

Avaliação por análise fatorial das condições da extração do 4-nerolidilcatecol de *Pothomorphe umbellata* (L). Miq.

Peky Noriega^{1*}, Cristina Dislich Röpke^{1,2}, César Moisés Camilo^{1,2}, Paulo Chanel Deodato de Freitas¹, Silvia Berlanga de Moraes Barros^{1,2}

¹Departamento de Farmácia, ²Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo

Foi avaliada a influência dos fatores (1) tempo: 10 e 40 minutos; (2) tamanho de partícula: 840 e 420 μ m; (3) hidromódulo: 1:50 e 1:100 e (4) temperatura: 40 e 60 °C na extração do 4-nerolidilcatecol, (4-NC) mediante planejamento fatorial “2⁴” em que quatro variáveis foram estudadas em dois níveis (máximo e mínimo). O método de extração foi maceração e a quantificação do 4-nerolidilcatecol foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector eletroquímico. Os resultados da análise fatorial indicam que o fator principal que favorece a extração do princípio ativo é o tamanho de partícula [efeito (2): 12,2086]. Diminuindo o tamanho de partícula aumenta três vezes a quantidade de 4-nerolidilcatecol extraída, enquanto o tempo de maceração [efeito (1): -0,64198], hidromódulo [efeito (3): 1,069804] e temperatura [efeito (4): -0,64198] não influenciam de forma significativa a extração. As interações de dois fatores: (2:3) tamanho:hidromódulo: 1,181142; (2:1) tamanho:tempo: 0,9435065 e (2:4) tamanho:temperatura: 0,0817575 mostraram que apesar do fator tamanho(2) ter favorecido o processo, quando combinado com os demais fatores, não aumenta a eficiência da extração. A metodologia de otimização mediante análise fatorial aplicada ao processo de extração do 4-nerolidilcatecol demonstra a importância do estudo das interações e não de cada fator isolado.

Unitermos

- Fitoterápico
- *Pothomorphe umbellata*
- 4-nerolidilcatecol/extração
- Análise fatorial

*Correspondência:

P. Noriega
Departamento de Farmácia
Faculdade de Ciências Farmacêuticas -
USP
Av. Prof. Lineu Prestes, 580 - Bloco 13
05508-950 - São Paulo - SP, Brasil
E-mail: pekynoriega@hotmail.com

INTRODUÇÃO

A palavra “otimizar” significa fazer tão perfeito, efetivo ou funcional quanto possível (Schwartz, 1981). As técnicas clássicas de otimização resultam da aplicação de cálculos visando alcançar o máximo e o mínimo de uma fun-

ção matemática. (Schwartz, O’Connors, 1995). O planejamento experimental clássico investiga os efeitos de uma variável experimental, enquanto mantém todas as outras constantes (Armstrong, James, 1996). O efeito de um fator é definido como a mudança na resposta causada pela variação de nível ou níveis do fator (Bolton, 1990). O planeja-

mento fatorial evita as dificuldades derivadas da possibilidade de que variáveis possam interagir entre si, proporcionando um meio pelo qual os fatores envolvidos na reação ou no processo possam ser avaliados simultaneamente e determinada a importância relativa de cada um destes fatores (Armstrong, James, 1996), devendo a escolha do fator ser pré-determinada pelo experimentador (Bolton, 1990). Para estudar o efeito de qualquer fator sobre a resposta é preciso fazê-lo variar e observar o resultado dessa variação. Isso implica a realização de ensaios em, pelo menos, dois níveis (Barros Neto *et al.*, 1996). Os níveis de um fator são os valores ou designações arbitrárias do fator. (List, Schmidt, 1989). Um planejamento fatorial em que todas as variáveis são estudadas em apenas dois níveis é o mais simples de todos. Havendo k fatores, o planejamento de dois níveis irá requerer a realização de $2 \times 2 \times \dots \times 2 = 2^k$ ensaios diferentes sendo chamado por isso de planejamento fatorial 2^k . (Barros Neto *et al.*, 1996).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a técnica de extração, na preparação do extrato hidroalcolólico da Pariparoba, *Photomorphe umbellata* (L.) Miq. A maximização dos resultados foi obtida por meio da aplicação de estudos fatoriais, determinando simultaneamente a influência da temperatura, tamanho de partícula, hidromódulo e tempo, apresentando a vantagem de extrair a máxima quantidade de princípio ativo com o mínimo de recursos e tempo.

O uso da pariparoba, *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq, no Brasil foi oficializado pela Farmacopéia Brasileira, em sua primeira edição, na qual as raízes secas do vegetal foram registradas como droga (Silva, 1926). Ela é também conhecida como capeba, caapeba, caapeba-donorte, catajé, malvarisco, capeua, aguaxima, caapeba verdadeira, malvaíscio (Panizza, 1998). No Brasil, ocorre com frequência nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Espírito Santo e sul da Bahia (Peckolt, 1941; Riedel, 1946).

Dentre os princípios ativos presentes na planta, Kijjoa *et al.* (1980) isolaram e caracterizaram por ressonância magnética nuclear (RMN) o 4-nerolidilcatecol (4-NC) a partir de extratos hexânicos de raízes e folhas (Figura 1).

O extrato da planta mostrou atividade antioxidante *in vitro*, quando comparada com α -tocoferol (Barros *et al.*, 1996). Röpke e colaboradores (1999, 2003a) demonstraram a sua atividade antioxidante *in vivo* e atividade fotoprotetora. Foi demonstrada ainda a citotoxicidade do 4-nerolidilcatecol como composto bioativo antitumoral, extraído das folhas de *P. pellata*, (Mongelli *et al.*, 1999). O alcalóide, *N*-benzoilmescalina, isolado das partes aéreas da Pariparoba, mostrou atividade antibacteriana significativa contra o *Helicobacter pylori* (Isobe *et al.*, 2002).

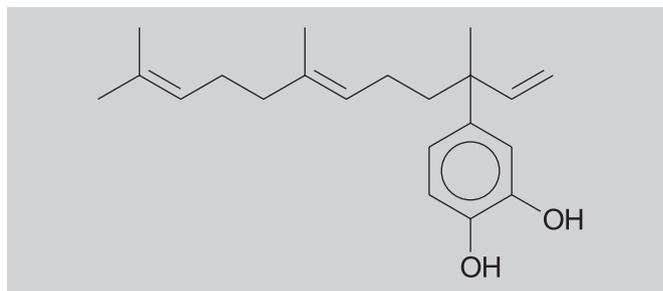


FIGURA 1 - Estrutura química do 4-nerolidilcatecol.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

As plantas de *P. umbellata* foram coletadas nas imediações do Campus da Universidade de São Paulo, durante o mês de fevereiro de 2001. Uma exsicata foi depositada no Instituto de Botânica da USP, com o nome: Pky 01. As plantas foram lavadas e secadas durante 72 horas, em estufa com circulação de ar em temperatura que não ultrapassou 50 °C. O material foi submetido à pulverização em moinho de martelo tipo Wiley, tamis 1 mm. O pó seco foi classificado por tamanho de partícula utilizando o aparelho para granulometria com jogo de tamises, sendo cada porção separada e submetida aos ensaios pertinentes ao experimento.

Métodos

Com o objetivo de extrair a máxima quantidade de 4-nerolidilcatecol da planta moída e seca aplicou-se, na preparação do extrato hidroalcolólico, o planejamento fatorial de quatro fatores em dois níveis (2^4).

Planejamento estatístico

O planejamento fatorial para o estudo do processo de extração foi fundamentado em projeto fatorial de Barros Neto *et al.*, (1996). A abordagem experimental consistiu em variar todas as variáveis ao mesmo tempo. A razão para isso é que variáveis podem se influenciar mutuamente, e o valor ideal para uma delas pode depender do valor da outra. Este comportamento é chamado de interação entre variáveis e é um fenômeno que ocorre com frequência, sendo raras as situações em que duas variáveis atuam de forma independente. Para constituição da matriz de ensaios, foram consideradas 4 variáveis independentes, nos níveis máximo (+) e mínimo (-): (1) tempo: 10 e 40 minutos; (2) tamanho de partícula: mesh (abertura de malha do tamis): 20 e 60; (3) hidromódulo: 1:50 e 1:100 (500 mg:25 mL e 250 mg:25 mL); (4) temperatura: 40 e 60 °C. As variáveis dependentes ou respostas es-

tudadas foram: conteúdo de 4-nerolidilcatecol e pH.

O planejamento fatorial em dois níveis (máximo e mínimo), para quatro fatores: $2^4 = 2 \times 2 \times 2 \times 2$, requer 16 experimentos, que, em duplicata, totalizam 32 experimentos, segundo a Tabela I.

TABELA I - Geratriz do planejamento fatorial 2^4 (List, Schmidt, 1989)

Ensaio (#)	Tempo (min.)	Tamanho (mesh)	Hidromódulo (mg/25 mL)	Temperatura (°C)
1	-	-	-	-
2	+	-	-	-
3	-	+	-	-
4	+	+	-	-
5	-	-	+	-
6	+	-	+	-
7	-	+	+	-
8	+	+	+	-
9	-	-	-	+
10	+	-	-	+
11	-	+	-	+
12	+	+	-	+
13	-	-	+	+
14	+	-	+	+
15	-	+	+	+
16	+	+	+	+

(+) nível máximo, (-) nível mínimo.

Extração do 4-nerolidilcatecol

O esquema do método de extração por maceração em banho termostatzado com agitação mecânica, meio de extração, temperatura, tempo, tamanho de partícula e relação droga/líquido extrator “hidromódulo”, pré-estabelecidos está representado na Figura 2. Este método foi adaptado do estudo sobre a influência de diferentes fatores na extração de taninos do *Hypericum perforatum* descrita por Rafajlovska *et al.*, (1998).

Uma quantidade de pó, exatamente pesada para cada tamanho de partícula determinado, foi colocada em frasco erlenmeyer com 20 mL de meio de extração etanol:água (1:1). O hidromódulo representa a proporção de 1 parte de droga para 1 parte de líquido extrator. Neste caso, a quantidade de líquido extrator é igual para todos os ensaios variando apenas a quantidade de droga pesada, que corresponde a 250 mg ou 500 mg. A extração foi realizada em banho termostático com agitação orbital constante, temperatura de 40 °C e 60 °C e tempo de 10 e 40 minutos (controlados). Uma vez obtido o extrato, este foi filtrado, o volume completado para 25 mL em balão

volumétrico e submetido, previamente, a ultracentrifugação e filtração através de filtro de diâmetro de poro de 0,22 mm (Röpke *et al.*, 2003b)

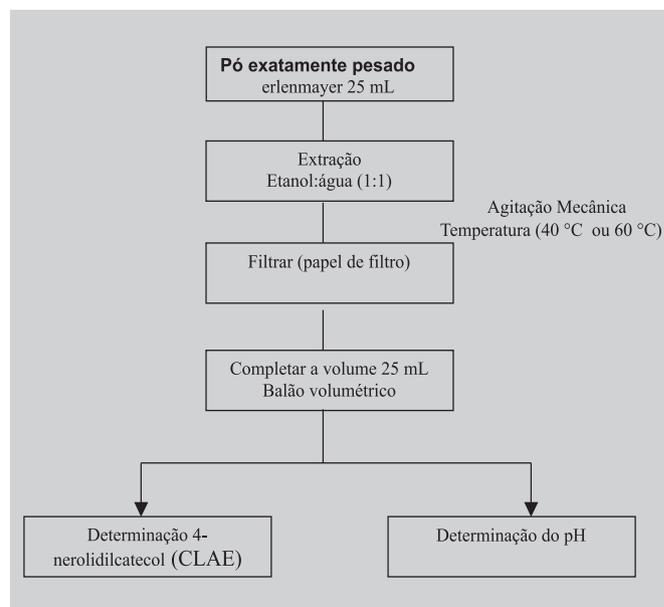


FIGURA 2 - Extração de 4-nerolidilcatecol da planta moída e seca de *P. umbellata*.

Análise quantitativa de 4-nerolidilcatecol por cromatografia líquida de alta eficiência

O 4-nerolidilcatecol extraído foi identificado e quantificado por meio de técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), por comparação com padrão de 4-nerolidilcatecol. O sistema cromatográfico foi composto de bomba Waters Model 510, injetor 7161 Rheodyne dotado de *loop* de 20 mL, detector eletroquímico HP1049A, constituído de um eletrodo de trabalho de placas de carbono-vidro e um eletrodo de referência de estado sólido. O sinal produzido é transmitido a um integrador SP4600. O solvente utilizado foi metanol:água 9:1 com vazão de 1.0 mL/min (KCl 0,074 g; LiClO₄ 1,075g /500 mL). Coluna Supelcosil LC-8, 3 mm, 75X4,6 mm. (Röpke *et al.*, 2003b).

Análise estatística

Foi utilizado o programa **Estatística**® da *Stat Soft*, para o processamento dos resultados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da análise fatorial para determinar a influência das variáveis independentes: tempo, tamanho de partícula, hidromódulo (relação droga/solvente) e temperatura em dois níveis (máximo e mínimo), no processo de extração do 4-nerolidilcatecol, a partir de *P. umbellata*, estão

representados na Tabela II e nos diagramas de Pareto dos efeitos principais nas Figuras 3 e 4 e diagramas das probabilidades nas Figuras 5 e 6 para as respostas ou variáveis dependentes concentração de 4-nerolidilcatecol e pH.

Influência do tamanho de partícula

O conteúdo total de 4-nerolidilcatecol para os dois tamanhos de partículas de 840 e 420 μm (*mesh* 60 e 20) revelou aumento do conteúdo 4-nerolidilcatecol no sistema extrativo devido à redução do tamanho de partícula, tal como apresentado no diagrama de *Pareto* dos efeitos (Figura 3) e no diagrama de probabilidades (Figura 4). O efeito principal (2), tamanho de partícula, foi o efeito mais marcante 12,2086. Este fenômeno pode ser explicado em função do aumento da superfície de contato entre a matéria-prima e o meio de extração. A outra variável dependente ou resposta foi o pH, sendo que neste caso a mudança não foi significativa, tal como mostra o diagrama de Pareto para o efeito do pH (Figura 5) e o diagrama de probabilidades para pH (Figura 6).

Influência do tempo de extração

A maceração do pó com o meio de extração foi avaliada variando o tempo de extração (10 e 40 minutos). Não houve influência significativa do tempo de maceração, Efeito 1: temperatura: -0,64198 (Figuras 3 e 4). O fato do tempo de contato prolongado da matéria-prima com o meio

de extração não ter favorecido o processo de extração do 4-nerolidilcatecol deve-se provavelmente à degradação do composto devido à sua natureza, suscetível à oxidação. Para evitar a influência dos agentes oxidantes, seria necessária a inclusão de certos agentes antioxidantes no processo de extração do 4-nerolidilcatecol a partir da planta. O pH não foi modificado de forma significativa com este fator (Figuras 5 e 6).

Influência da temperatura de extração

Para os dois níveis de temperatura (40 e 60 °C), não foi observado aumento do conteúdo de 4-nerolidilcatecol nos ensaios realizados em maior temperatura, efeito (4): temperatura -0,64198 (Figuras 3 e 4). A justificativa para tal comportamento pode ser relacionada à degradação dos componentes da matéria-prima no processo de extração empregando a maior temperatura (60 °C). O pH não teve alterações significativas (Figuras 5 e 6).

Influência da relação entre quantidade de matéria-prima e meio de extração

O hidromódulo é a razão entre a quantidade de matéria-prima e a quantidade de meio de extração na maceração da droga com água: etanol 1:1. Com a relação 1:50 a extração de 4-NC foi menor que a relação sólido:líquido de 1:100 (não significativo), efeito (3): 1,069804 (Figuras 3 e 4). O

TABELA II - Resultados de planejamento fatorial 2^4 para estudar a influência do tempo, tamanho de partícula hidromódulo e temperatura na extração do 4-nerolidilcatecol da *Pothomorphe umbellata*

Ensaio	Tempo (min.)	Tamanho (mesh)	Hidro-módulo	Temperatura (°C)	Resposta % 4NC	Desvio Padrão	Resposta pH	Desvio Padrão
1	10	20	1:50	40	0,7472	0,0236	6,69	0,0566
2	40	20	1:50	40	0,6433	0,0738	6,785	0,0071
3	10	60	1:50	40	2,4448	0,2452	6,625	0,0212
4	40	60	1:50	40	3,1126	0,3892	6,67	0,0283
5	10	20	1:100	40	0,6805	0,0477	6,72	0,0566
6	40	20	1:100	40	0,6388	0,1000	6,715	0,0636
7	10	60	1:100	40	2,8581	0,2695	6,645	0,0212
8	40	60	1:100	40	4,229	0,2767	6,685	0,0919
9	10	20	1:50	60	0,5311	0,0456	6,745	0,0071
10	40	20	1:50	60	0,5385	0,0349	6,8	0,0283
11	10	60	1:50	60	2,9121	0,3214	6,685	0,0353
12	40	60	1:50	60	3,0219	0,5238	6,65	0,0848
13	10	20	1:100	60	0,4428	0,0187	6,715	0,0495
14	40	20	1:100	60	0,6043	0,0848	6,775	0,0636
15	10	60	1:100	60	3,4151	0,0590	6,395	0,3465
16	40	60	1:100	60	2,8395	0,2379	6,775	0,1202

aumento na quantidade do meio de extração não contribuiu para a extração de maior quantidade do componente, sendo que a quantidade de água utilizada no meio de extração poderia favorecer processos hidrolíticos, diminuindo deste modo a quantidade de 4-NC extraído. O pH não teve mudanças significativas (Figuras 5 e 6).

Interações

O método de otimização mostrou que o principal fator que favorece a extração do princípio ativo é a diminuição do tamanho de partícula (*mesh* 60), aumentando três vezes a quantidade de 4-nerolidilcatecol extraída,

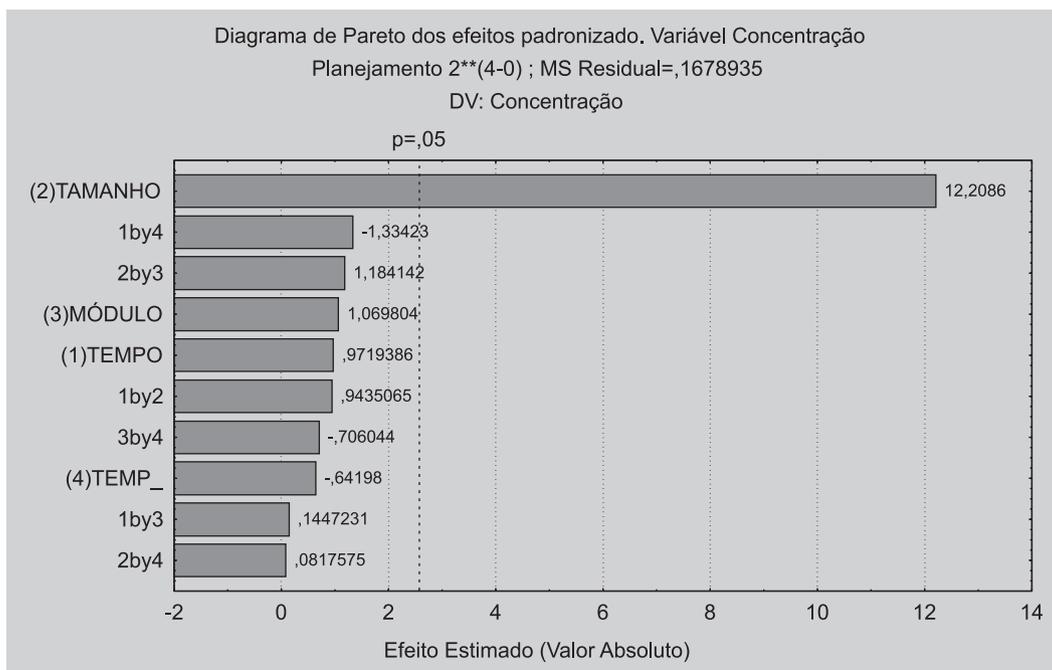


FIGURA 3 - Diagrama de Pareto dos efeitos da extração do 4-nerolidilcatecol.

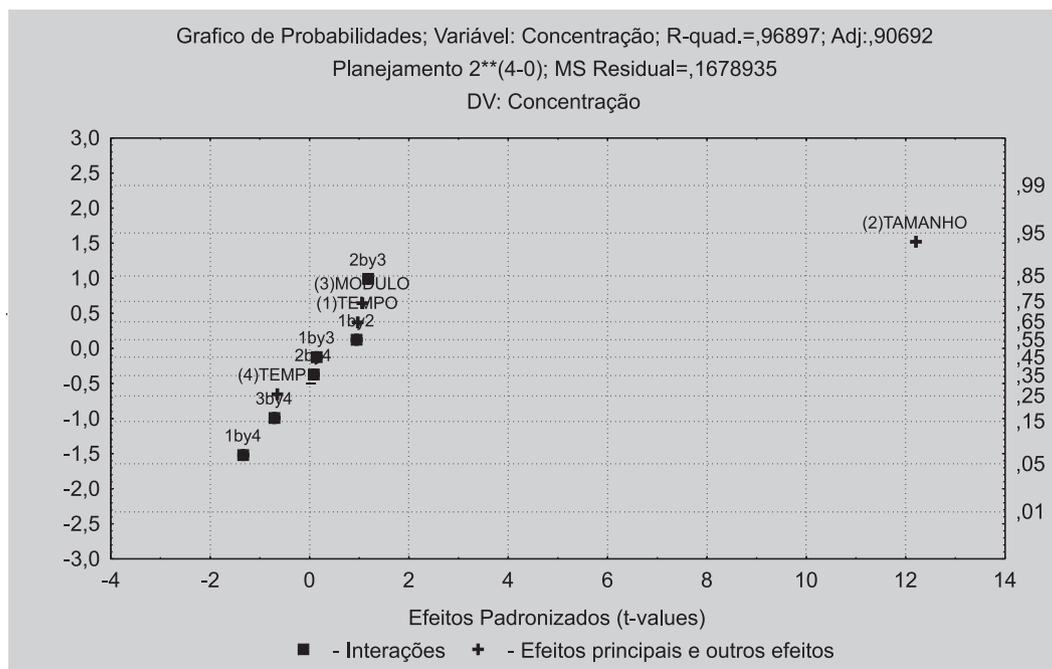


FIGURA 4 - Diagrama de probabilidades da extração do 4-nerolidilcatecol.

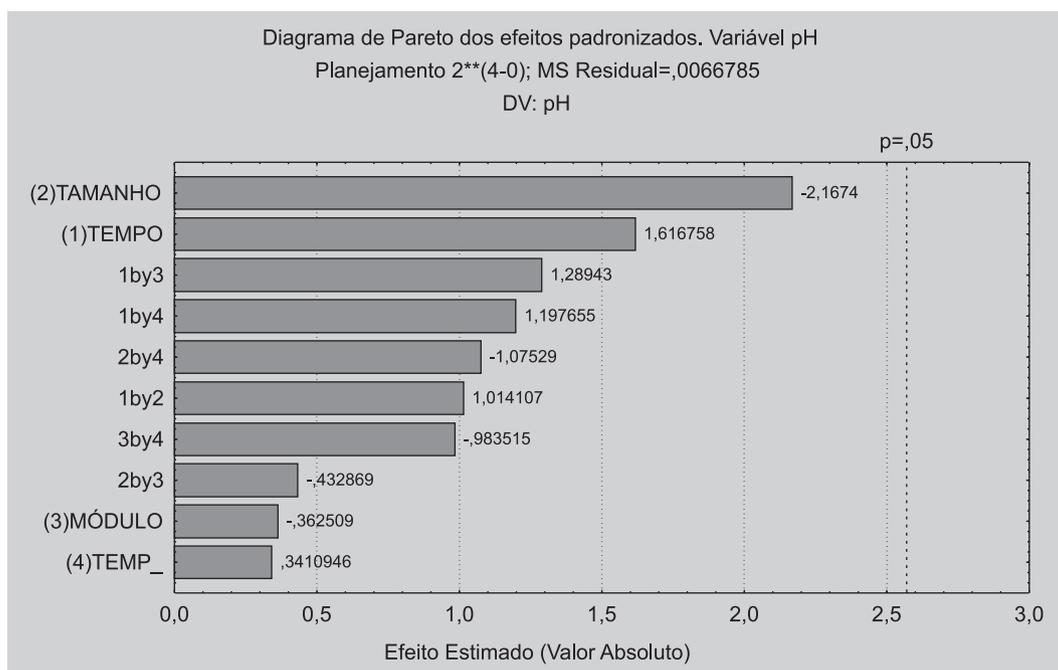


FIGURA 5 - Diagrama de Pareto dos efeitos do pH.

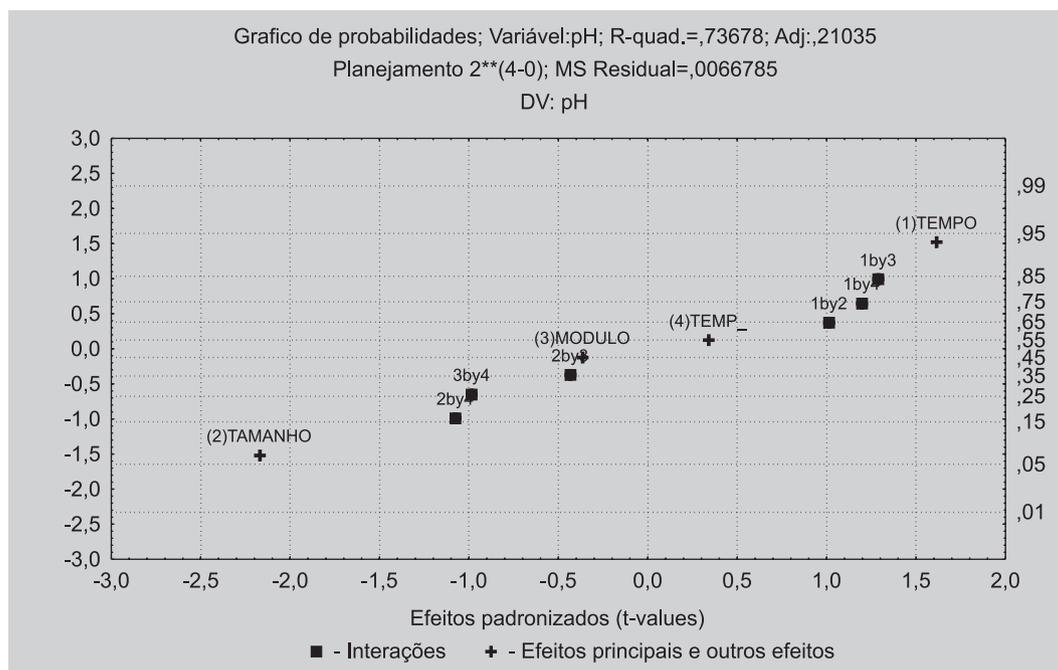


FIGURA 6 - Diagrama de probabilidades do pH.

enquanto que os outros fatores estudados não aumentam a eficiência do processo.

Considerando que o fator (2), tamanho de partícula, foi aquele que influenciou de forma significativa o processo de extração poderíamos apresentar as interações em três categorias, de acordo com sua relação com este fator, a saber:

Interações de dois fatores

Podemos observar que no caso das interações de dois fatores. (2:3) tamanho:hidromódulo: 1,181142; (2:1) tamanho:tempo: 0,9435065 e (2:4) tamanho:temperatura: 0,0817575, não obstante o fator tamanho ter favorecido o processo, quando combinado com um outro dos fatores estudados desfavorece a sua eficiência.

Interações de três fatores

As interações de três fatores para todos os casos não foram capazes de favorecer o processo de extração do 4-nerolidilcatecol mesmo tendo envolvido o fator tamanho de partícula (Figuras 7 e 8).

Interações de quatro fatores

A interação dos quatro fatores, também não influenciou positivamente o processo de extração, indicando, portanto, a

importância de se estudar as interações e não cada fator separadamente.

O problema da padronização de material derivado de plantas representa um grande desafio, especialmente para a reprodução de efeitos terapêuticos. Para a preparação de extratos padronizados, é mais difícil dar uma indicação geral de seletividade, dada a heterogeneidade dos componentes e a grande diferença de polaridade e sua adaptação para o equipamento disponível. Por essa razão, solventes

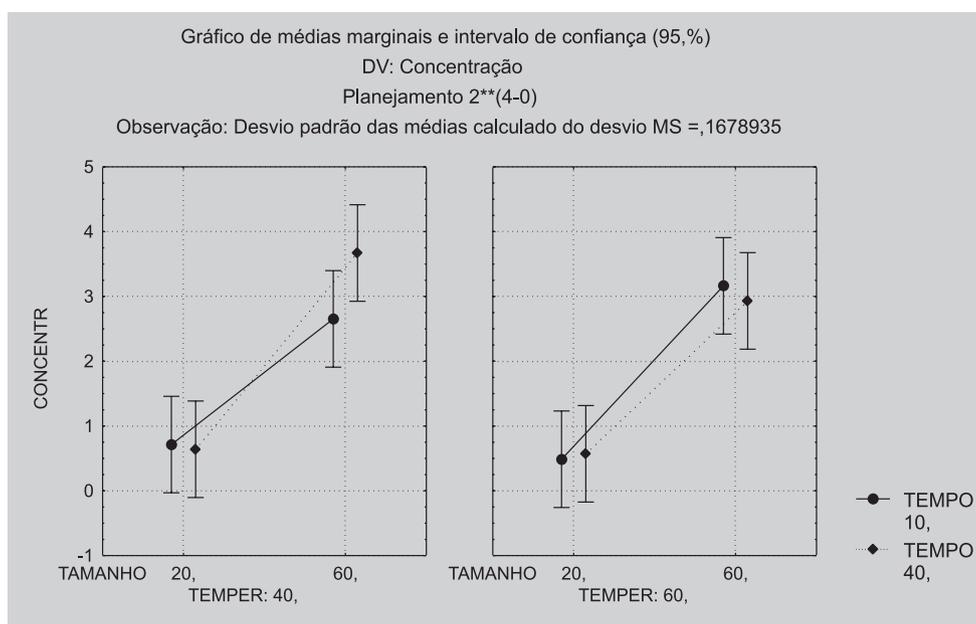


FIGURA 7 - Interações tempo-temperatura-tamanho.

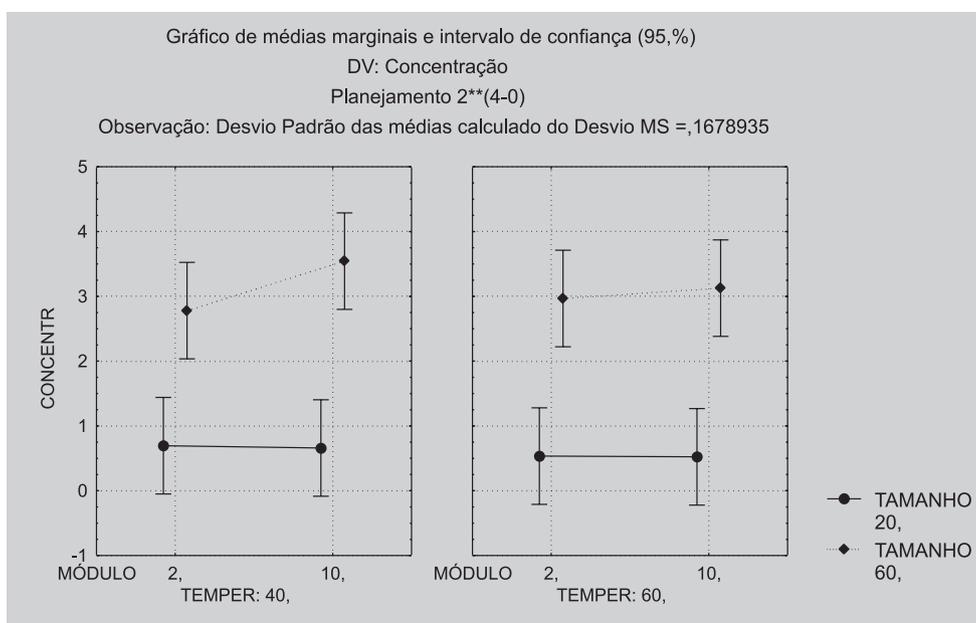


FIGURA 8 - Interações tamanho-temperatura-módulo.

e sistema de extração precisam ser adaptados para todo produto fitoterápico.

Atualmente, para a extração de 4-nerolidilcatecol de *P. umbellata* aplica-se a técnica descrita por Silva (Método A), na 1ª edição da Farmacopéia Brasileira, editada em 1926, por meio de percolação extrativa com solvente etanol:água (1:1). Este método é demorado porque trata-se de uma extração exaustiva e não são levados em conta parâmetros farmacotécnicos que poderiam garantir resultados reprodutíveis para a comercialização do produto, com um custo minimizado.

Os resultados experimentais obtidos podem ser extrapolados e aplicados à indústria, favorecendo a extração deste princípio ativo em larga escala, trabalhando com tamanho de partícula menor que 420 µm e nunca ultrapassando 40 °C durante a extração.

CONCLUSÃO

O método de otimização mediante análise fatorial de quatro fatores em dois níveis aplicada ao processo de extração do 4-nerolidilcatecol das raízes de *Pothomorphe umbellata* mostrou que o principal fator que favorece a extração do princípio ativo seria a diminuição do tamanho de partícula (abertura da malha do tamis 60), aumentando três vezes a quantidade de 4-nerolidilcatecol extraída. Os fatores temperatura, tempo e hidromódulo não favoreceram a extração do 4-NC. A variável dependente ou resposta pH não foi influenciada pelos fatores estudados.

AGRADECIMENTOS

Ao CONICIT-Venezuela, pela bolsa de Doutorado concedida a Pety Noriega. Cristina Dislich Röpke foi bolsista de Doutorado da FAPESP e César Moisés Camilo bolsista de Iniciação Científica PIBIC/CNPq.

ABSTRACT

Evaluation of extraction conditions of 4-nerolidylchatecol from *Pothomorphe umbellata* (L). Miq. using factorial design

The influence of factors: (1) time, 10 and 40 minutes, (2) particle size, 840 and 420 µm; (3) hydromodule, 1:50 and 1:100, and (4) temperature, 40 and 60 °C, in the extraction of 4-nerolidylchatecol (4-NC) from the roots of P. umbellata using factorial design "2⁴" was studied in two levels (maximal and minimal). The extraction method was maceration and the measurement of 4-NC was by HPLC with electrochemical detection. The results of the factorial analysis indicated that the main factor that

increases the extraction of the active principle is particle size [effect (2): 12.2086]. The reduction of the particle size (mesh 60) increases threefold the amount of 4-nerolidylchatecol in the extract, while the time of maceration [effect (1): -0.64198], hydromodule [effect (3): 1.069804] and temperature [effect (4): -0.64198] practically do not influence the extraction. Interaction between two factors (2:3) size-hydromodule 1.181142, (2:1) size-time 0.9435065 and (2:4) size-temperature 0.0817575, showed that although the main factor size (2) increases the efficiency of the process, when one of the other three factors was taken together the amount of 4-NC extracted was not significantly increased. The technique of optimization using factorial analysis to investigate the extraction of 4-nerolidylchatecol showed to be useful to notice the interactions between factors and not only the effect of each isolated factor.

UNITERMS: Factorial design. Extraction. Phytotherapic. Pothomorphe umbellata. 4-nerolidylchatecol.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARMSTRONG, A.; JAMES K. *Pharmaceutical experimental design and interpretation*. Londres: Taylor & Francis, 1996. p. 131-223.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.; BRUNS, R. *Planejamento e otimização de experimentos*. UNICAMP, Campinas, 1996. p.66.
- BARROS, S.B.M., TEIXEIRA, D.S., AZNAR, A.E., MOREIRA JÚNIOR, J.A., ISHII, I., FREITAS, P.C.D. Antioxidant activity of ethanolic extracts of *Pothomorphe umbellata* L. *Miq. Ciênc. Cult.*, São Paulo, v.48, p.114-116, 1996.
- BOLTON, S. *Pharmaceutical Statistics. Practical and clinical applications*. New York: Marcel Dekker, 1990. p. 258-280, 421-452.
- ISOBE, T.; OHSAKI, A.; NAGATA. Antibacterial constituents against *Helicobacter pylori* of brazilian medicinal plant, Pariparoba. *Yakugaku Zasshi.*, v.122, n.4, p. 291-294, 2002.
- KIJOA, A.; GIESBRECHT, A. M.; AKISUE, M. K.; GOTTLIEB, O. R.; GOTTLIEB, H. E. Nerolidylchatecol from *Pothomorphe umbellata*. *J. Med. Plant Res.* v. 39, p 85-87, 1980.

- LIST, P.H.; SCHMIDT, P.C. *Phytopharmaceutical Technology*. London: Heyden, 1989. p. 39-49.
- MONGELLI, E.; ROMANO, A.; DESMARCHELIER, C.; COUSSIO, J.; CICCIA, G. A cytotoxic catechol derivative from *Pothomorphe peltata* inhibits topoisomerase I activity. *Planta Med.*, Stuttgart, v.65, n.4, p.376-378, 1999.
- PANIZZA, S. *Plantas que curam (cheiro de mato)*. 25.ed. São Paulo: Ibrasa, 1997. p.158-161.
- PECKOLT, W. Contribuição à matéria médica vegetal do Brasil: estudo farmacognóstico de *Heckeria umbellata* (L) Kunth. *Mem. Inst. Butantan*, São Paulo, v.15, p.59-68, 1941.
- RAFAJLOVSKA, V.; SLAVESKA, R.; CVETKOV, L.J. Influence of some factors on tannin contents in extracts of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) *Herba Polonica*. Poznan, v. 44, n.4, p. 307-314. 1998.
- RIEDEL, O.O. Subsídios para o estudo farmacognóstico da *Heckeria umbellata* (Linné) kunth. *Trib. Farm.*, Curitiba, v.9, p.269-283, 1941.
- RÖPKE, C.; MEIRELLES, R.; SILVA, V.; SAWADA, T.; BARROS, S. *Pothomorphe umbellata* extract prevents α -tocopherol from depletion after UV-irradiation. *Photochem. Photobiol.*, Augusta, v.78, n.5, p.109-116, 2003a.
- RÖPKE, C.; OSTROSKY, E.; KANEKO, T.; CAMILO, C.; SAWADA, T.; BARROS, S.B.M. Validação de metodologias analíticas para determinação quantitativa de α -tocoferol e 4-nerolidilcatecol. *Rev. Bras. Ciênc. Farm.*, v. 39, n.2 p.209-217, 2003b.
- RÖPKE, C.D. Avaliação da atividade antioxidante de *Pothomorphe umbellata* L. Miq. na pele São Paulo, 1999. 83p. (Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo).
- SCHWARTZ, J.B. Optimization techniques in product formulation. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, New York, v.32, p.287-301, 1981.
- SCHWARTZ, J.B.; O'CONNOR, R.E. *Optimization techniques in pharmaceutical formulation and processing*. In: BANKER, G.; RHODES C., (Eds.). *Modern Pharmaceutics*. 3. ed. New York: Marcel Dekker, 1995, p.727
- SILVA, R.A.D. *Pharmacopéia dos Estados Unidos do Brasil*. São Paulo: Nacional, 1926. p.649.

Recebido para publicação em 12 de maio de 2003.

Aceito para publicação em 27 de janeiro de 2005.