA 32 - Teor alcoólico com auxílio de areômetro. **Δ** Macerado 5 dias; **●** Macerado 10 dias

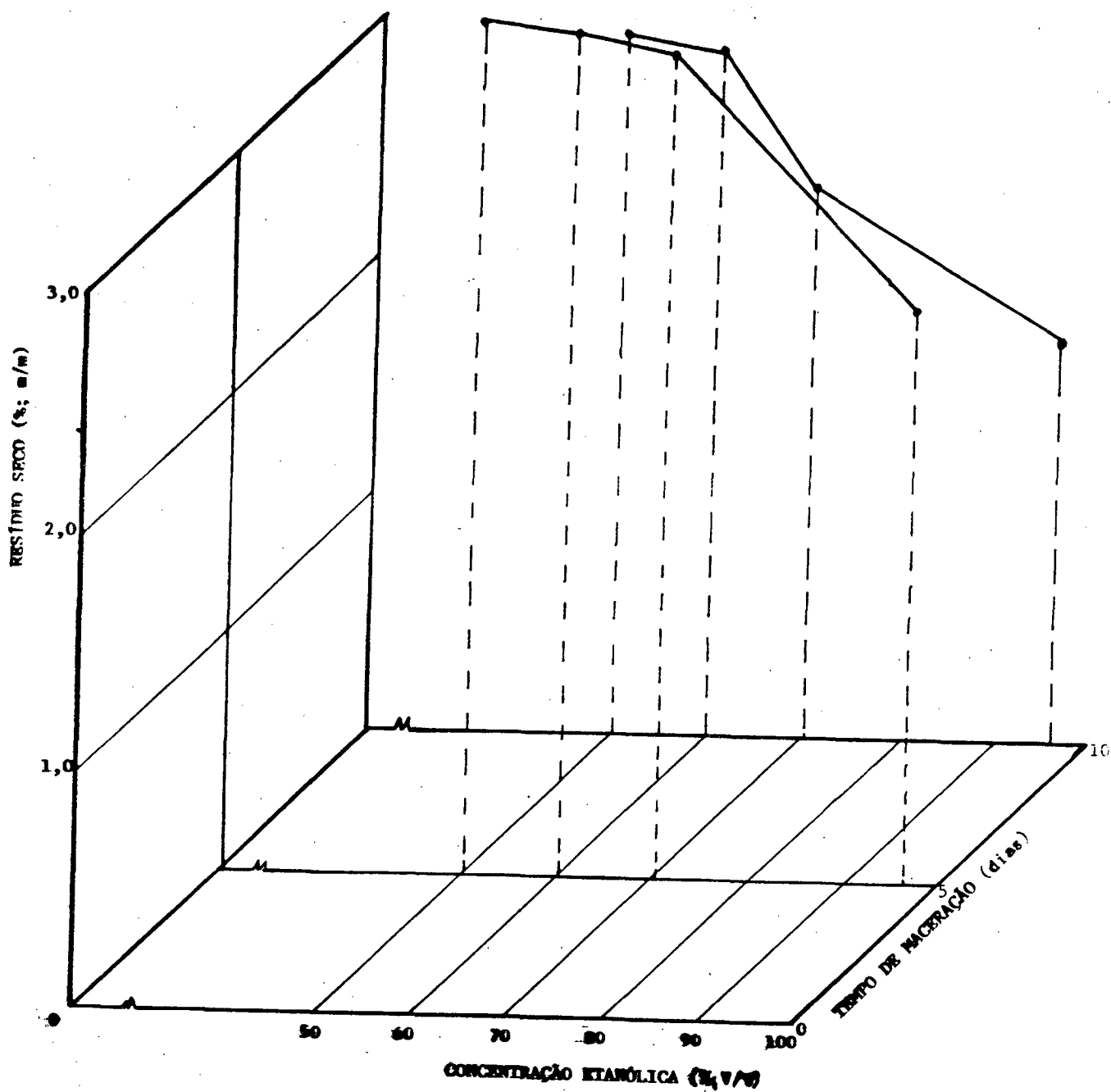


FIGURA 33 - Influência da concentração etanólica do líquido extrator e do tempo de maceração sobre o resíduo seco.

a concentração etanólica mais elevada do líquido extrator.

O extrato referência (ER), túrbolizado, foi utilizado para o desenvolvimento e acompanhamento das metodologias de qualificação (cromatografias, testes químicos) e quantificação dos seus constituintes. Devido a este processo de extração ser caracterizado pela ruptura brusca das células com conseqüente liberação dos constituintes ativos e era esperado maior rendimento na extração, detectável através do RS, o que não ocorreu (Tabela 30), indicando que este procedimento é menos eficiente do que a maceração, isto é, sugerindo que a solubilidade das substâncias extraíveis determina o RS e não a fase de lixiviação. Esta observação é corroborada pela similitude dos valores de RS nos dois tempos de maceração.

De acordo com desenvolvimento das metodologias, optou-se por quantificar as substâncias taninóides nos macerados, devido aos problemas de instabilidade com outras substâncias e serem estes majoritários e possíveis responsáveis pela ação terapêutica (CARLINI, 1988).

Para o doseamento dos taninos nos macerados, adaptou-se o método descrito por BÖHME & HARTKE (1976), calculando-se a quantidade de macerado a ser utilizada para o doseamento, correspondente à quantidade de droga que deveria ser extraída (750 mg), não houve necessidade de aquecimento, pois a amostra já era constituída pelo extrato.

Na Figura 34 nota-se redução da concentração de taninos totais (TT) em função do aumento da CE do líquido extrator. De modo semelhante comporta-se a fração tanante (T). Isto pode ser explicado pela maior solubilidade das substâncias taninóides em

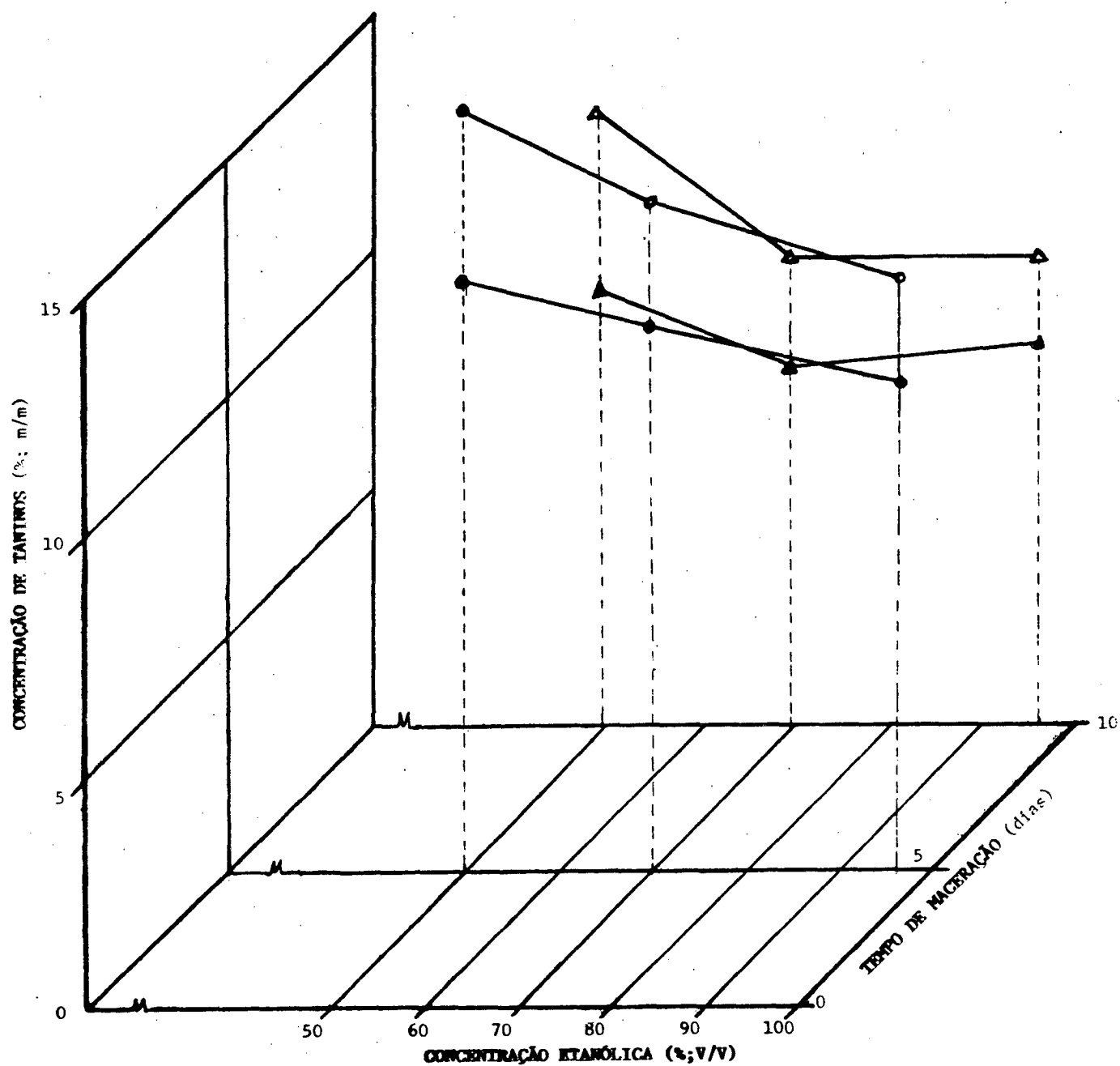


FIGURA 34 - Influência da concentração etanólica do líquido extrator e tempo de maceração sobre a concentração de taninos totais (○ e △) e fração tanante (● e ▲).

meios onde existam maior número de moléculas de água disponíveis para a solvatação dos grupamentos hidroxílicos fenólicos. O paralelismo das curvas TT e T reforça esta observação.

Com relação ao tempo de maceração, não há diferença significativa ($\alpha = 0,05$ e $0,01$) entre 5 e 10 dias para o etanol 50%, indicando neste caso, que o líquido extrator determina a extração de tanantes e taninos totais.

No entanto, para as concentrações etanólicas 70 e 96%, tanto para TT como para T (Tabela 37 e 39), há diferença significativa ($\alpha = 0,05$ e $0,01$), ou seja, o maior tempo de contato da droga com o líquido extrator (10 dias de maceração), conduz a uma diminuição da concentração de taninos totais e tanantes (Figura 34).

Analisando TT sem considerar a variação da graduação alcoólica, observa-se que o ER apresenta maior concentração de TT do que os macerados obtidos com 5 e 10 dias de contato com etanol 50%. Comparando os valores na Tabela 59, pode ser visto que a turbolização é mais eficiente para TT e T, mas não para NT. Os resultados obtidos para TT e T contrastam com RS, sugerindo ser a turbolização mais específica para obtenção de TT e T. A simplicidade da maceração favorece seu emprego, pois um

TABELA 59 - Comparação entre dois métodos extrativos (turbolização (ER) e maceração (M5d=5 dias de maceração, M10d = 10 dias de maceração)).

EXTRATO	TT	T	NT
ER	16,14	13,21	2,93
M5d	13,09	9,53	3,57
M10d	13,02	9,38	3,64

turbolizador industrial exige grande investimento para sua aquisição e manutenção.

Se considerar o aspecto de maior rendimento, poder-se-ia dizer que o líquido extrator ideal seria a água. Por outro lado, a conservação deste macerado seria baixíssima, com a proliferação de fungos e bactérias. Assim, a opção da adição do etanol nas várias concentrações, mesmo perdendo em parte quanto ao rendimento, garante a estabilidade do macerado.

Na procura de substâncias marcadoras, tendo conhecimento da instabilidade dos taninos condensados em solução tentou-se um grupo de substâncias nitrogenadas que apresentaram resultado positivo para alcalóides terciário e quaternário. Foi tentada extração direta na droga utilizando método proposto por STAHL (1975) para xantinas-(item 2.2.14.1 e obtida solução a qual foi cromatografada no sistema V e por cromatografia bidimensional (Figuras 14 e 15), tendo sido detectada substância com comportamento semelhante a cafeína, denominada M3.

Traçou-se espectro no UV, observando-se máximo a 272,8nm em etanol coincidente com o padrão (Figuras 21b e 21d).

Com base nestes resultados passou-se para o desenvolvimento da metodologia de quantificação desta substância, utilizando cafeína como substância referência. Adaptou-se a técnica de quantificação proposta por STAHL (1975) para o extrato referência (ER).

Em seguida iniciou-se a elaboração da curva padrão, objetivando validar a quantificação (Figura 35). A curva apresentou linearidade na faixa de concentração de 1,0 a 12,0 µg/ml

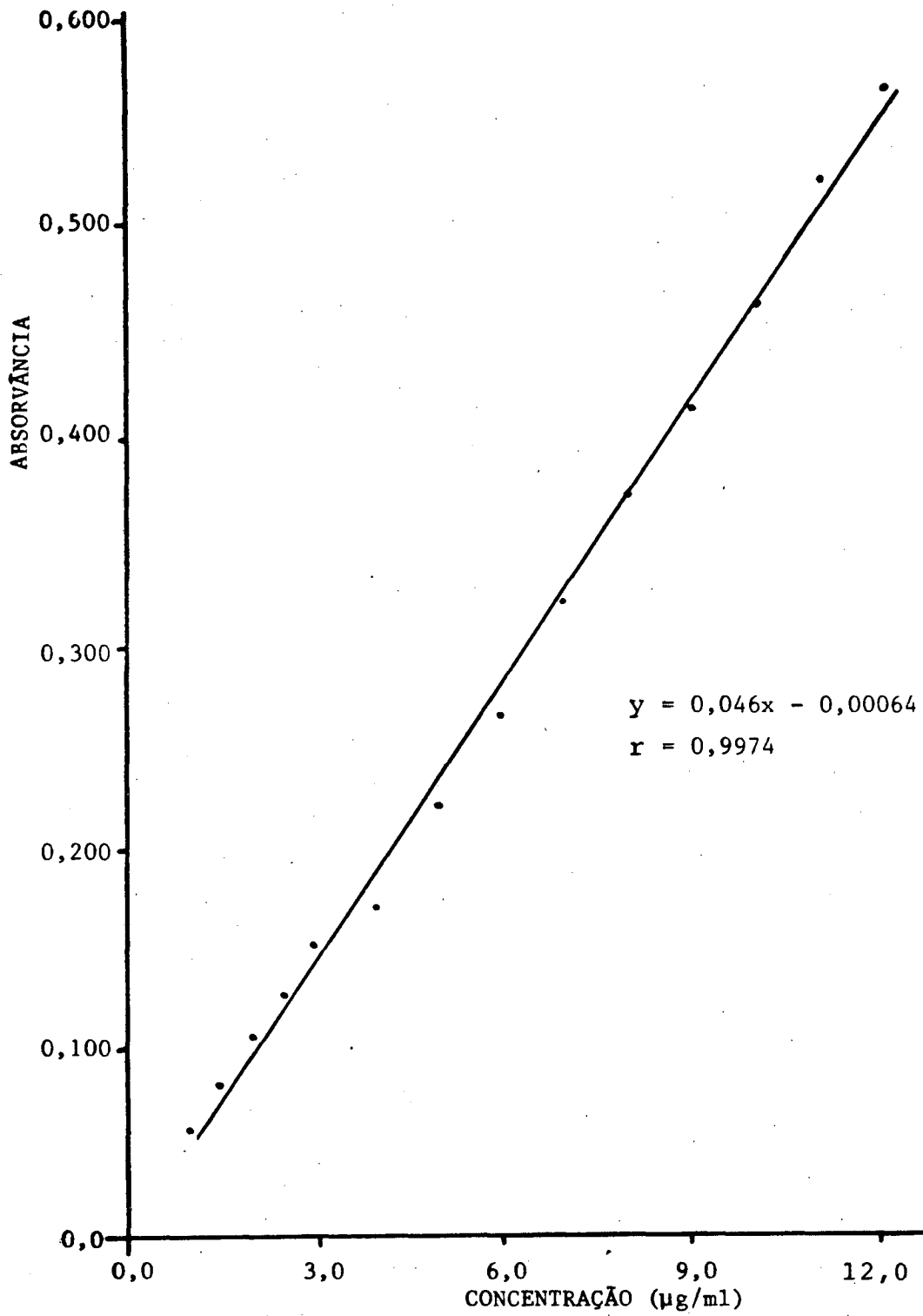


FIGURA 35 - Curva de calibração de cafeína em etanol a 272,8nm (n = 5).

($r = 0,999$), comprovada pelo método de Ringbon (AYRES, 1970).

Teve início o desenvolvimento de quantificação no extrato referência (ER), onde obteve-se resultados reprodutíveis com CV% pequeno. Para acompanhamento foi tentado cromatografar as soluções após quantificação, não sendo possível detectar nenhuma substância, provavelmente devido a baixa concentração.

Estabelecida a metodologia de quantificação, obteve-se os macerados e foi feita a quantificação da substância M3. Observou-se aparecimento de cor amarela na solução clorofórmica. O espectro apresentou banda mais larga do que a do padrão de cafeína (Figura 21a). Foram testadas várias concentrações de cafeína e observou-se que em baixa concentração ($2,5 \mu\text{g/ml}$), o espectro (Figura 21c) apresenta grande semelhança com o obtido com M3. Aliado a este resultado, observou-se que havia retenção de substâncias amarelas no papel filtro, muito instáveis (desaparecimento de cor). Após quantificação foi separado por CCD e traçado espectro no UV. Foi necessário levar todas amostras a resíduo para fornecer quantidade suficiente para leitura no UV, indicando que estas substâncias teriam pouca influência na quantificação no ultravioleta.

Foram testados vários métodos de purificação da amostra, entre eles, a utilização de coluna Extrelut (item 2.2.13.3). Neste método detectou-se maior perda da substância e a faixa de leitura caiu $1,0-3,0 \mu\text{g/ml}$, sendo que para o etanol 70%, 10 dias de contato não foi possível fazer leitura (Tabela 45).

Para validar o método em coluna Extrelut, foram traçadas

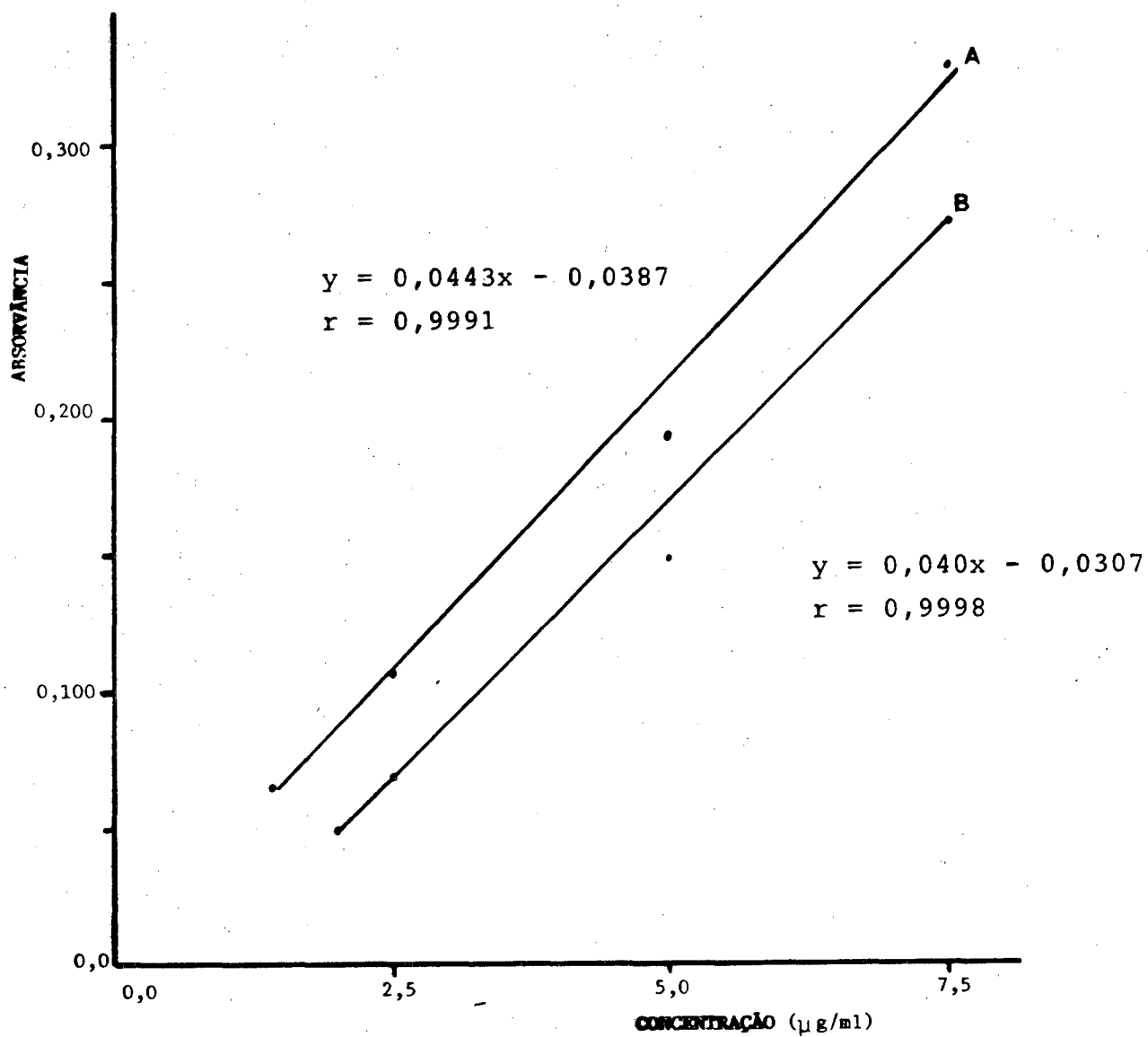


FIGURA 36 - Curvas padrão UV direto e indireto a 272nm em diclorometano. A = UV direto; B = UV indireto.

curvas padrão com cafeína em diclorometano no ultravioleta direto e após ter sido submetida ao processo extrativo (método indireto), sendo possível detectar a perda do método (Figura 36).

Embora a grande sensibilidade da cafeína no ultravioleta, os dois métodos apresentavam o mesmo problema, pequena concentração da substância. Este problema de baixa concentração, torna difícil comprovar a presença dela por cromatografia em camada delgada. Isto só foi possível após realizar a quantificação, as amostras serem reduzidas em seu volume e cromatografadas. As Figuras 14 e 16, mostram a presença de várias substâncias, para o padrão de cafeína submetido aos dois métodos de extração da amostra. Pôde-se observar que a amostra não continha teofilina e teobromina (valores de R_f e cores bem diferenciadas). Nestes cromatogramas observa-se que, exceto o padrão em clorofórmio, todas as amostras (padrão ou macerado submetido a Extrelut ou ao método de STAHL) apresentam duas manchas. Uma das manchas detectada no UV_{254nm} , com R_f próximo a 0,17-0,20, após contato com R7 passa a marrom tijolo (cor semelhante ao padrão de cafeína em clorofórmio). Outra com R_f próximo a 0,63, foi detectada no UV_{365nm} , com cor azul fluorescente e após nebulização com R7 adquiriu cor amarelo sujo. Devido a este comportamento semelhante ao padrão e ao relato de BLITZ e RAKET (1928), sobre a possibilidade de degradação da cafeína sob condições drásticas (pH alto, 24h de agitação), pensou-se que a planta possa conter cafeína, contudo em baixa concentração e que se degrada com a elevação de pH, agitação, calor.

As Figuras 17 e 18 mostram a etapa em que ocorre esta degradação. Ao analisar o sobrenadante da solução de sulfato de

cobre e hidróxido de cálcio, pode-se observar que o método extrativo alterou o comportamento cromatográfico da cafeína, com o desaparecimento da mancha correspondente ao padrão e o surgimento de duas outras manchas.

Pode-se observar ainda na Figura 18, a presença de outras substâncias com comportamento cromatográfico semelhante as metilxantinas.

A tentativa de identificar a cafeína e empregá-la nos doseamentos não foi possível, face aos desencontros dos dados. Sugere-se novos estudos, mantendo as condições mais suaves de extração.

Objetivando a avaliação tecnológica do extrato de *M. ilicifolia* os resultados obtidos da quantificação foram submetidos a análise estatística. O teste aplicado foi fatorial 4x2 para resíduo seco e 3x2 para taninos (tanantes e totais). Para o resíduo seco (RS) observou-se inicialmente pelo teste de GRUBBS que não havia resíduos suspeitos. Através da análise de variância (teste Fisher), pode-se observar que o valor F (6.107,19) é significativo ($\alpha = 0,01$, apresentando-se bem elevado (Tabela 60), sendo o CV% do método baixo. Isto significa que os fatores con-

TABELA 60 - Análise de variância de resíduo seco (RS), fatorial 4x2.

ORIGEM DA VARIACÃO	GL	QM	F	CV%	Fcrítico
Fator 1 EtOH	3	1,72	6.107,19**		4,76
Fator 2 Tempo	1	0,17	597,54**		
Interação 1 x 2	3	0,10	347,67**		
Residual	16	0,0			
TOTAL	23	0,24		0,7	

centração etanólica e tempo de maceração e a interação entre eles, são determinantes para a extração, sendo que o etanol se sobressai aos outros. Na Tabela 61, comparando os RS obtidos nos extratos demonstra que os macerados 50 e 60% de etanol apresentam maior extração que etanol 70 e 96%.

TABELA 61 - Resultados do teste Newman-Keuls para o resíduo seco ($\alpha = 0,05$).

NÍVEIS	VALOR MÉDIO (%) *
A4-B1	1,80a
A4-B2	1,81a
A3-B2	2,33b
A3-B1	2,87c
A2-B2	2,89c
A1-B2	2,93d
A1-B1	2,97e
A2-B1	2,98e

*Valor médio seguido pela mesma letra significa que não diferem estatisticamente entre si.

Com relação ao tempo de maceração pode-se detectar que há maior extração de substâncias com menor tempo de contato entre a droga e o líquido extrator (5 dias), exceto pelo álcool 96%. É observado que alguns macerados não apresentam diferenças significativas (Tabela 61).

Para extração dos taninos totais (TT), observa-se a grande influência da CE ($F = 1.213,97$), comportamento semelhante ao RS, aumentando com a diminuição da concentração etanólica (Tabela 62).

TABELA 62 - Análise de variância para taninos totais segundo fatorial 3x2.

ORIGEM DA VARIACÃO	GL	QM	F	CV%	F
Fator 1 CE	2	1,96	1.213,97**		4,76
Fator 2 Tempo	1	15,88	7,40*		
Interação 1 x 2	2	0,10	52,55**		
Residual	12	0,68			
TOTAL	17	0,01		1,0	

O tempo de maceração pouco influi ($F = 7,40$) na extração de taninos. Quando a concentração do líquido extrator é 50%, o rendimento é praticamente o mesmo (Tabela 63) não apresentando diferenças significativas. Para o macerado contendo 70% de etanol há diferença significativas entre eles, sendo que o rendimento com 5 dias é maior. Com o etanol 96% foi obtido maior teor de taninos totais, com aumento do tempo de contato e a diferença entre os dois resultados é significativa (Tabela 63).

TABELA 63 - Resultados do teste Newman-Keuls ($\alpha = 0,05$) para taninos totais.

NÍVEIS	VALOR MÉDIO* (%)
A3-B1	9,59a
A3-B2	10,08b
A2-B2	10,65c
A2-B1	11,50d
A1-B2	13,02e
A1-B1	13,09e

* Valor médio seguido pela mesma letra significa que não diferem estatisticamente entre si.

As substâncias tanantes (T) sofrem influência semelhante da concentração etanólica (Tabelas 62 e 64), enquanto que o tempo de maceração não influencia tão intensamente. Na Tabela

TABELA 64 - Análise de variância de tanantes, segundo fatorial 3x2.

ORIGEM DA VARIACÃO	GF	QM	F	CV%	Fcrítico
Fator etanol 1	2	4,72	258,53**		4,76
Fator Tempo 2	1	0,01	0,42ns		
Interação 1 x 2	2	0,92	50,31**		
Residual	12	0,02			
TOTAL	17			1,6	

64, pode-se observar comportamento semelhante aos TT para as concentrações etanólicas 50%, 5 e 10 dias 70% 5 dias. As outras concentrações se diferenciam, o álcool 96% apresenta maior teor de tanantes do que o etanol 70% - 10 dias, sendo que, os macerados apresentam diferenças significativas ($\alpha = 0,05$) entre si (Tabela 65).

TABELA 65 - Resultados do teste Newman-Keuls, para substâncias tanantes ($\alpha = 0,05$).

NÍVEIS	VALOR MÉDIO*
A3-B1	7,37a
A2-B2	7,77b
A3-B2	8,16c
A2-B1	8,53d
A1-B2	9,38e
A1-B1	9,53e

* Valor médio seguido pela mesma letra significa que não diferem estatisticamente entre si.

A análise estatística das três variáveis (RS, TT e T) demonstram que a interação entre fator A - concentração etanólica e fator B - tempo de contato, tem importância significativa ($\alpha = 0,01$), independente se um dos fatores apresentar ou não significância.

Após o exposto entende-se que a concentração etanólica de 50% é para *Maytenus ilicifolia* a melhor e o tempo ideal para extração das substâncias é 5 dias.

A eficácia do medicamento está ligada diretamente à

qualidade do mesmo. Para que isto ocorra são necessários estudos e procedimentos relacionados com a manutenção de sua conservação, segurança quanto a dose do medicamento e consequentemente, a constância de atividade.

Por se trabalhar com extrato bruto de composição complexa, torna-se muito difícil prever as reações de degradação, seja devido às limitações aparativas ou ao grande número de substâncias desconhecidas (HALBACH, 1983). Face a estes problemas observou-se e quantificou-se alguns grupos de substâncias marcadoras.

GSTIRNER et alii (1956) desenvolveram estudos comparativos entre várias drogas contendo taninos, detectaram que as substâncias taninóides se alteravam nas tinturas e extratos, inclusive nas drogas como ratânia e outras encontradas no mercado sob a forma de pó, com baixo teor de taninos.

Os taninos condensados quando sofrem ação da luz e/ou aquecimento, podem apresentar entre outras, reações de oxidação, epimerização e polimerização (LEWAK, 1968).

Os resultados obtidos na quantificação de taninos totais durante o período de avaliação da estabilidade do extrato otimizado M50-5d (50% etanol e 5 dias de maceração), quando submetidos à temperatura de 30°C durante 44 dias (Figura 22), apresentam pequenas alterações nos cromatogramas, comparando com extrato mantido em geladeira. Observa-se o desaparecimento de manchas e o aparecimento de outras com valores de Rf inferiores aos obtidos no dia zero. Provavelmente devido a alterações químicas causadas pelo calor, diminuindo a polaridade das substâncias, dificultando sua migração no cromatograma. Pode-se ainda notar o desaparecimento da mancha com valor de Rf seme-

lhante ao da catequina padrão, após 24 dias apesar que após contato com R1, há a formação da cor rosa forte. Isto leva a crer que a substância se encontra em baixa concentração, mas ainda detectável pelo reagente R1.

A 40°C (Figura 23) observa-se o surgimento de manchas com valores de Rf mais baixos, com o tempo de exposição. Há o desaparecimento de algumas (18, 28, 39, 50, 61) com formação de cauda. Pode-se detectar aparecimento de uma substância azul fluorescente à partir de 24 dias (nos 32, 43, 54) e a mancha do ponto de aplicação passa de azul fluorescente à marrom, amarelo e marrom, com o tempo de armazenamento.

A 30 e 40°C as modificações são mais lentas e as reações que provavelmente estariam ocorrendo seriam oxidação e epimerização.

A 60°C (Figura 24) mostra o aparecimento de substâncias (2) com posterior desaparecimento após 17 dias de exposição. Observa-se a formação de caudas de cor azul fluorescente que aumentam com a exposição à temperatura. Com 44 dias, apenas algumas substâncias são detectáveis no ultravioleta ou em contato com o agente cromogênico. A degradação das substâncias é facilmente observada através das alterações das manchas no cromatograma, com relação ao extrato recém preparado.

Com relação à quantificação, (Tabelas 47, 50 e 53), quando os extratos foram submetidos à temperaturas de 30, 40 e 60°C demonstram que, a 30 e 40°C, os taninos totais apresentam um decaimento lento cerca de 14 e 10 dias respectivamente, para

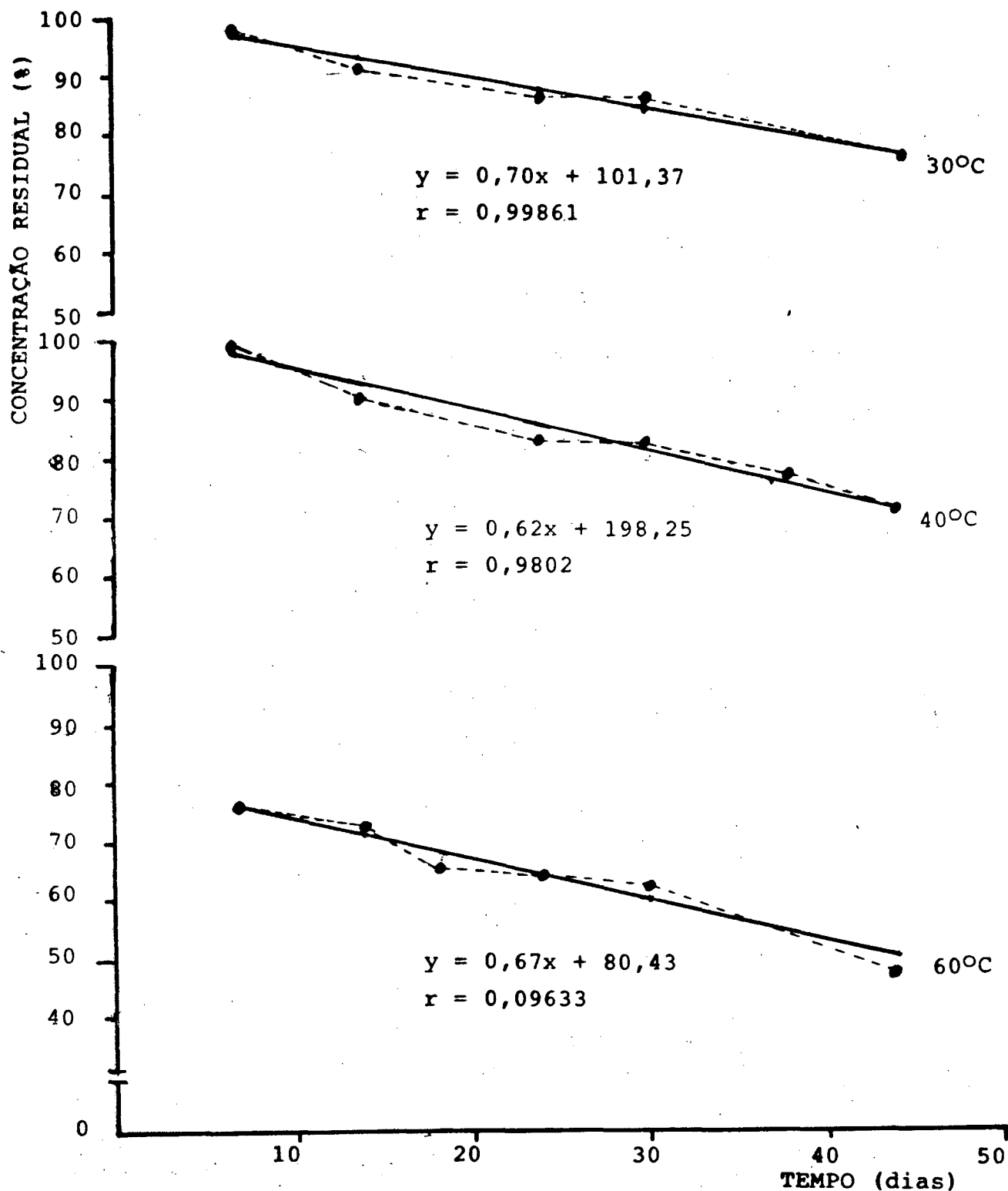


FIGURA 37 - Curvas representativas de degradação de acordo com a cinética de 1ª ordem. Concentração de taninos totais (TT), obtida de macerados submetidos à 30, 40 e 60°C. (---) Valores observados, (—) valores calculados.

atingir 10% de perda das substâncias ativas (Figura 37). Pode-se notar que este comportamento é demarcado pelas substâncias tanantes, (Tabelas 48 e 51). A 60°C apresentam decaimento de 10% em menos de 7 dias ($t_{90} \approx 2$ dias) (Figura 38), ocorrendo o mesmo com os polímeros (Tabelas 54 e 55).

Pôde ser observado quanto às substâncias não-tanantes (monômeros com massa molecular inferior a 500 e outros polifenóis como taninos, alcalóides, flavonóides (MERCK, 1980), que há um decaimento no teor das substâncias quando submetidas às temperaturas de 30 e 40°C, apresentando perda de 10% antes do 14º dia (Figura 38).

A quantificação dos macerados quando expostos a 60°C, apresenta resultados "sui generis", nos primeiros 7 dias há degradação de quase 70% dos princípios não-tanantes, ocorrendo elevação no 14º dia com seqüente degradação no 17º dia, elevando-se no 24º e 30º dia e degradando-se a 50% no 44º dia (Figura 39). Este comportamento mostra a fragilidade das substâncias, que provavelmente sofrem oxidação e ao entrar em contato com o reagente Folin-Denis não podem reduzir os reagentes (tungstênio e molibdênio), apresentando baixo teor de taninos monômeros e outras substâncias fenólicas que poderiam ser detectadas pelo método. Observam-se oscilações na porcentagem de não-tanantes, podendo sugerir que as moléculas oxidadas apresentam maior facilidade de polimerizar devido a formação de carbocátion em C4 (METCHE & GIRARDIN, 1980). Por outro lado, o aumento de não-tanantes observado nos dias 14, 24, 30 poderiam ser produtos da degradação dos polímeros (dímeros, trímeros, etc.).

O comportamento das manchas sugere ocorrência de rea-

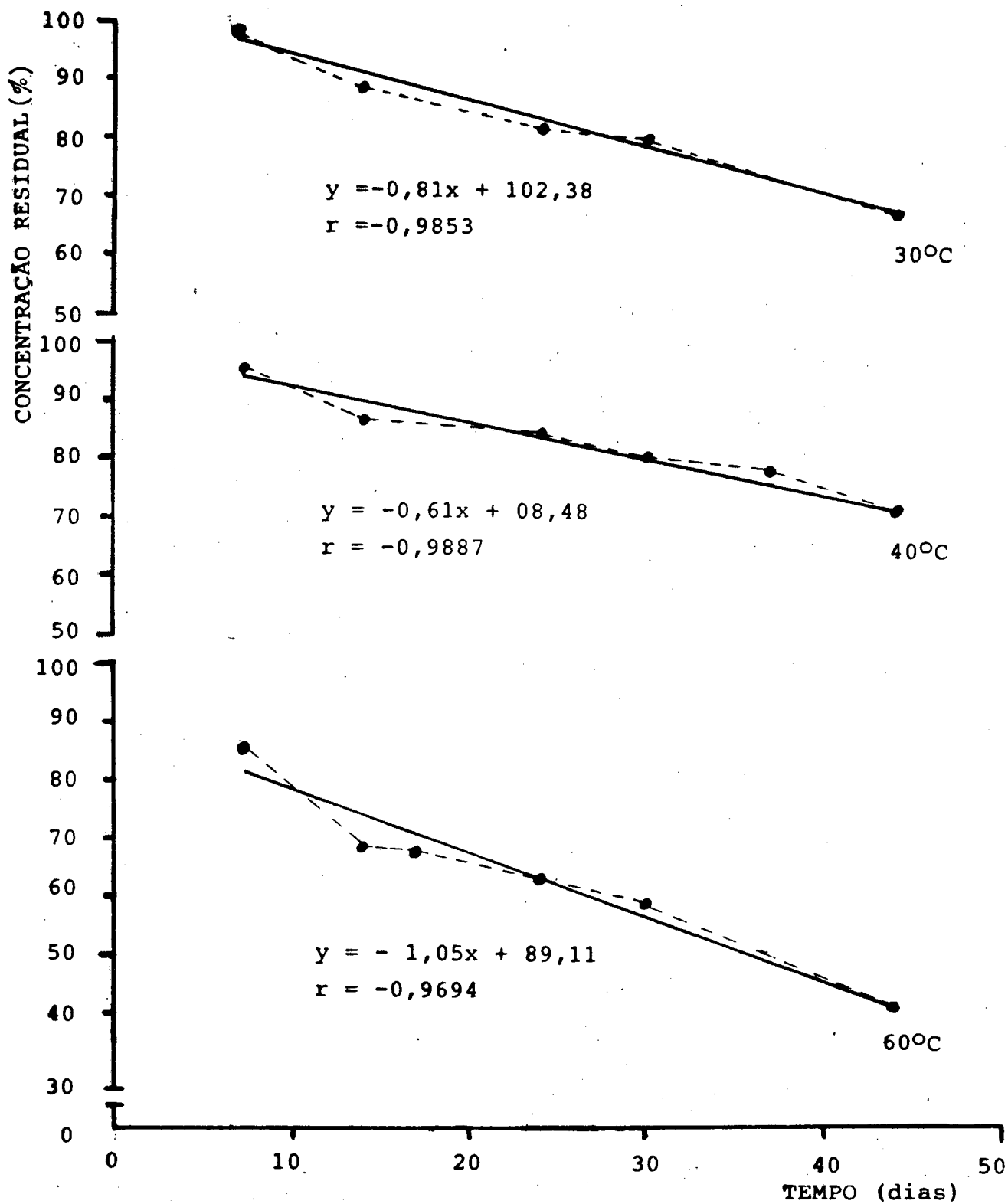


FIGURA 38 - Curvas representativas de degradação de acordo com a cinética de 1ª ordem. Concentração da fração tanante (T), obtida de macerados submetidos à 30, 40 e 60°C. (---) Valores observados; (—) valores calculados.

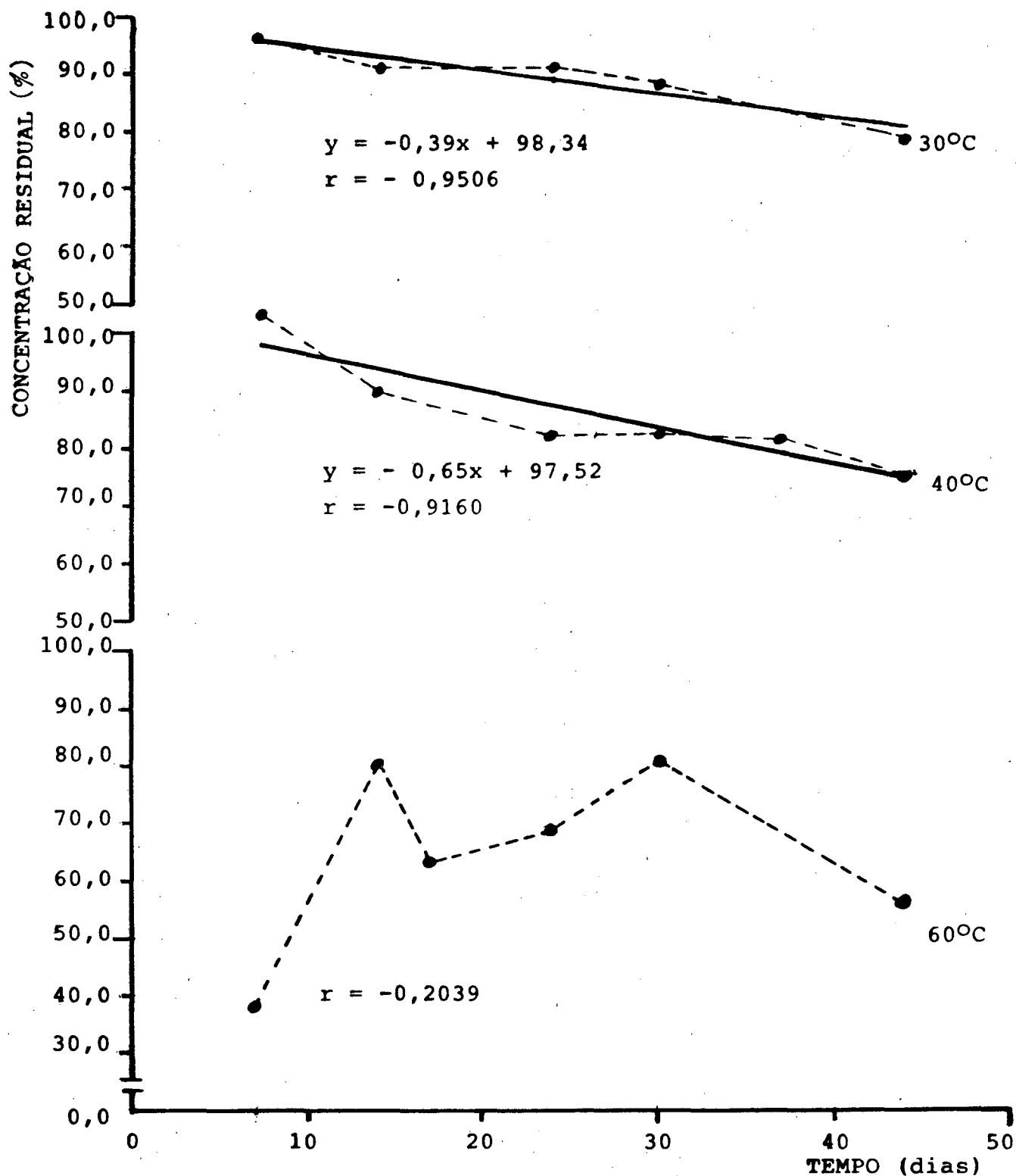


FIGURA 39 - Curvas representativas de degradação de acordo com a cinética de 1ª ordem. Concentração de fração não-tanante (NT), obtida de macerados submetidos a 30, 40 e 60°C. (---) Valores observados; (—) valores calculados.

ções de oxidação das substâncias contidas no extrato, como pode ser observada na Figura 24, pela diminuição do tamanho das manchas, pela alteração do valor de R_f (diminuição) e cores das substâncias detectadas no UV_{365nm} e visível após contato com R1.

Foi tentado, após obtenção dos resultados de estabilidade, determinar o tempo de validade do macerado padronizado.

NUDELMAN (1975) propõe que pode-se determinar a ordem de reação por dois métodos: 1. traça-se a reta ($C \times t$), calcula-se k para zero ordem, 1ª e 2ª ordem e onde o valor de k se mostrar constante (CV% menor) é a ordem da reação; 2. plotar em papel milimetrado os valores $C \times t$ e $\log C \times t$, qual apresentar melhor reta, é a ordem da reação (Figura 39); 3. CONNORS et alii (1986) propõem a determinação da ordem da reação através do coeficiente de correlação (r) de cada reta.

Foram testados os dois primeiros métodos. Utilizando o primeiro, pode-se dizer que a ordem da reação é zero ordem, recorrendo ao segundo método a reação é de 1ª ordem (Figura 39).

O que se pode detectar após os cálculos de k (reação de 1ª ordem), é a grande oscilação, não sendo coerentes os resultados obtidos.

Observa-se, mesmo sem os cálculos de cinética reacional e de t_{90} , que as substâncias taninóides são muito instáveis (se oxidam e se polimérisam facilmente em solução). Caso seja comprovada que a ação da espinheira santa se deva a estes constituintes, seria necessário desenvolver formulações mais estáveis com auxílio de antioxidantes ou sob a forma de liofilizados.

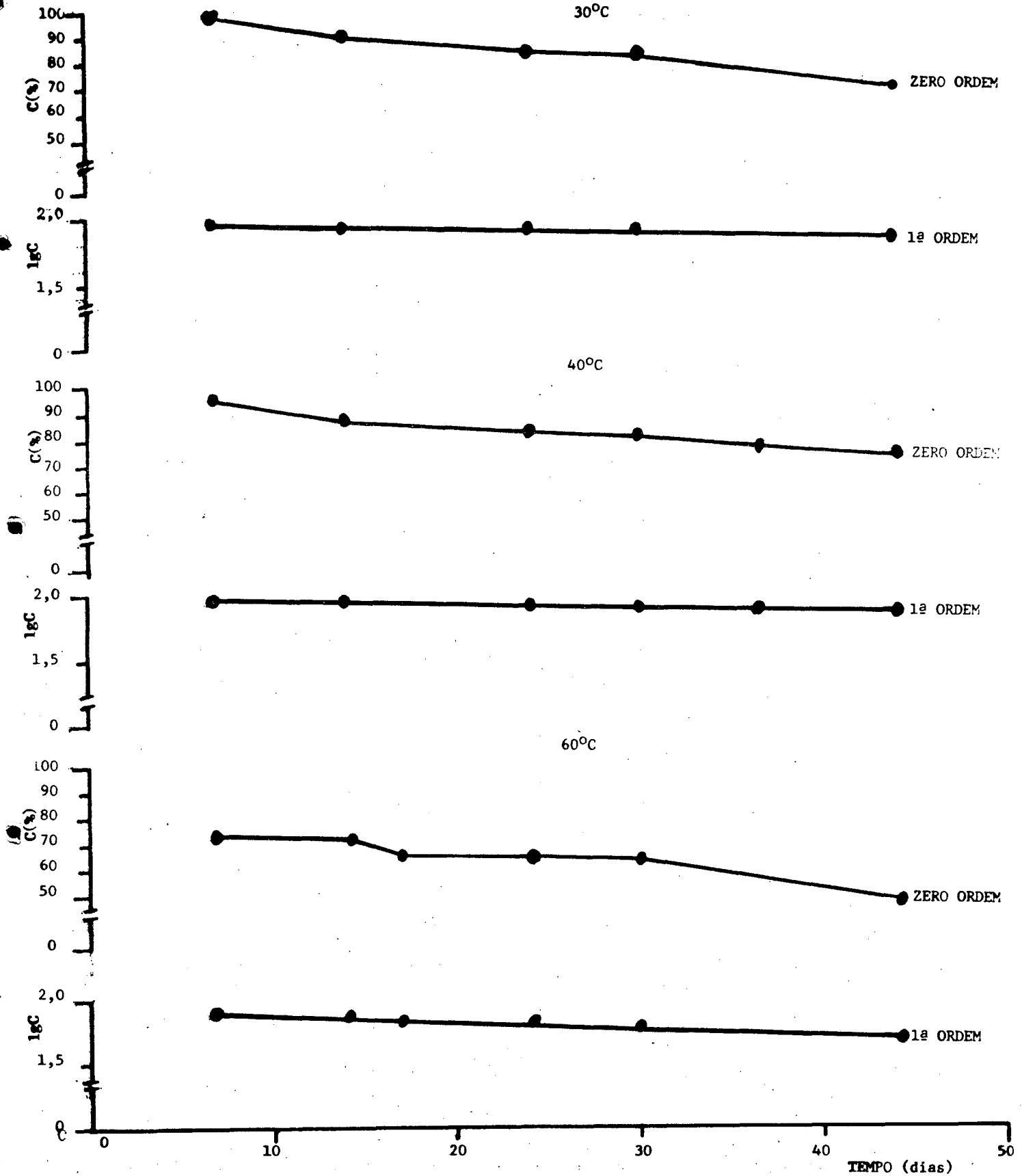


FIGURA 40 - Determinação da ordem de reação através da escolha da melhor reta, para taninos totais (TT)

Durante o desenvolvimento deste trabalho foi possível notar que para a caracterização da droga espinheira santa as análises anatômica e cromatográfica foram determinantes. Para a quantificação de substâncias marcadoras, dentre as substâncias testadas, os taninos mostraram-se melhores, com boa reprodutibilidade.

Em se propondo nova forma farmacêutica o estudo tecnológico deve ser realizado concomitantemente com estudos farmacológico e da estabilidade.

5. CONCLUSÕES

- . As três camadas de parênquima paliçádico, a disposição do parênquima esponjoso e a presença de estômatos na epiderme da face inferior caracterizam a droga *M. ilicifolia*.
- . A secagem do vegetal pode ocorrer após ser submetido a 40°C, em estufa de ar circulante por 6 dias.
- . Os sistemas cromatográficos I e IV se mostraram exequíveis para caracterização da droga, bem como, das formas farmacêuticas dela derivadas.
- . A quantificação de taninos é um método reprodutível para *M. ilicifolia*.
- . O pH obtido nos macerados indica terem as substâncias extraídas, propriedades tamponantes, mantendo o pH em torno de 6,0.
- . A turbólise demonstrou ser um método mais efetivo para extração de taninos condensados.
- . Para extração de taninos condensados, a concentração etanólica foi fator predominante, obtendo-se melhor rendimento com 50% de etanol, nas condições testadas.

- . O tempo de contato ideal entre droga e líquido extrator para extração de taninos condensados nas condições testadas foi 5 dias.
- . A interação entre os fatores concentração etanólica e tempo de maceração mostrou-se significativa para as três variáveis dependentes: resíduo seco, taninos totais e tanantes, independente de haver significância dos fatores por si só.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMED, M.S.; FONG, H.H.S.; SOEJARTO, D.D.; DOBBERTEIN, R.H. and WALLER, D.P. High-performance liquid chromatographic separation and quantitation of maytansinoids in *Maytenus ilicifolia*. . Journal of Chromatography, 213:340-4, 1981.
- ARENAS, P. & MORENO AZORERO, R. Plants of common use in Paraguayan folk medicine for regulating fertility. Economic Botany, 31:298-301, 1977.
- AYRES, G. H. Análisis químico cuantitativo. New York: Harper, 1970. p.459-512.
- AZORERO, R.M. & SCHVARTZMAN, B. 268 plantas medicinales utilizadas, para regular la fecundidad en algunos países de sudamerica. Obstetricia y Ginecología Latino-Americanas, (set/out):335-48, 1975.
- BERNARDI, H.H. & WASICKY, M. Algumas pesquisas sobre "Espinheira santa" ou "Cancerosa" *Maytenus ilicifolia*, Martius, usada como remédio popular no Rio Grande do Sul. Santa Maria: Universidade do Rio Grande do Sul - Centro de Pesquisas Bioquímicas das Faculdades de Farmácia e Medicina de Santa Maria, 1959.
- BLITZ, H. & RAKETT, H. Kaffeidin und Kaffeidin - carbonsäure. Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft, 61:1408-22, 1928.
- BÖHME, H. & HARTKE, K. (Ed.) Europäisches Arzneibuch, Band I und II, Kommentar, Stuttgart: Wissenschaftliche, 1976. p.1114-8.

- BÖLLIGER, H.R. & KÖNIG, A. Carotenoids, vitamins and chlorophylls. In: STAHL, E. (Ed.) Thin-layer chromatography. 2nd ed. Berlin: Springer, 1969. p.265-7.
- BOMTEMPI JR., N. Técnicas de anatomia vegetal. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, 1988. p.2.
- BONATI, A. Problems relating to the preparation and use of extract from medicinal plants. Fitoterapia, 1:5-12, 1980.
- BROWNLEE, K.A. Statistical theory and methodology. 2nd ed., New York: John Wiley, 1965. p.466-83.
- BRUNING, J.L. & KINTZ, B.L. Computational Handbook of Statistic. Illinois: Scott Foresman, 1968. p.17-30.
- BUNDESVEREINIGUNG Deutscher Apothekerverbände ed. Deustcher Arzneimittel-Codex, 1979. Frankfurt : Govi-Deutscher Apotheker, 1979. Codex-Probe 12.
- CABRERA, A.L. (Ed.) Santalaceae. Flora de la provincia de Buenos Aires. Buenos Aires: INTA, 1974. Tomo IV, parte 3.a.
- CAMPANELLI, A.R.; D'ALAGNI, M.; MARINI-BÉTTOLO, G.B. Spectroscopic evidence for the interaction of tingenone with DNA. Federation of European Biochemical Societies Letters, 122(2):256-60, 1980.
- CARLINI, E.A. & BRAZ, S. Efeito protetor do liofilizado obtido do abafado de *Maytenus* sp (Espinheira santa) contra úlcera gástrica experimental em ratos. In: _____, coord. Estudo de ação antiúlcera gástrica de plantas brasileiras: (M. ilicifolia "Espinheira santa e outras"). Brasília, CEME/AFIP, 1988a. p.21-36.
- CARLINI, E.A.; MACAUBAS, C.I.P.; OLIVEIRA, M.G.M. & BARBOSA, V.P. Toxicologia pré-clínica da Espinheira santa. In: _____,

coord. Estudo da ação antiúlcera gástrica de plantas brasileiras. Brasília: CEME/AFIP, 1988 . p.49-66.

CARLINI, E.A. & FROCHTENGARTEN, M.L. Toxicologia clínica (fase I) da Espinheira santa (*M. ilicifolia*). In: _____, coord. Estudos de ação antiúlcera gástrica de plantas brasileira: (*M. ilicifolia* "Espinheira santa e outras"). Brasília, CEME/AFIP, 1988 ,p.67-74.

COCHRAN, W.G. & BOX, G.M. Experimental designs. 1st ed., New York: John Wiley, 1950. p.132-5.

COIMBRA, R. & SILVA, E.D. da. Notas de Fitoterapia. 2ª ed., Rio de Janeiro: Laboratório Clínico Silva Araújo, 1958. p.182.

CONNORS, K.A.; AMIDON, G.L. & STELLA, V.J. Chemical stability of pharmaceutical. 2nd ed., New York: John Wiley, 1986. p.154-9.

CRIPPA, F. Problems involved in pharmaceutical and cosmetic formulations containing extracts. Fitoterapia, 1:59-66, 1980.

CUTTER, E.G. Anatomia vegetal. Parte I. Células e tecidos. 2. ed., São Paulo: Roca, 1987. v2.

DELLE MONACHE, I., MARINI-BÉTTOLO, G.B.; LIMA, O.G.; D'ALBUQUERQUE, I.L. & COELHO, J.S.B. Maytenin: a new antitumoral substance from *Maytenus* sp. Gazzetta Chimica Italiana, 102:317-20, 1972.

DIEMUCH, A.M. & MATHIS, C. Préparation et contrôle d'extraits végétaux à usage cosmétologique. Labo-Pharma - Problèmes et Techniques, (294):55-63, 1980.

FARMACOPÉIA Brasileira. 3 ed., São Paulo: Andrei, 1977.

FARMACOPÉIA Brasileira. 4. ed., São Paulo: Ateneu, 1988.

FARMACOPÉIA Internacional. 3 ed., Genebra: Organizacion

Mundial de la Salud, 1980. p.36-43.

FARNSWORTH, N.R.O.; BINGEL, A.S.; SOEJARTO, D.; GOO, Z.
Medicinal plants in therapy. Bulletin of the World Health Organization, 63(6):965-81, 1985.

FARNSWORTH, N.R. Plants and modern medicine: where science and folklore meet. World Health Forum, 6:76-80, 1985.

GSTIRNER, F.; BOPP, A.; HOPMANN, H. Ueber die Haltbarkeit von Gerbstoffdrogen und Gerbstofftinkturen. Archiv der Pharmazie, 289/61(5).233-9, 1956.

GUPTA, B.C. & MATHAI, A.M. Regression and analysis of variance techniques. Rio de Janeiro: Instituto de Matemática - URFJ., 1980. Cap. 7, p.368-81.

HALBACH, G. Grenzen der Analytik pflanzlicher Arzneibereitung. Deutsche Apotheker Zeitung, 123(14):668-71, 1983.

HARBORNE, J.B. Phytochemical methods. A guide of modern techniques of plant analysis. 2nd ed. London:Chapman and Hall, 1984. p.136.

HNATYSZYN, O.; ARENAS, P.; MORENO, R.A.; RONDINA; R.V.D. & COUSSIO, J.D. Estudio fitoquímico preliminar de plantas medicinales paraguayas. I. Plantas reguladoras de la fecundidad segun la medicina folklorica. Revista Sociedade Científica, 14(1/2):23-57, 1974.

LEWAK, S. Determination of the degree of polymerization of leucoanthocyanidins. Phytochemistry, 7:685-7, 1968.

LIMA, O.G.; D'ALBUQUERQUE, L.; COELHO, B.; MACIEL, G.M.; CAVALCANTI, M.S.B.; MARTINS; D.G. e LACERDA, A.L. Substância antimicrobiana e antineoplásica identificada como pristimerina isolada de *Prionosperma aspera* (Lam.) Miess (*Hipocrateceae*) da região da mata úmida de Pernambuco. Revista de Instituto de Antibióticos, Recife, 9(1/2):3-15, 1969.

LIMA, O.G.; ALBUQUERQUE, I.L.; COELHO, J.S.B.; MARTINS, D.G.; LACERDA, A.L. & MACIEL, G.J. Substâncias antimicrobianas de plantas superiores. Comunicação XXXI. Maitenina, novo antimicrobiano com ação antineoplásico, isolado de celastracea de Pernambuco. Revista do Instituto de Antibiótico, Recife, 9(1/2):17-25, 1969.

LIMA, O.G. de; COELHO, J.S.B.; WEIGERT, E.; D'ALBUQUERQUE, L.; LIMA, D.A. e SOUZA, M.A.M. Substâncias antimicrobianas de plantas superiores. Comunicação XXXVI. Sobre a presença de maitenina e pristimerina na parte cortical das raízes de *M. ilicifolia* procedente do Brasil meridional. Revista do Instituto de Antibióticos, Recife, 11(1):35-9, 1971.

LIST, P.H.; SCHMID, W.; NEIL, E. Reinsubstanz oder galenische Zubereitung? Arzneimittel-Forschung/Drug Research, 19(2):181-5, 1969.

LOURTEIG, A. & O'DONELL, C.A. Las Celastraceas de Argentina y Chile. Natura, 1(2):181-233, 1955.

MABRY, I.J.; MARKHAM, K.R.; THOMAS, M.B. The systematic identification of flavonoids. Berlin: Springer, 1970.

MACAUBAS, C.I.P.; OLIVEIRA, M.G.M.; FORMIGONI, M.L.O.S.; SILVEIRA, N.G. & CARLINI, E.L.A. Estudo da eventual ação antiúlcera gástrica do bálsamo (*Sedum* sp) folha da fortuna (*Bryophyllum calycinum*), Couve (*Brassica oleraceae*) e da Espinheira santa (*Maytenus ilicifolia*) em ratos. In: CARLINI, E.L.A., coord. Estudo da ação antiúlcera gástrica de plantas brasileiras: (*Maytenus ilicifolia*) "Espinheira santa" e outras, Brasília: CEME/AFIP, 1988. p.5-20.

MACEK, K., Ed. Pharmaceutical applications of thin-layer and paper chromatography. Amsterdam: Elsevier, 1972. Cap. 18, p.601.

MANDICH, L.; BITTNER, M.; SILVA, M.; BARROS, C. Phytochemical screening of medicinal plants studies of flavonoids. Revista

Latino-Americana de Química, 15(2):80-2, 1984.

MARINI-BÉTTOLO, G.B. Preliminary chemical screening of medicinal plants in field conditions. World Health Organization, WHO, DPM/80,5, 1980.

MARKHAN, K.R. Techniques of flavonoid identification. London: Academic, 1982. p.31-4.

MATTOS, J.R. Celastraceae (M. ilicifolia). In: Flora do Rio Grande do Sul. s. ed. :São Paulo, 1965. v.7 p.37.

MEERE, J. Nevenwerkingen van medicinale planten. Pharm. Tijdschrift voor Belgie, 60(1):5-10, 1983.

MELLO, J.C.P. Desenvolvimento galênico de macerados de Baccharis trimera (less.) DC. - Compositae (carqueja). Porto Alegre: Curso de Pós-Graduação em Farmácia da UFRGS, 1989. Dissertação (Mestrado em Farmácia), p.136.

MELLO, J.F. Plants in traditional medicine in Brasil. Journal of Ethnopharmacology, 2:49-55, 1980.

MELO, A.M.; JARDIM, M.L.; SANTANA, G.F.; LACET, Y.; LOBO FILHO, J.; LIMA, O.G. & D'ALBUQUERQUE, J.L. Primeiras observações do uso tópico da primina, plumbagina e maitenina em pacientes portadores de câncer de pele. Revista do Instituto de Antibióticos, Recife, 14(1/2):9-17, 1974.

MENßEN, H.G. Standardisierung und Zubereitungsformen von Phytopharmaka. Pharmazeutische Zeitung, 124(6):233-6, 1979.

MENßEN, H.G. Standardisierung von Phytopharmaka. Deutsche Apotheker Zeitung, 121(24):1255-9, 1981.

MIQUEL, I.A.; GUIL, Urticineae. In: de MARTIUS, C.F.P. et alii. Flora brasiliensis; enumeratio plantarum. Monaco : R. Oldenburg, 1840-1906. Reimpressão: Weinheim: J. Cramer, 1965-7. v.IV, pt 1, p.213.

1632 ed.
1480. p.1401.

- PAL, S.C. & NANDY, A. Effect of dilute alcohol, duration of maceration and pH of the total solid contents in the preparation of tincture of *Eugenia jambolana* Lam. (Myrtaceae). Research and Industry, 28:32-4, 1983.
- PARIS, R. & HURABIELLE, M. Abregé de matière médicale (pharmacognosie). Paris: Masson, 1980. Tomo 1. p.14-6.
- PARROT, E.L. Galenical extraction. In: _____. Pharmaceutical Technology. 3rd ed., Minneapolis: Burgess, 1971. p.241-9.
- PATRI, G. De la importance d'une bonne connaissance de plantes utilisées en cosmétique. Parfums, Cosmétiques, Arômes, 56:79-80, 1984.
- PEREIRA, V.M. Contribuição ao estudo do princípio ativo e outros constituintes básicos do *Maytenus ilicifolia*. Revista Brasileira de Química, 14(322):416-7, 1962.
- PETERS, W.S. & SUMMERS, G. Análise estatística e processo decisório. Rio de Janeiro: Universidade de São Paulo, 1973.
- PETROVICK, P.R.; SONAGLIO, D.; MELLO, J.C.P.; FRANCO, S.L.; CARDOSO, M.L.C.; KNORST, M. Eficácia terapêutica e padronização de fitoterápicos. In: Simpósio de plantas medicinais do Brasil, 10, 1988. São Paulo. Resumos... São Paulo: s.e., 1988. p.6/9-18.
- PHARMACOPEE française, 9eme ed., Moulin-lés-Metz: Maisonneuve, 1976.
- PIO CORREA, M. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro : Imprensa Nacional, 1952. v.6, p.134-5.
- PRISTA, L.N. Plantas que embelezam, curam e matam. Revista Portuguesa de Farmácia, 32(3-4):133-47, 1982.

- REICHER, F.; SIERAKCWSKI, M.R. e CORRÊA, J.B.C. Determinação espectrofotométrica de taninos pelo reativo fosfotúngstico-fosfomolibdico. Arquivos de biologia e Tecnologia, 24(4):407-11, 1981.
- RENNÓ, L.R. A flora brasileira como fonte de medicamentos. Revista Brasileira de Farmácia, 52(2):65-70, 1971.
- RIBÉREAU-GAYON, P. Les composés phenoliques des végétaux. Paris: Dunod, 1968.
- ROBERT, G.; WAGINAIRE, L.; VIONERY, M. Bonnes pratiques de fabrication des extraits végétaux. Labo-Pharma-Problèmes techniques, 228:553-5, 1979.
- ROSS, M.S.F. & BRAIN, K.R. From plant to isolate. In: _____. An introduction to phytopharmacy. 1st ed., London: Pitman Medical, 1977. p.51-73.
- SCHVARTZMAN, J.B.; KRIMER, D.B.; MORENO AZORERO, R. Citotoxic effects of decoctions of the medicinal plant *M. ilicifolia* (cancerosa). Revista da Sociedade Científica del Paraguay, 16(1/2):63-8, 1976.
- SIMÕES, C.M.O.; MENTZ, L.A.; SCHENKEL, E.P.; IRGANG, B.E.; STEHMANN, J.R. Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1986. p.74.
- STELLFELD, C. A espinheira santa. Boletim da Associação Brasileira de Farmácia, 15:551-70, 1934.
- STELLMACH, B. Herstellung und Standardisierung von Pflanzenextrakten. Chemische Industrie, 32:165-70, 1980.
- TREASE, G.E. & EVANS, W.C. Factors involved in the production of drug. In: _____. Pharmacognosy. 11th ed., London: Ballière-Tindale, 1978. Cap. 14, p. 169-201.

THENSEN, R. Phytoterapeutika - nicht immer harmlos.
Pharmazeutische Zeitung, 133(1):38-43, 1988.

VALERY, P.P.F. Boas normas de fabricação de produtos farmacêuticos. Brasília: Central de Medicamentos, 1989.

VARGAS, V.M.F.; MOTTA, V.E.P.; ALICE, C. B.; GUIDOBONO, R.R.; HENRIQUES, J.A.P. Estudo da atividade mutagênica de extratos vegetais com uso em medicina popular. Revista Brasileira de Farmácia, 70(3):65-7, 1989.

VOIGT, R. & BORNSCHEIN, M. Tratado de tecnologia farmacêutica. 3. ed. Zaragoza: Acribia, 1982. p.66-71.

VOIGT, R. & BORNSCHEIN, M. Tratado de tecnologia farmacêutica. 3. ed. Zaragoza: Acribia, 1982. p.487-513.

YATES, F. The design and analysis of factorial experiments. Harpeuden: Imperial Bureau of Soil Science, 1937. p.36-9.

ZHI-CEN, L. General control methods for vegetable drugs. Geneva: World Health Organization, 1980.