DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO DE SOLUÇÕES EXTRATIVAS AQUOSAS DE *PHYLLANTHUS NIRURI* L. (QUEBRA-PEDRA) EMPREGANDO PLANEJAMENTO FATORIAL

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

Laboratório de Desenvolvimento Galênico, CPG-Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia - UFRGS

RESUMO: Planejamento fatorial do tipo 3^2 foi realizado para avaliar a influência dos parâmetros: técnica de extração (infusão/decocção); proporção planta:solvente (2,5 % e 7,5 %) e tempo de extração (5 e 15 minutos), sobre o teor de flavonóides encontrado em soluções extrativas aquosas de *Phyllanthus niruri* L. A solução que apresentou maior teor de flavonóides teve suas características físico-químicas determinadas.

UNITERMOS: Soluções extrativas aquosas, *Phyllanthus niruri*, Desenvolvimento galênico, Planejamento fatorial, Otimização, Padronização.

ABSTRACT: ***TECHNOLOGICAL DEVELOPMENT OF AQUEOUS EXTRACTS FROM PHYLLANTHUS NIRURI L. BY USING OF FACTORIAL DESIGN.*** A factorial design 3^2 was used to evaluated the influence of extraction technique (infusion/decoction), plant: solvent ratio (2.5 % and 7.5 %), and extraction time (5 and 15 minutes) on the total flavonoids content of aqueous extractive solutions from *Phyllanthus niruri* L. The extractive solution that showed higher total flavonoid content had their physico-chemical characteristics determinated.

KEYWORDS: Aqueous extractive solutions, *Phyllanthus niruri*, Galenical development, Factorial design, Optimization, Standardization

INTRODUÇÃO

As partes aéreas de *Phyllanthus niruri* L. (Euphorbiaceae), amplamente conhecida no Brasil como quebra-pedra, tem sido freqüentemente utilizada sob a forma de chá para o tratamento de distúrbios renais e hepáticos (1, 2, 3). Os estudos desenvolvidos demonstraram, através de ensaios em animais e humanos, a eficiência do vegetal em questão (4, 5).

Entretanto, a escassez de estudos direcionados a padronização da obtenção de soluções extrativas a partir de plantas medicinais, faz com que, tanto o *P. niruri* quanto uma infinidade de matérias-primas vegetais brasileiras sejam submetidas a processos extrativos que comprometem a qualidade, a eficácia e até a segurança do uso proposto.

Neste sentido a obtenção de soluções extrativas estandardizadas representa um passo imprescindível para o desenvolvimento de um produto que atenda as prerrogativas legais (6).

A primeira etapa é avaliação da operação de extração. Freqüentemente são empregadas misturas de solventes, tais como etanol, metanol ou acetona com água, com o objetivo de aumentar o rendimento das substâncias de interesse, baseando-se, principalmente, na sua solubilidade e estabilidade (7). Porém, para muitas espécies vegetais, entre elas o *P. niruri*, o grupo de substâncias responsáveis pela atividade é desconhecido. Nestes casos, normalmente, tanto a escolha do método de extração quanto o meio de extração baseia-se em estudos etnofarmacológicos e clínicos. Os relatos encontrados para *P. niruri* demonstram o emprego de água como solvente e infusão e decocção como técnicas de extração.

A obtenção de uma solução extrativa estandardizada requer o conhecimento de suas propriedades tecnológicas e/ou físico-químicas, bem como dos fatores que influenciam as mesmas, criando condições para avaliar a manutenção e a reprodutibilidade de sua qualidade. Desta maneira, é necessário detectar e estudar os efeitos de tais fatores, os quais podem ser estimados através da realização de um planejamento fatorial (8, 9, 10).

Os projetos fatoriais são, em geral, os mais eficientes para a determinação do efeito de dois ou mais fatores sobre propriedades específicas relacionadas a uma determinada operação. Através de seu emprego pode se estabelecer todas as possíveis combinações dos níveis de cada fator, e assim determinar qual ou quais fatores causa ou causam compatibilidade ou incompatibilidade. A realização de uma análise fatorial com objetivo de otimizar formulações

farmacêuticas emprega modelos estatísticos que permitem assegurar o resultado, diminuindo a possibilidade de erros aleatórios (8, 9 ,10).

Através da caracterização do produto obtido pela otimização é possível estabelecer parâmetros para avaliação da qualidade. Para soluções extrativas a caracterização se dá pela determinação de pH, densidade, resíduo seco, perfil qualitativo e quantitativo de constituintes químicos, entre outros.

METODOLOGIA

1.Material vegetal: A matéria-prima vegetal, constituída das partes aéreas de *Phyllanthus niruri* L., foi fornecida pelo Eng. Agr. Ílio Montanari Jr. - Centro Distribuidor da CEME (CPQBA/UNICAMP), coletadas em janeiro de 1996.

2.Planejamento fatorial: Para avaliar a influência de fatores específicos sobre as propriedades da solução extrativa aquosa foi realizado um planejamento fatorial do tipo 3^2 onde foram estudados três fatores em dois níveis (tab. 1). Os fatores foram selecionados baseando-se nas condições empregadas nos estudos clínicos realizados (5). Os experimentos foram ordenados ao acaso e sem reposição (tab. 2). O teor de flavonóides totais foi utilizado como parâmetro de avaliação dos experimentos. O resultado dos efeitos de um ou mais fatores e das interações entre os fatores sobre o teor de flavonóides totais na solução extrativa foi calculado empregando-se a forma padrão de desenhos fatoriais (tab. 3).

Tabela 1. fatores e níveis para realização do desenho fatorial

FATORES	NÍVEIS	
A: Técnica de extração	+	Decocção
	-	infusão
B: Proporção planta:solvente (m/V)	+	7,5:100
	-	2,5:100
C: Tempo de extração (min)	+	15
	-	5

Tabela 2. Combinações dos fatores para a realização dos experimentos.

experimento (número)	combinações	Fator e nível		
		A	B	C
1	(1)	-	-	-
2	a	+	-	-
3	b	-	+	-
4	ab	+	+	-
5	c	-	-	+
6	ac	+	-	+
7	bc	-	+	+
8	abc	+	+	+

teor de flavonóides totais na solução extrativa foi calculado empregando-se a forma padrão do delineamento fatorial (tab. 3).

A influência de um determinado fator sobre o teor de flavonóides totais na solução extrativa corresponde a diferença da média aritmética entre os tratamentos com o nível superior e o nível inferior deste mesmo fator (tab. 4, eq. 1, 2 e 3). A influência das interações duplas foi obtida através da metade da diferença entre o efeito do primeiro fator no nível superior do segundo fator e do primeiro fator no nível inferior do segundo fator (tab. 4, eq. 4, 5 e 6). A interação tripla foi determinada como a metade da diferença entre a interação dos dois primeiros fatores com o terceiro fator nos níveis superior e inferior (tab. 4, eq. 7).

2.1.Análise da variância do desenho fatorial: Para análise estatística do planejamento fatorial foi empregado o método de YATES (11), seguido do método proposto por DANIEL (12) para planejamentos fatoriais não replicados (8)

3. Caracterização da solução estandardizada:

3.1.Teor de Flavonóides Totais: Cerca de 15 g da solução extrativa estandardizada foram submetidos a determinação descrita por SOARES (13). O resultado foi expresso pela média de três determinações com três repetições.

Tabela 4. Equações para avaliação de experimentos do tipo 3^2

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

Tabela 3. A

Tratam								
(1)								
a								
b								
ab								
c								
ac								
bc								
abc	+	+	+	+	+	+	+	y_8

O resultado dos efeitos de um ou mais fatores e das interações entre os fatores sobre o

3.2.Determinação do resíduo seco: Determinado por gravimetria. O resultado foi calculado em

relação a 100 g da solução extrativa, pela média de quatro determinações, expresso em percentagem ponderal (14).

3.3.Determinação da densidade relativa: Determinado pelo emprego de picnômetro. O resultado expressa a média de três determinações (15).

3.4.Determinação do pH: O pH da solução extrativa foi medido a 25 °C em potenciômetro calibrado com soluções tampão de fosfato e acetato, pH 7,0 e 4,0, respectivamente. O resultado foi calculado pela média de cinco determinações (14).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

A primeira observação dos resultados foi realizada através da análise da variância (ANOVA) de uma entrada, para os valores do teor de flavonóides obtidos diretamente dos experimentos (tab. 5). A análise da variância apresentou uma diferença altamente significante (F_{calc} = 2375,35; $Fcrit_{0,01[7,16]} \leq 4,14$) para o teor de flavonóides totais quando houve mudança de níveis para os fatores avaliados no experimento. Porém, esta ferramenta estatística não permite afirmar se todos os tratamentos são estatisticamente diferentes. A comparação das média do teor de flavonóides totais através do teste de Student-Newman-Keuls (8), possibilitou identificar que apenas o tratamento "c" não apresentou diferença significante quando comparado com o tratamento *(1)*. Ou seja, o resultado obtido para o tratamento "c" não foi diferente do resultado obtido para o tratamento *(1)* ($\alpha \leq 0,05$).

Tabela 5. Teor de flavonóides totais (TFT x 10^4) para soluções extrativas aquosas de *P. niruri* L.

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

Uma avaliação preliminar sobre o tipo e a intensidade dos efeitos e das interações entre os fatores estudados sobre o teor de flavonóides totais pode ser visualizada através dos resultados obtidos diretamente da forma padrão do um planejamento fatorial (tab. 6).

Os resultados obtidos e apresentados na tabela 6 demonstram que, entre os fatores principais, a passagem dos níveis inferiores para os superiores proporcionou um aumento no teor de flavonóides totais. A decocção (nível superior) foi mais efetiva na extração dos marcadores do que a infusão (nível inferior). Este aumento pode ser explicado pela propriedade hidrófoba deste grupo de substâncias, a qual é contornada pelo aporte de calor no processo extrativo. Desta forma, a manutenção de calor durante todo o processo de extração, no caso da decocção, é a provável responsável pelo efeito positivo. O aumento da relação planta/solvente (fator B) influencia positivamente a concentração de flavonóides totais extraídos, o que quer dizer que, quando este fator muda do nível inferior (relação planta/solvente = 2,5:100; m/V) para o nível superior (relação planta/solvente = 7,5:100; m/V), há aumento da eficiência de extração destas substâncias. Entretanto, a intensidade do fator B é aproximadamente duas vezes maior que a do fator A. O fator C (tempo de extração) aparenta também ter efeito sobre a quantidade de flavonóides totais. O aumento do tempo de contato entre a droga e o solvente produziu um incremento no teor de flavonóides extraído. O efeito causado pela passagem do nível inferior (tempo de 5 min) para o nível superior (tempo de 15 min) causou, entretanto, influência menor do que os outros dois anteriormente citados. As interações secundárias

Tabela 6. Efeitos e interações (E/I) a partir da forma padrão do planejamento fatorial.

Efeito/Interação	Valor estimado
E_A	+16,18
E_B	+39,03
E_C	+3,30
I_{AB}	+2,85
I_{AC}	+0,07
I_{BC}	+0,31
I_{ABC}	-0,69

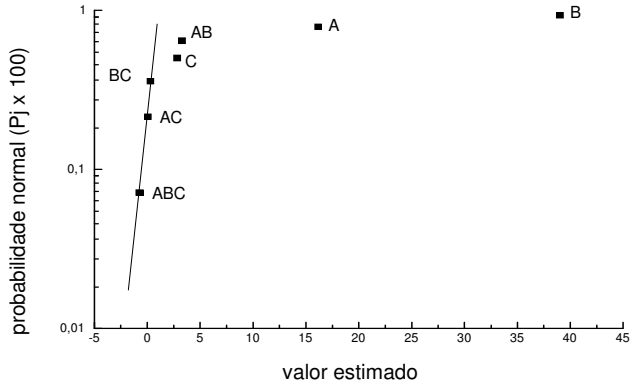

Figura 1. Representação gráfica em rede de probabilidade normal dos efeitos e interações estimados

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

Os resultados obtidos na tabela 6 devem, no entanto, ser compreendidos como indicadores de tendência, necessitando comprovação estatística.

A estimativa de erros neste tipo de planejamento fatorial consiste em supor que determinadas interações de ordem superior não apresentam influência importante e em combinar seus quadrados médios para estimar o erro. Quando se observam interações de ordem superior, o uso do quadrado médio do erro obtido por combinação ou agrupamentos de interações de ordem superior é inadequado. Entretanto o método de análise proposto por DANIEL (12) representa um meio sensível de superar este problema. O método consiste em representar os efeitos estimados em rede de probabilidade normal. Os efeitos não importantes distribuem-se normalmente com média igual a zero, tendendo a situar-se ao longo de uma linha reta neste gráfico, enquanto efeitos importantes significantes, com médias distintas de zero, não se situam ao longo desta reta (8).

Para análise do planejamento fatorial realizado, os efeitos estimados foram ordenados por intensidade (tab. 7) e representados em rede de probabilidade normal (fig. 1).

O gráfico da probabilidade normal dos efeitos estimados, apresentado na figura 1, demonstra que os efeitos A, B e C, e a interação AB merecem interpretação. As interações AC, BC e ABC não são importantes.

A análise da variância dos dados obtidos para os efeitos e interações foi realizada pelo cálculo da média dos quadrados segundo YATES (11). O erro foi calculado como a média simples das interações que não apresentam influência importante identificadas pelo gráfico da figura 1 e assinaladas na tabela 8 como não significante (NS).

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

Para avaliar a adequabilidade do modelo empregado foi realizado um teste de ajuste de modelo. A principal técnica para comprovação deste modelo é realizada através da análise dos resíduos (8). A avaliação indicou que os únicos efeitos significativos são devidos a A , B e AB, com valores estimados, respectivamente, de 28,06; 50,42 e 74,44. Caso este resultado seja verdadeiro, o teor de flavonóides totais estimado

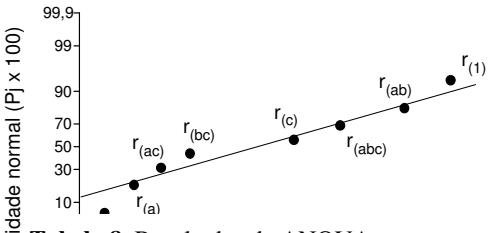

Tabela 8. Resultados da ANOVA para o teor de flavonóides

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

Fcrit.: $\alpha \leq 0,05 = 18.5$*; $\alpha \leq 0,025 = 38,5$**; $\alpha \leq 0,01 = 98,5$***

(TFT$_{ext}$) nos vértices do desenho será:

$$TFT_{ext} = 45 + \frac{28,06}{2} x_1 + \frac{50,42}{2} x_2 + \frac{74,44}{2} x_1 x_2$$

onde:

45 = valor médio do teor de flavonóides, e as variáveis x_1 e x_2, assumem os valores +1 ou -1 de acordo com o sinal obtido pelos valores estimados (tab. 6).

Os resíduos, obtidos pela diferença entre o teor de flavonóides experimental e o teor de flavonóides calculado segundo a equação acima (tab. 9), ao serão representados em rede de probabilidade normal apresentaram desvio pouco significativo de linearidade (fig. 2), o que sugere a adequabilidade do modelo estatístico proposto.

Os resultados obtidos pelo planejamento fatorial, a solução extrativa que apresentou maior teor de flavonóides totais foi a resultante do emprego do nível superior do fator A (decocção), no nível superior para o fator B (relação planta/solvente = 7,5:100 (m/V)). Para a eleição do fator C (tempo de extração), como não apresentou influência estatisticamente significante e os dados etnofarmacológicos demonstram que o tempo de

extração empregado se encontra entre 10 e 30 minutos, foi determinado o tempo de 15 minutos (5). A solução extrativa selecionada teve suas características físico-químicas determinadas, apresentando resíduo seco de 2,13 ± 0,01 (%, m/m) (CV = 4,34 %). Este parâmetro possui especial interesse para o desenvolvimento de produtos derivados (16,17).

Devido à comprovada influência do pH sobre a estabilidade de soluções extrativas vegetais e sua composição química (18), a sua determinação é fundamental para inferências sobre a qualidade do produto. A solução extrativa aquosa de *P. niruri* L. apresentou valor de pH igual a 4,74 ± 0,0045 (CV% = 0,1) e como densidade relativa 1,0087 ± 0,0003 (CV% =0,03).

CONCLUSÕES

O emprego de planejamento fatorial na otimização de soluções extrativas vegetais apresentou-se como uma ferramenta econômica cercada de modelos estatísticos que permitem a obtenção de resultados confiáveis.

Entre os fatores principais estudados, a técnica de extração e proporção planta/solvente, foram os principais responsáveis pela variação no teor de flavonóides totais. A técnica de extração apresentou influência mais marcante sobre o parâmetro referência que a relação planta/solvente.

Para as interações apenas a interação entre os fatores técnica de extração e proporção planta/ solvente apresentaram influência estatisticamente significante sobre o teor de flavonóides totais ($\alpha \leq 0,025$).

O fator tempo de extração não apresentou influência significante sobre o teor de flavonóides totais em soluções extrativa aquosas de *P. niruri* L. Desta forma, baseado em dados etnofarmacológicos e nos ensaios clínicos, foi escolhido o valor de 15 minutos para este fator.

As condições selecionadas através emprego do planejamento fatorial para obtenção de uma solução extrativa com maior rendimento de flavonóides foi a que apresentou níveis superiores para os fatores técnica de extração e proporção planta/solvente (decocção e 7,5%, respectivamente), e como tempo de extração 15 minutos.

Tabela 9. Resíduos para o planejamento fatorial 32 empregando soluções extrativas aquosas de *P. niruri* L.

Tratamentos	TFT_{exp} ($x10^4$)	TFT_{calc} ($x10^4$)	Resíduo
(1)	20,00	16,82	3,18
a	28,06	30,15	-2,09
b	50,42	53,00	-2,58
ab	74,44	72,03	2,41
c	20,69	20,12	0,57
ac	31,81	33,45	-1,64
bc	55,14	56,30	-1,16
abc	76,67	75,33	1,34

TFT = teor de flavonóides totais; exp = experimental; calc = calculado

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1.SIMÕES, C.M.O.; MENTZ, L.A.; SCHENKEL, E.P.; IRGANG, B.E.; STEHMANN, J.R. *Plantas da medicina popular do Rio Grande do Sul*. 5 ed., Porto Alegre: UFRGS, 1998.

2.MATOS, F.J.A. Quebra-pedra: *Phyllanthus amarus* Schum, *et* Thorn, *P. niruri* L. e *P. urinaria* L. In: *Plantas medicinais: guia de relação e emprego de plantas medicinais do Nordeste do Brasil*. Fortaleza: IOCE, v. 2, p. 73 1989.

3. CRUZ, G.L. *Dicionário de plantas úteis do Brasil*. 3.ed. Rio de Janeiro: Civilização Brasileira, 1985. p. 327-328.

4.VENKATESWARAN, P.S.; MILLMAN, I.; BLUMBERG, B.S. Effects of an Extract from *Phyllanthus niruri* on Hepatitis B and Woodchuck Hepatitis Viruses: *In vitro* and *in vivo* Studies. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, v. 84, p. 274-278, 1987

5.SANTOS, D.R. *Chá de quebra-pedra (Phyllanthus niruri) na litíase urinária em humanos e em ratos*. São Paulo: Escola Paulista de Medicina. 1990. Dissertação (Mestrado em Farmacologia)

6.PETROVICK,P.R. Tecnologia de fitoterápicos um desafio a vencer. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 14, 1996, *Resumos*...Florianópolis: UFSC, 1996, p. 25.

7.VOIGT, R. *Pharmazeutische Technologie*. 7. überarb. Aufl., Berlin: Ullstein Mosby, 1993.

8.MONTGOMERY, D.C. *Diseño y análisis de experimentos*. México: Iberoamérica, 1991.

9.DAVIES, L. *Efficiency in Research, Development: The Statistical Design and Analysis of Chemical Experiments*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1993. p. 73-86.

10.MORGAN, ED. Chemometrics: Experimental Design. London: John Wiley, 1995.

11.YATES, F. *The Design and Analysis of Factorial Experiments*. London: Imperial Bureau of Soil Science, 1937.

12.DANIEL, C. Use of Half-Normal Plots in Interpreting Factorial Two Level Experiments. *Technometrics*, v.1, p. 311-342, 1959.

13.SOARES, L.A.L. *Padronização de extrato aquoso e desenvolvimento de produto seco por aspersão de Phyllanthus niruri L.- Euphorbiaceae (quebra-pedra)*. Porto Alegre:

UFRGS, Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, 1997. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)

14. BÖHME, H.; HARTKE, K. *(Hrsg.) Deutsches Arzneibuch - 8. Ausgabe 1978 - Kommentar*. Stuttgart: Wissenschaftliche, 1981. p. 15-16.

15. FARMACOPÉIA Brasileira. 4 ed., São Paulo: Atheneu,1988.

16. LIST, P.H., SCHMIDT, P.C. *Phytho-pharmaceutical Technology*. Boca Raton: CRC, 1989.

17. LEMOS SENNA, E.; PETROVICK, P.R.; GONZÁLEZ ORTEGA, G.; BASSANI, V.L. Preparation and Characterisation of Spray-dried powders from *Achyroclines satureioides*. (Lam.) D.C. Extracts. *Phytotherapy Research*, v. 11, p.123-127, 1997.

18. SONAGLIO, D. *Padronização do extrato hidroalcoólico das sumidades floridas de Achyrocline satureioides (LAM.) DC. Compositae (Marcela)*. Porto Alegre: UFRGS, Curso de Pós-Graduação em Farmácia, 1987. Dissertação (Mestrado em Farmácia).

AGRADECIMENTOS:

Este trabalho recebeu suporte financeiro da CEME/MS e do CNPq (Bolsa de Mestrado do primeiro autor)

Endereço para correspondência:

Prof.Dr.Pedro Ros Petrovick
Faculdade de Farmácia da UFRGS
Av. Ipiranga, 2752
Cx.P. 1945
90610-000 Porto Alegre RS
e-mail: prpetrov@farmacia.ufrgs.br

Recebido em: 9.3.1998
Aceito em: 15.6.1998