UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE FARMÁCIA

FABIANA FERNANDES DE SANTANA E SILVA CARDOSO

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UMA METODOLOGIA ANALÍTICA, EM CLAE-PDA, PARA AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DO 4-NEROLIDILCATECOL NA PRESENÇA DE SEUS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO

Goiânia

2008

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

FABIANA FERNANDES DE SANTANA E SILVA CARDOSO

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UMA METODOLOGIA ANALÍTICA, EM CLAE-PDA, PARA AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DO 4-NEROLIDILCATECOL NA PRESENÇA DE SEUS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Fármacos e Medicamentos

Orientadora: Profa. Dra. Kênnia Rocha Rezende.

Goiânia

2008

FABIANA FERNANDES DE SANTANA E SILVA CARDOSO

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UMA METODOLOGIA ANALÍTICA, EM CLAE-PDA, PARA AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DO 4-NEROLIDILCATECOL NA PRESENÇA DE SEUS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO

Dissertação defendida no Curso de Mestrado em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, para obtenção do grau de mestre, em _____ de _____ de _____, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

_____

Profa. Dra. Kênnia Rocha Rezende – UFG

Presidente da Banca Examinadora

_____

Prof. Dr. Eric de S. Gil – UFG

_____

Profa Dra. Dione Marçal Lima – UFG

A Deus pela presença constate em minha vida,

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa. Dra. Kênnia Rocha Rezende pela oportunidade, pela colaboração e pelos importantes ensinamentos,

Ao meu marido Herbert pelo amor, carinho, compreensão e apoio. Ao meu filhinho Rafael, razão da minha vida,

À minha mãe pela dedicação, amor e atenção. Ao meu pai, que me deixou um exemplo de determinação e trabalho. Aos meus irmãos Léo e Brício pela força e amizade. À querida Dinha pelo carinho e atenção de sempre,

Ao Leonardo de Souza Teixeira pelo apoio mais que especial. Ao Iram Moreira Mundim pela ajuda e incentivo. Aos meus colegas de trabalho do ICF pela colaboração e disposição em compartilhar seus conhecimentos,

Aos professores e colaboradores da querida Faculdade de Farmácia da UFG pela convivência, pelo positivismo e pelo incentivo,

Aos professores da banca de qualificação Clévia Ferreira Duarte Garrote, Valéria de Oliveira e Ricardo Menegatti pelas sugestões e comentários valiosos.

Aos alunos Bruno Gonçalves Santiago, Juliana Cipriano de Assis e Mariana Cortês de Sousa por toda ajuda e amizade,

Aos colegas de laboratório pelos momentos de descontração, companheirismo e convivência. Ao Ricardo Rodrigues Bonfim pelo auxílio com os equipamentos,

À Indústria Farmacêutica Halex Istar Ltda por disponibilizar a câmara de fotoestabilidade para a realização do estudo fotolítico,

Aos meus amigos e familiares que me apoiaram sempre e souberam entender a minha ausência.

Enfim, a todos que de alguma maneira contribuíram para a execução desse trabalho, seja pela ajuda constante ou por uma palavra de amizade!

Muito Obrigada!

RESUMO

O 4-nerolidilcatecol (4-NRC) é o principal metabólito secundário da espécie *Pothomorphe umbellata* L. Miq. com comprovadas ações antioxidante, antiinflamatória e fotoprotetora. No entanto, após isolamento e armazenamento deste observam-se evidências de fotoinstabilidade de modo que, a caracterização dos fatores que influenciam tal instabilidade torna-se imperativa mediante a perspectiva do desenvolvimento de um novo fármaco. Assim, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar um método cromatográfico capaz de analisar a cinética de degradação do 4-NRC, na presença dos produtos gerados, empregando-se a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector com arranjos de fotodiodos (CLAE-PDA). Os resultados obtidos demonstraram que as condições cromatográficas desenvolvidas utilizando gradiente de eluição contendo MeOH:ACN:H_2O como fase móvel possibilitou adequada sensibilidade (5 µg/mL), linearidade (5-500 µg/mL), precisão intra (0,02 – 2,83%) e inter-dias (0,59 – 4,89%), além de exatidão (98,46 - 104,88%) e robustez. O estudo fotolítico demonstrou rápida degradação do 4-NRC (t_R = 26 min), com formação de um produto majoritário (t_R = 8 min). Dados do estudo hidrolítico evidenciaram elevada instabilidade do 4-NRC em meio alcalino (pH 13,00), observando-se um produto majoritário com t_R próximo a 26 min. Na condição ácida (pH 1,00), a degradação do 4-NRC foi lenta e parcial, mesmo após 72 horas de exposição, sob aquecimento. O principal produto de degradação ácida apresentou t_R próximo a 12 min. A cinética de degradação do 4-NRC, em meio ácido e sob condição fotolítica, analisada segundo o método gráfico do decaimento da concentração do 4-NRC, aponta que ambas reações apresentam perfil sugestivo de 2ª ordem. Neste contexto, sugere-se o armazenamento da substância em pH neutro, sob condições refrigeradas e protegidas da incidência da luz de modo a prevenir a degradação. Deve-se evitar ainda, o armazenamento em soluções, principalmente alcalinas, pois a velocidade de degradação torna-se acelerada.

Palavras-chave: 4- nerolidilcatecol, estabilidade, produtos de degradação, cinética.

ABSTRACT

The 4-nerolidylcatechol is the main secondary metabolite of the species *Pothomorphe umbellata* L. Miq. with established antioxidant, anti-inflammatory and photoprotective actions. Nevertheless, after its isolation and storage, evidence of photoinstability is observed, in a way that the characterization of the factors that influence such instability become mandatory, facing the perspective of a new drug development. Therefore, the aim of this paper was to develop and validate a chromatographic methodology able to analyze the degradation kinetic of the 4-NRC, in the presence of the degradation products, using the high performance liquid chromatography coupled to a detector with photodiodes (HPLC-PDA). Our results showed that the analytical method was selective (5 µg/mL) and linear over a wide range of concentrations (5.0 to 500.0 µg/mL) indicating high intra-day (0,02 – 2.83%) and inter-day precision (0.59 – 4.89%), besides accuracy (98.46 – 104.88%) and ruggedness. The photolytic study showed a fast degradation of 4-nerolidylcatechol (t_R = 25 min), generating a major product after a total run time of 8 min. The hydrolytic study showed high instability of the substance in alkaline medium (pH 13.00), generating a major product after a chromatographic run time of 26 min. In acid conditions (pH 1.00), the degradation of 4-NRC was slow and partial, even though after 72 hours of exposure, and under heating stress. The main product of the acid degradation was seen after 12 min. The degradation kinetics of 4-NRC in alkaline and photolytic conditions showed evidences of a 2º order profile, for both reactions. Accordingly, it may be proposed the storage of 4-NRC in neutral medium, under refrigerated conditions and also, protected from light incidence preventing degradation. In addition, it must be avoided storage in solution, mainly in alkaline conditions, once they accelerate the rate of 4-NRC degradation.

Keywords: 4-nerolidylcatechol, stability, degradation products, kinetic.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Exemplares *de Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. – São Paulo (L. Borges, 2007).....	22
Figura 2	Metabólitos secundários da espécie *P. umbellata*.....	24
Figura 3	Fármacos bloqueadores seletivos α_1-adrenérgicos avaliados em estudos de estresse.....	28
Figura 4	Fármacos antimicrobianos submetidos a estudos de decomposição.....	29
Figura 5	Fármacos ezetimibe (**15**) e gugulsterona (Z e E) (**16** e **17**) indicados para o tratamento e hipercolesterolemia, avaliados sob condição de estresse.....	30
Figura 6	Fármacos utilizados no tratamento da AIDS: sulfato de indinavir (**18**) e zidovudina (**19**).....	31
Figura 7	Fármacos submetidos a estudos de estabilidade, segundo ICH.....	32
Figura 8	Representação gráfica para reação de ordem zero: valores de concentração do reagente A (mol/L^{-1}) em função do tempo (h).....	36
Figura 9	Modelo gráfico para reação de primeira ordem: valores do logaritmo natural da concentração do reagente A em função do tempo (min).....	36
Figura 10	Exemplo gráfico para reação de segunda ordem: inverso dos valores da concentração do reagente A (mol/L^{-1}) em função do tempo (s).....	37
Figura 11	Esquema óptico de um espectrofotômetro de detector de arranjo de diodos	39
Figura 12	Cromatoplaca referente à amostra II. Em detalhe, frações com 4-NRC. Fase móvel: $CHCl_3$: EtOH (95 : 5); revelador: vanilina sulfúrica 1%.....	59
Figura 13	Cromatogramas da fração 3 (sistema gradiente 4) por CLAE-PDA (**A**: 282; **B**: 254 nm), fase móvel MeOH:	

ACN: TFA 0,1%, coluna C18 (250 mm x 4,6 mm) e fluxo de 1,0 mL/min. **C**: Espectro de varredura UV do pico do 4-NRC em t_R 25,45 min..... 60

Figura 14 Cromatogramas da fase móvel com sistema gradiente 4 (MeOH: ACN: TFA 0,1%), com fluxo 1 mL/min, obtido em CLAE-PDA (**A**: 282 nm; **B**: 254 nm) e coluna C18 (250 mm x 4,6 mm)..... 62

Figura 15 Cromatogramas do solvente (EtOH) com sistema gradiente 4 (MeOH: ACN: TFA 0,1%), com fluxo 1 mL/min, obtido em CLAE-PDA (**A**: 282 nm; **B**: 254 nm) e coluna C18 (250 mm x 4,6 mm)..... 63

Figura 16 Cromatogramas da solução etanólica do 4-NRC (50 µg/mL) com sistema gradiente 4 (MeOH: ACN: TFA 0,1%), com fluxo 1 mL/min, obtido em CLAE-PDA (**A**: 282 nm; **B**: 254 nm) e coluna C18 (250 mm x 4,6 mm)..... 64

Figura 17 Curva de calibração da análise do 4-NRC, no intervalo de concentração nominal 5,0 a 500,0 µg/mL, referente à faixa linear do método..... 65

Figura 18 Cromatogramas da amostra intacta do 4-NRC/EtOH (500 µg/mL), com sistema gradiente 4 (MeOH: ACN: TFA 0,1%), com fluxo 1 mL/min, obtido em CLAE-PDA (**A**: 282 nm; **B**: 254 nm) e coluna C18 (250 mm x 4,6 mm). **C**: Avaliação da pureza do pico pela varredura espectral (UV) no início, meio e fim do pico. 69

Figura 19 Cromatogramas das amostras do 4-NRC após 6, 24, 72 e 144 horas de exposição fotolítica do 4-NRC, com sistema gradiente 4 (MeOH: ACN: TFA 0,1%), fluxo 1 mL/min, em CLAE-PDA, coluna C18 (250 mm x 4,6 mm), 282 nm..... 70

Figura 20 **A**: Espectro de ultravioleta do pico (**1**), com t_R 3,92 min, após 24 horas de exposição fotolítica. **B**: Avaliação da pureza do pico (t_R 3,92 min)..... 71

Figura 21 **A**: Espectro de ultravioleta do produto de degradação fotolítica (**5**), com t_R = 8,26 min, após 144 horas de exposição. **B**: Avaliação da pureza do pico (t_R = 8,26 min)..... 73

Figura 22 Cromatogramas da amostra controle do 4-NRC, após 144 h de exposição, protegido com papel alumínio, com sistema gradiente 4 (MeOH: ACN: TFA 0,1%), com fluxo 1 mL/min, obtido em CLAE-PDA (**A**: 282 nm; **B**: 254 nm) e coluna C18 (250 mm x 4,6 mm)..... 74

Figura 23 Cromatogramas das amostras do 4-NRC após 1, 6, 12 e 24 horas de exposição alcalina, com sistema gradiente 4 (MeOH: ACN: TFA 0,1%), com fluxo 1 mL/min, obtido em CLAE-PDA, coluna C18 (250 mm x 4,6 mm) e monitorado em 282 nm..... 75

Figura 24 **A**: Espectro de ultravioleta do produto de degradação majoritário (**1**), com t_R 25,6 min, após 1 hora de exposição alcalina. **B**: Avaliação da pureza do pico (t_R 25,6 min)..... 76

Figura 25 **A**: Espectro de ultravioleta do 4-NRC, com t_R = 25,08 min, após 1 h de exposição em meio alcalino. **B**: Avaliação da pureza do pico (t_R 25,08 min)..... 77

Figura 26 **A**: Espectro de ultravioleta do produto majoritário (**1**), t_R 25,8 min, após 24 horas em meio alcalino. **B**: Avaliação da pureza pico (t_R 25,8 min)..... 78

Figura 27 Cromatogramas das amostras do 4-NRC após 1, 6, 12, 24, 40 e 48 horas de exposição ácida, a 60° C, com sistema gradiente 4 (MeOH: ACN: TFA 0,1%), com fluxo 1 mL/min, obtido em CLAE-PDA, coluna C18 (250 mm x 4,6 mm) e monitorado em 282 nm..... 79

Figura 28 **A**: Espectro de absorção UV do produto de degradação ácida (**1**) do 4-NRC, com t_R 11,84 min, após 48 horas de exposição em meio ácido, a 60° C. **B**: Avaliação da pureza do pico com t_R 11,84 min..... 81

Figura 29 Cinética de degradação fotolítica do 4-NRC. Gráfico de dispersão dos valores do inverso da concentração (µg/mL) em função do tempo (h)..... 84
Figura 30 Cinética de degradação ácida do 4-NRC, a 60° C. Gráfico de dispersão dos valores do inverso da concentração (µg/mL) em função do tempo (h)..... 85

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Classificação de guias do ICH por finalidade e aplicação.....	26
Quadro 2	Classificação dos testes, segundo sua finalidade	41
Quadro 3	Ensaios necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Volumes das frações repurificadas do 4-NRC, a partir de CCA.....	51
Tabela 2	Gradiente da fase móvel empregado no método analítico validado.....	53
Tabela 3	Coeficientes das equações lineares das soluções de calibração do 4-NRC em EtOH (5,0 a 500,0 µg/mL).....	65
Tabela 4	Dados de precisão e exatidão analítica do 4-NRC por CLAE-PDA, durante 3 dias da validação do método.....	67
Tabela 5	Dados da robustez: avaliação do t_R frente alteração de parâmetros analíticos.....	68
Tabela 6	Valores de absortividade molar do 4-NRC e análogos estruturais.....	82
Tabela 7	Concentrações (µg/mL) e percentuais remanescentes (%) do 4-NRC em função do tempo (h) de exposição alcalina.....	83
Tabela 8	Concentrações (µg/mL) e percentuais remanescentes (%) do 4-NRC em função do tempo (h) de exposição fotolítica.....	84
Tabela 9	Concentrações do 4-NRC (µg/mL) e percentual remanescente (%) em função do tempo (h) de exposição em meio ácido (pH 1,0, 60 º C).....	85

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1	Reação de oxidação de grupo fenólico.....	33
Esquema 2	Fluxograma do fracionamento cromatográfico do 4-NRC, a partir de raízes de *P. umbellata*.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

4-NRC	4-nerolidilcatecol
ACN	Acetonitrila
AcOEt	Acetato de etila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BZN	Benzeno
CCA	Cromatografia em coluna aberta
CCD	Cromatografia em camada delgada comparativa
CCDP	Cromatografia em camada delgada preparativa
CL	Cromatografia líquida
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-PDA	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector com arranjos de fotodiodos
CV	Coeficiente de variação
DCM	Diclorometano
DP	Desvio padrão
DPR	Desvio padrão relativo
EM	Espectrometria de massas
ETE	Éter etílico
ESI^+	Ionização por eletronspray positivo
EtOH	Etanol
FM	Fase móvel
HEX	Hexano
i.e.	a exemplo de
ICH	Conferência Internacional de Harmonização
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normatização e Qualidade Industrial
IUPAC	Internacional Union of Pure and Applied Chemistry
IV	Infravermelho
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quanificação
MeOH	Metanol

P. umbellata	*Pothomorphe umbellata*
P.A.	Padrão Analítico
p.e.	Por exemplo
R^2	Coeficiente de correlação linear
RMN	Ressonância magnética nuclear
TFA	Ácido trifluoracético
t_R	Tempo de retenção
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

RESUMO 6
ABSTRACT..... 7
LISTA DE FIGURAS..... 8
LISTA DE QUADROS..... 12
LISTA DE TABELAS..... 13
LISTA DE ESQUEMAS..... 14
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS..... 15
1. INTRODUÇÃO..... 21
1.1 O 4-Nerolidilcatecol: origem, usos e aplicações..... 21
1.2 Estudos de estabilidade..... 25
1.2.1 Os estudos de estabilidade segundo a Conferência Internacional de Harmonização (ICH)..... 25
1.2.2 Aplicações dos estudos de estabilidade..... 27
1.2.3 Reações químicas relacionadas a processos de degradação..... 32
1.2.4 Cinética das reações químicas 33
1.2.5 Métodos analíticos indicativos de estabilidade..... 38
1.3 Validação da metodologia analítica de quantificação de fármacos 40
1.3.1 Especificidade..... 42
1.3.2 Linearidade e intervalo..... 42
1.3.3 Limites de Detecção e Quantificação..... 42
1.3.4 Precisão..... 42
1.3.5 Exatidão..... 43
1.3.6 Robustez..... 43
2. OBJETIVOS..... 45
3. MATERAIS E MÉTODOS..... 47
3.1 MATERIAIS..... 47
3.1.1 Reagentes e Soluções..... 47
3.1.2 Equipamentos..... 47
3.1.3 Material botânico..... 48
3.2 MÉTODOS..... 48

3.2.1 Preparo do extrato bruto de *Pothomorphe umbellata* e isolamento do 4-NRC..... 48
3.2.2 Desenvolvimento e otimização de método analítico em CLAE-PDA para verificação de produtos de degradação do 4-NRC..... 51
3.2.3 Validação analítica para avaliação do 4-NRC, sob condições de estresse físico-químicas, por CLAE-PDA..... 52
3.2.3.1 Seletividade..... 53
3.2.3.2 Linearidade..... 53
3.2.3.3 Limites de Detecção e Quantificação..... 54
3.2.3.4 Precisão..... 54
3.2.3.5 Exatidão..... 54
3.2.3.6 Robustez..... 55
3.2.4 Exposição do 4-NRC a condições de estresse..... 55
3.2.4.1 Estudo fotolítico do 4-NRC..... 55
3.2.4.1.1 Preparo da amostra para exposição fotolítica..... 55
3.2.4.1.2 Exposição das amostras em câmara de fotoestabilidade..... 55
3.2.4.2 Estudo hidrolítico do 4-NRC..... 56
3.2.4.2.1 Preparo da amostra para exposição alcalina..... 56
3.2.4.2.2 Preparo da amostra para exposição ácida..... 56
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 59
4.1 Purificação do extrato bruto de *P. umbellata* e obtenção do 4-NRC..... 59
4.2 Otimização do método analítico para quantificação do 4-NRC e separação de seus produtos de degradação..... 61
4.3 Validação analítica de avaliação do 4-NRC, por CLAE-PDA..... 61
4.3.1 Seletividade..... 61
4.3.2 Linearidade..... 64
4.3.3 Limites de Detecção e Quantificação 65
4.3.4 Precisão..... 66
4.3.5 Exatidão..... 66
4.3.6 Robustez..... 68
4.4 Análise das amostras expostas à condição de estresse..... 68

4.4.1 Análise da amostra intacta do 4-NRC em EtOH, por CLAE-PDA..... 68
4.4.2 Análise das amostras expostas à condição fotolítica, por CLAE-PDA..... 70
4.4.3 Análise das amostras do 4-NRC expostas ao meio alcalino, por CLAE-PDA..... 75
4.4.4 Análise das amostras expostas ao meio ácido, a 60° C, por CLAE-PDA..... 79
4.5 Caracterização química estrutural do 4NRC e produtos de degradação..... 81
4.6 Cinética de degradação do 4-NRC sob condições de estresse..... 82
5. CONCLUSÕES..... 88
6. PERSPECTIVAS..... 91
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 93

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 O 4-Nerolidilcatecol: origem, usos e aplicações

A pesquisa de novas substâncias, de origem natural, com potencial terapêutico, tem despertado interesse na comunidade científica em todo o mundo. Entre os anos 1970 e 2006, 24 novos fármacos foram aprovados. O Japão foi responsável por 37% destas descobertas, seguido pelos Estados Unidos (29%) e por outros países (Inglaterra, Suíça, Canadá, Índia e Rússia). Grande parte destes novos fármacos (10) possuem atividade antimicrobiana e, a maioria destes tem origem policetídica, peptídica ou terpenóide sendo que, 19 foram obtidos a partir de microorganismos e 5 de plantas. (GANESAN, 2008).

Neste contexto mundial, a biodiversidade brasileira tem posição de destaque, pois detém 23% das riquezas naturais globais existentes em plantas, animais, microrganismos e espécies marinhas (RATES, 2001; ROMANOS et al., 2002; PINTO et al., 2002). Dentre as plantas que apresentam interesse terapêutico destaca-se o gênero *Pothomorphe*, da família *Piperaceae.* Este gênero foi descrito em 1840 por Miquel, e representa cerca de dez espécies vegetais. No Brasil, apenas duas delas são observadas: *P. umbellata (*L.) Miq. e *P. peltata (*L.) Miq.

A espécie *P. umbellata* (Figura 1), conhecida popularmente como pariparoba, caapeba, catajé, malvarisco, aguaxima e caapeba verdadeira (PANIZZA, 1998), é uma planta nativa da Mata Atlântica e pode ser encontrada em locais úmidos, sombreados e ricos em húmus, nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Espírito Santo e Bahia, embora esteja amplamente distribuído no Brasil (PECKOLT, 1941; RIEDEL, 1941; YUNKER, 1973).

Exemplares do gênero *Pothomorphe* apresentam baixa diversidade de metabólitos secundários com poucas classes químicas identificadas. Da espécie *P. umbellata,* destaca-se o 4-nerolidilcatecol (4-NRC), um catecol prenilado (**1**) (KIJJOA et al., 1980) cuja estrutura (Figura 2) se apresenta como uma molécula de biossíntese mista, formado por um grupo fenólico possivelmente proveniente do ácido cafeico ou do ácido mevalônico e, uma cadeia lateral isoprênica originária do nerolidol ou farnesol (LEWIS et al., 1995; KATO et al., 1998; BERGAMO et al. 2005). Outras classes químicas incluem sesquiterpenos, como nerolidol (**2**) (PARMAR et al., 1997); substâncias fenilpropanoídicas, como apiol (**3**) (SILVA;

BAVER, 1972) e dilapiol (**4**) (BERNARD; TIELI, 1978); dímeros de catecol, como peltatol A (**5**) (GUSTAFSON et al., 1992); aristolactamas, como piperumbelactama D e E (**6** e **7**) (TABOPDA et al., 2008) e, substâncias com estruturas flavonoídicas (**8**), 5,7-dimetoxi-3',4'-metilenodioxi-flavonol (BASTOS, 1998). O 4-NRC ($C_{21}H_{30}O_2$) é o metabólito secundário mais abundante das raízes da espécie *P. umbellata*, de aspecto oleoso e coloração amarelo ouro, representando cerca de 21,5% deste, embora tal concentração seja dependente de fatores sazonais (KIJJOA et al., 1980).

Farmacologicamente, o extrato bruto desta espécie tem sido utilizado na medicina popular para o tratamento de várias enfermidades, devido às suas atividades antimalárica (AMORIM et al, 1988); inibidora da replicação do vírus HIV (GUSTAFSON et al., 1992); analgésica (BIOKA; ABENA, 1990; PERAZZO et al., 2005); antiinflamatória (BARROS, 2005; PERAZZO, et at., 2005), antifúngica (TABOPDA et al., 2008), tranquilizante (BERNARD; TIELI, 1978); antimicrobiana (MONGELLI et al., 1995), fotoprotetora (ROPKE et al., 2005, 2006) e citotóxica (MONGELLI et al., 1999).

Figura 1: Exemplares *de Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. – São Paulo. Fonte: L. Borges, 2007.

A Farmacopéia Brasileira (SILVA, 1926), ainda na sua primeira edição preconiza o uso das raízes de *P. umbellata*. Na atualidade, esta espécie tem sido utilizada em dermocosméticos devido a sua ação fotoprotetora (ROPKE et al.,

2005). Testes realizados *in vivo* (ROPKE, 1999; ROPKE et al., 2003) e *in vitro* (BARROS et al., 1997) demonstraram que, isoladamente, o 4-NRC possui significativa atividade antioxidante, semelhante à da vitamina E, indicando-o como potencial fármaco para usos em quadros de estresse oxidativo celular (BARROS et al., 1997; DESMACHELIER et al., 1997a; DESMACHELIER et al., 1997b). Verificou-se ainda que, quando aplicada à pele, a substância protege da ação nociva dos raios ultravioleta do tipo UVB (BARROS et al., 1997). Estudos anteriores demonstraram que o 4-NRC não apresenta potencial mutagênico em *Salmonella typhimurium* nem em eritrócitos, tampouco toxicidade oral (BARROS et al., 2005). Ademais, o 4-NRC apresenta efeito protetor da genotoxicidade induzida por ciclofosfamida (VALADARES et al., 2007).

Nos últimos 5 anos, um crescente número de trabalhos tem sido publicados destacando as propriedades farmacológicas da espécie *P. umbellata* e do 4-NRC. Entretanto, evidências de fotoinstabilidade do 4-NRC, quando isolado do extrato bruto, podem ser observadas devido ao rápido enegrecimento, quando exposto à luz ou armazenado em temperatura ambiente. Tais fatos juntamente com a vasta utilização popular e industrial, na dermocosmética, justificam investigações das condições de armazenamento e prevenção de degradação.

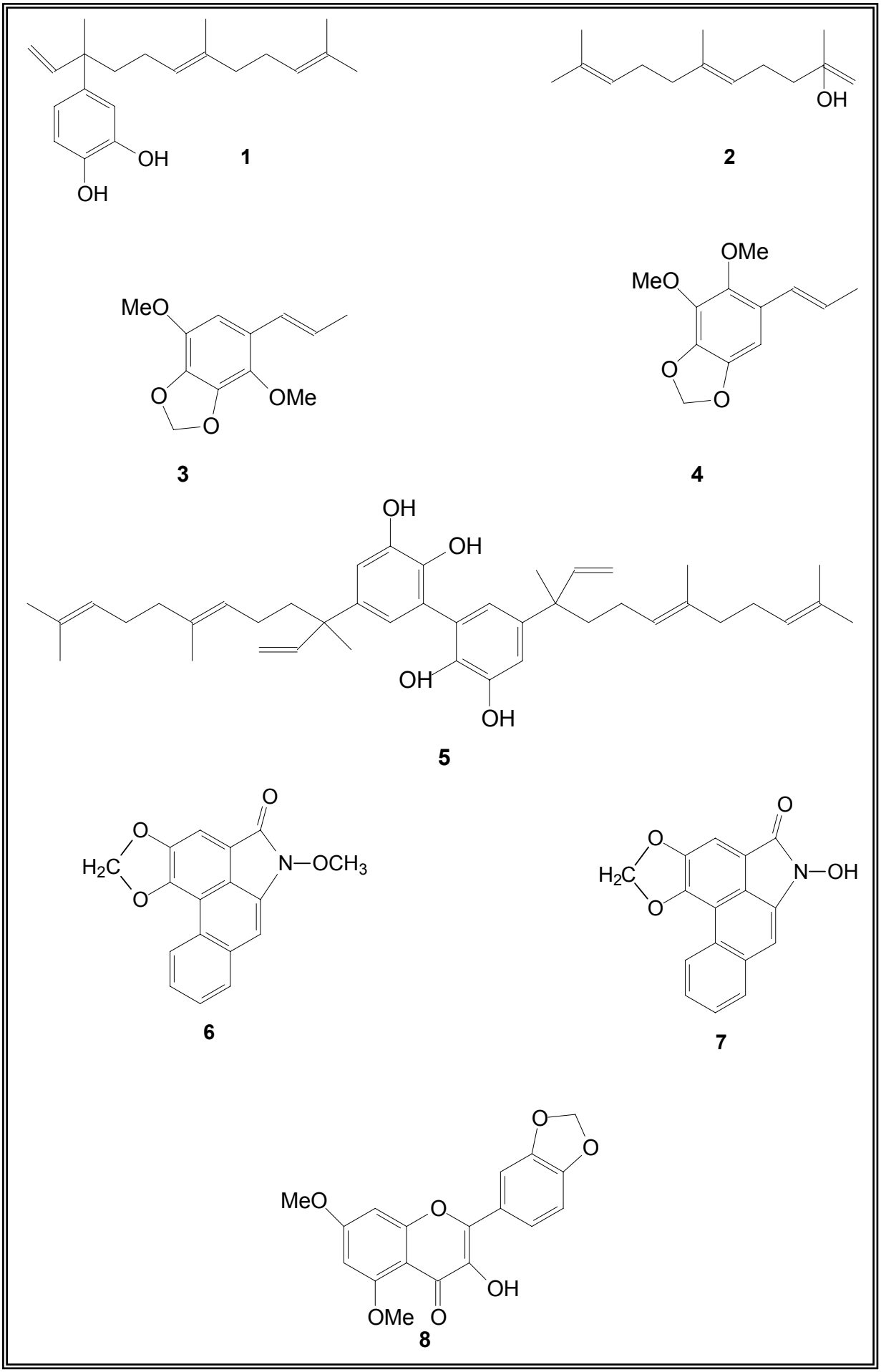


Figura 2: Metabólitos secundários da espécie *P. umbellata*.

1.2 Estudos de estabilidade

Os estudos de estabilidade são realizados visando avaliar a influência de fatores como temperatura, luz, umidade, presença de oxigênio, além de outros agentes como pressão, solventes e mudanças de pH que podem alterar as características originais de substâncias farmacologicamente ativas (NUDELMAN, 1975).

A avaliação da estabilidade de fármacos e medicamentos pode ser realizada de forma acelerada ou por meio de estudos de longa duração. Estes são projetados de forma a acompanhar as características físicas, químicas, biológicas e/ou microbiológicas do fármaco durante ou, após seu prazo de validade. Para estudos de estabilidade acelerado são planejadas condições extremas de exposição e armazenamento do fármaco (BRASIL, 2005), de maneira a avaliar as possíveis alterações nas características originais frente a fatores extrínsecos (*p.e.* temperatura e umidade) e intrínsecos (*p.e.* variação de pH). Ao final, os resultados destes estudos permitem propor, ou confirmar, um prazo de validade e recomendar adequadas condições de armazenamento. Com a globalização, evidenciou-se a necessidade de padronização das condições experimentais de condução destes estudos levando a instituir a Conferência Internacional de Harmonização (ICH).

1.2.1 Estudos de estabilidade segundo a Conferência Internacional de Harmonização (ICH)

Os guias elaborados pelo ICH têm por objetivo padronizar a interpretação e a aplicação de técnicas utilizadas no processo de registro de produtos de produtos farmacêuticos de uso humano. O ICH considera e recomenda ações que são descritas e adotadas por agências reguladoras da União Européia, Japão e Estados Unidos. Tais guias são classificados em quatro categorias, segundo suas finalidades, como demonstrado no Quadro 1. De acordo com tal classificação, são propostos guias para a condução de estudos e avaliação de produtos.

Os estudos de estabilidade representam, portanto, uma importante ferramenta para a avaliação da eficácia e segurança de produtos farmacêuticos, despertando crescente interesse do setor produtivo e de autoridades sanitárias.

No Brasil, o teste de estabilidade é definido como um conjunto de ensaios projetados para obter informações sobre a estabilidade de produtos farmacêuticos, visando definir seu prazo de validade e período de utilização em embalagens e condições de armazenamento especificadas pelo fabricante (BRASIL, 2005).

Quadro 1. Classificação de guias do ICH por finalidade e aplicação.

Finalidade	Aplicação	Exemplos de guias
Qualidade	Os guias de qualidade (Q) estabelecem procedimentos para a avaliação da qualidade química e farmacêutica.	- Estabilidade de drogas e produtos - Validação analítica - Qualidade de produtos biotecnológicos - Sistema de qualidade farmacêutica
Segurança	Os guias de segurança (S) abordam a condução de estudos pré-clínicos *in vivo* e *in vitro*	- Estudos de genotoxicidade - Estudos de carcinogenicidade - Teste de toxicidade - Estudos farmacológicos
Eficácia	Os guias de eficácia (E) preconizam a condução de estudos clínicos em humanos.	- Estudos de dose-resposta - Fatores étnicos - Estudos clínicos - Boas práticas clínicas
Multidisciplinar	Os guias multidisciplinares (M) são para tópicos que não se enquadram em uma única das categorias anteriormente citadas.	- Terminologia médica - Transmissão eletrônica de dados regulatórios - Correlação de estudos pré-clínicos e estudos clínicos

Fonte: http://www.ich.org/cache/compo/276-254-1.html

Para os órgãos regulamentadores da comunidade européia, Japão e EUA a elaboração do guia Q1A, em 1996, veio para complementar os estudos iniciais de investigação de fármacos. Neste guia estão sugeridas as faixas de temperatura e umidade de exposição do produto ou da substância, bem como a duração do teste. Já o guia Q1B (ICH, 1996), anexo ao guia Q1A, prevê as condições para a realização de testes de fotoestabilidade. A proposta destes guias é avaliar a qualidade de fármacos e produtos sob condições extremas de temperatura, umidade e luminosidade, bem como, estabelecer o prazo de validade de fármacos/medicamentos. Baseado nos resultados destes testes é possível prever quais fatores que podem influenciar na qualidade e, conseqüentemente, afetar a segurança e/ou eficácia do produto/substância (BAKSHI; SINGH, 2002), bem como avaliar sua cinética de degradação.

1.2.2 Aplicações dos estudos de estabilidade

Nos estudos de estabilidade, os processos de degradação dos fármacos estão associados às reações químicas que consomem energia e podem ser acelerados pelo aumento de temperatura. Numa reação de degradação a substância no estado inicial é chamada de reagente, ou substrato, e a substância formada, de produto.

A avaliação e quantificação de produtos de fármacos, originados por processos de degradação, pode ser aplicada na determinação da cinética da reação. O monitoramento destes processos de degradação é freqüentemente realizado por estudos de estabilidade, utilizando métodos analíticos validados, de acordo com as condições indicadas pelos guias do ICH.

Exemplos incluem os fármacos bloqueadores seletivos α_1 – adrenérgicos, prazosina (**9**), terazosina (**10**) e doxazosina (**11**) (Figura 3), utilizados no tratamento de hipertensão arterial e hiperplasia benigna da próstata. Estes são suscetíveis a vários agentes de degradação, quando submetidos a estudos de estresse. A avaliação dos produtos formados foi conduzida segundo método analítico validado. Neste estudo, observou-se maior estabilidade dos fármacos em solução neutra e em condição oxidativa (H_2O_2 3% por 6 h e H_2O_2 30%, 24 h, em temperatura ambiente). Nestas condições os produtos de degradação, mesmo em baixas concentrações, apresentaram-se mais polares que os fármacos investigados. Em condições hidrolíticas (HCl 0,1M e NaOH 0,1M, 40º C, por 7 dias), foi observada a

formação de produto de degradação majoritário mais apolar que seus reagentes (**9**, **10** e **11**). Estes produtos apresentaram características cromatográficas semelhantes e tiveram suas massas determinadas por CL/EM ESI^+ (290). No estado sólido, os fármacos mostraram-se estáveis à condição térmica (50° C, por 3 meses) (OJHA et al., 2003; BAKSHI; OJHA; SINGH, 2004).

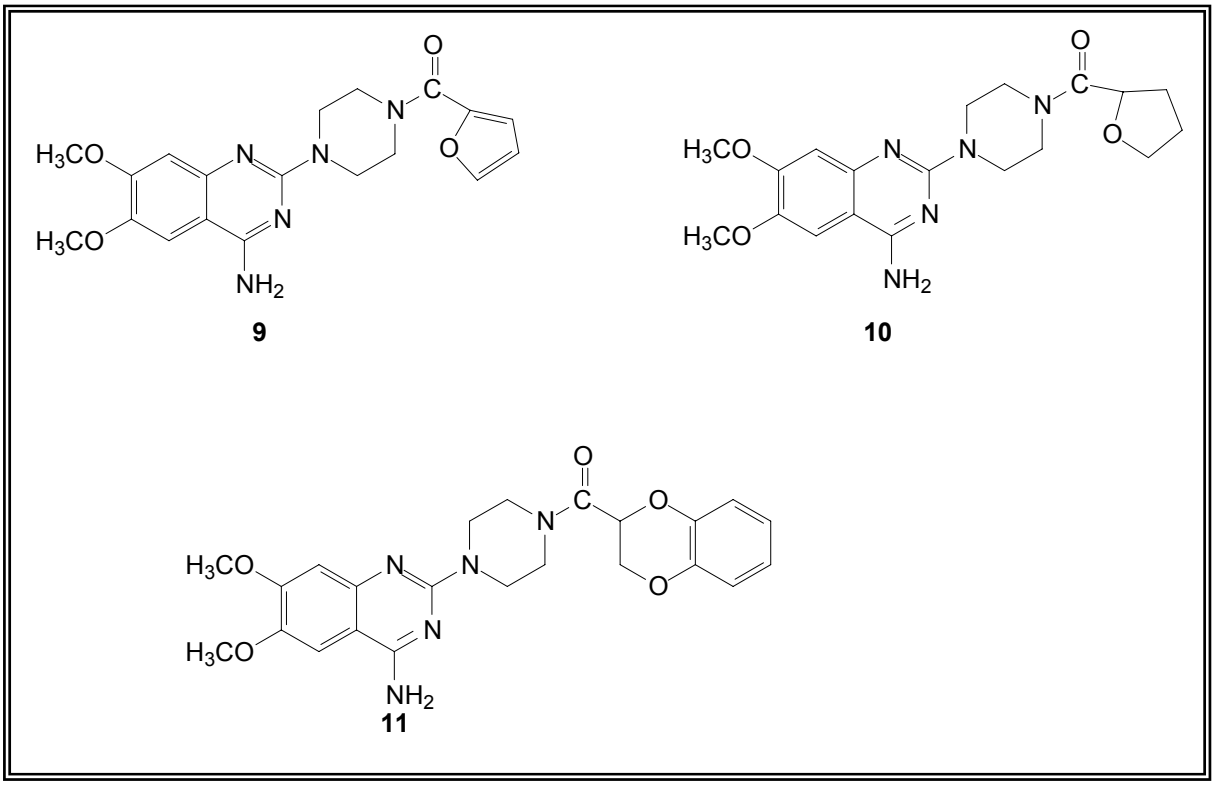


Figura 3: Fármacos bloqueadores seletivos α_1-adrenérgicos avaliados em estudos de estresse.

Fármacos antimicrobianos, como secnidazol (**12**), tinidazol (**13**) e ornidazol (**14**) (Figura 4), também foram monitorados quanto à estabilidade em condição de estresse. Extensiva degradação do secnidazol foi observada, especialmente em meio alcalino (NaOH 0,1 M 80° C, 8 h) e oxidativo (H_2O_2 3% por 6 h e H_2O_2 30%, 48 h, em temperatura ambiente), assim como na presença de luz, e em meio ácido. O fármaco apresentou estabilidade na condição térmica e em meio neutro, apresentando degradação de 2 e 5 a 8%, respectivamente (BAKSHI; SINGH, 2004a). Para tinidazol, observou-se que a degradação gera produtos com características cromatográficas similares tanto na condição alcalina (NaOH 0,1 M 80° C e tampão pH 10 80°C, por 8 h) como na fotolítica (12 dias em câmara de

fotoestabilidade) (BAKSHI; SINGH, 2004b). Nos testes com ornidazol a técnica de CLAE-PDA foi aplicada e possibilitou a detecção de seis produtos de degradação (BAKSHI et al., 2001). Os resultados dos estudos hidrolítico ácido e oxidativo revelaram que houve redução da concentração do analito em estudo, entretanto, não se verificou a presença de produto(s) de degradação, possivelmente pela ausência de grupos cromóforos nas moléculas formadas. Analogamente, a degradação do secnidazol não gerou produtos detectáveis/quantificáveis nas condições alcalina e oxidativa; tampouco o tinidazol nos estudos alcalino e fotolítico; assim como o ornidazol em meio ácido e estudo oxidativo; (**12**, **13** e **14**).

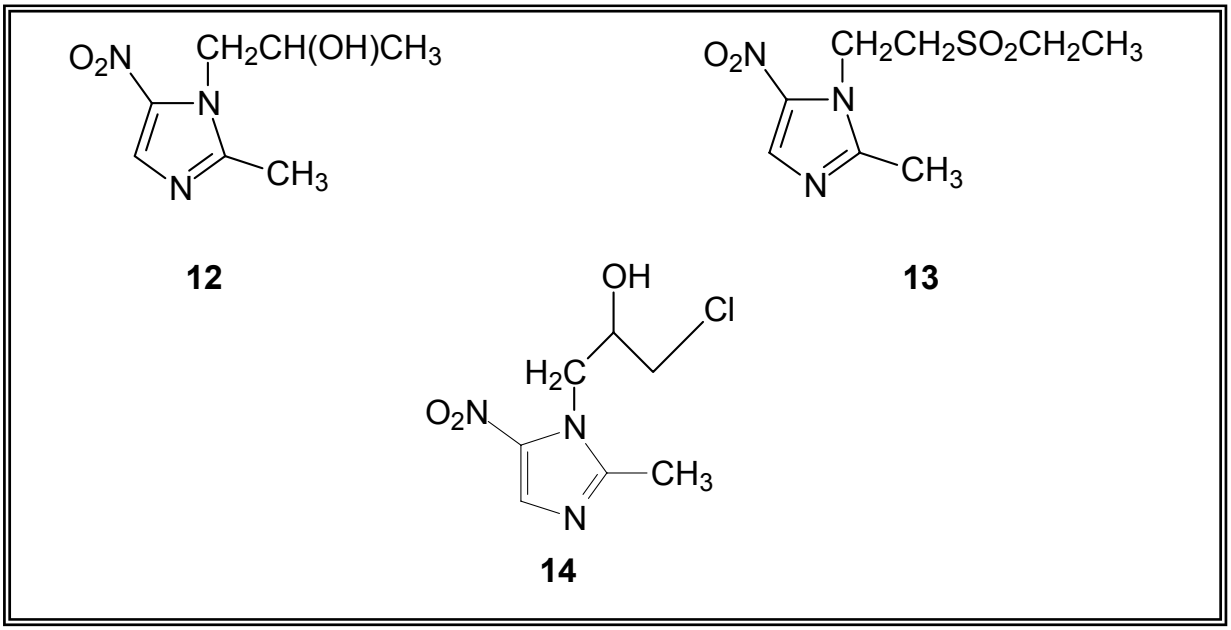


Figura 4: Fármacos antimicrobianos submetidos a estudos de decomposição.

Os estudos com os fármacos ezetimibe (**15**) e gugulsterona (isômeros Z e E) (**16** e **17**) (Figura 5), indicados para o tratamento de hipercolesterolemia, foram conduzidos para avaliar a estabilidade frente a agentes estressantes. No estudo do ezetimibe a exposição às condições alcalinas (NaOH 0,1 M 40° e 80° C por 8 h) e luz (2 dias em câmara fotoestabilidade) promove efetiva instabilidade na molécula, levando à formação de um produto de degradação majoritário, mais apolar que o reagente, em todas as condições hidrolíticas e fotolítica aplicadas. Sua velocidade de degradação hidrolítica ácida foi mais lenta que a alcalina e neutra. No entanto, o fármaco se mostrou estável em condições de estresse oxidativo (H_2O_2 3% e 20%, T_{amb}/ 24 h) e térmico (50° C, 45 dias e 60° C, 7 dias) (SINGH et al., 2006). Para a

gugulsterona, verificou-se que a degradação deste fármaco em meio alcalino (NaOH 1 N, 80° C por 1 h) ocorre mas rapidamente que em meio ácido (HCl 5 N, 80° C por 1 h). Quando exposto ao meio oxidativo, a degradação de gugulsterona é mais intensa na presença de H_2O_2 50%, formando dois produtos de degradação adicionais àqueles detectados na presença de H_2O_2 6% (80° C, por 2 h). O estudo demonstrou que ambos isômeros de gugulsterona são susceptíveis às condições de estresse às quais foi exposto, levando à formação de produtos de degradação mais polares que o reagente (AGRAWAL et al., 2004).

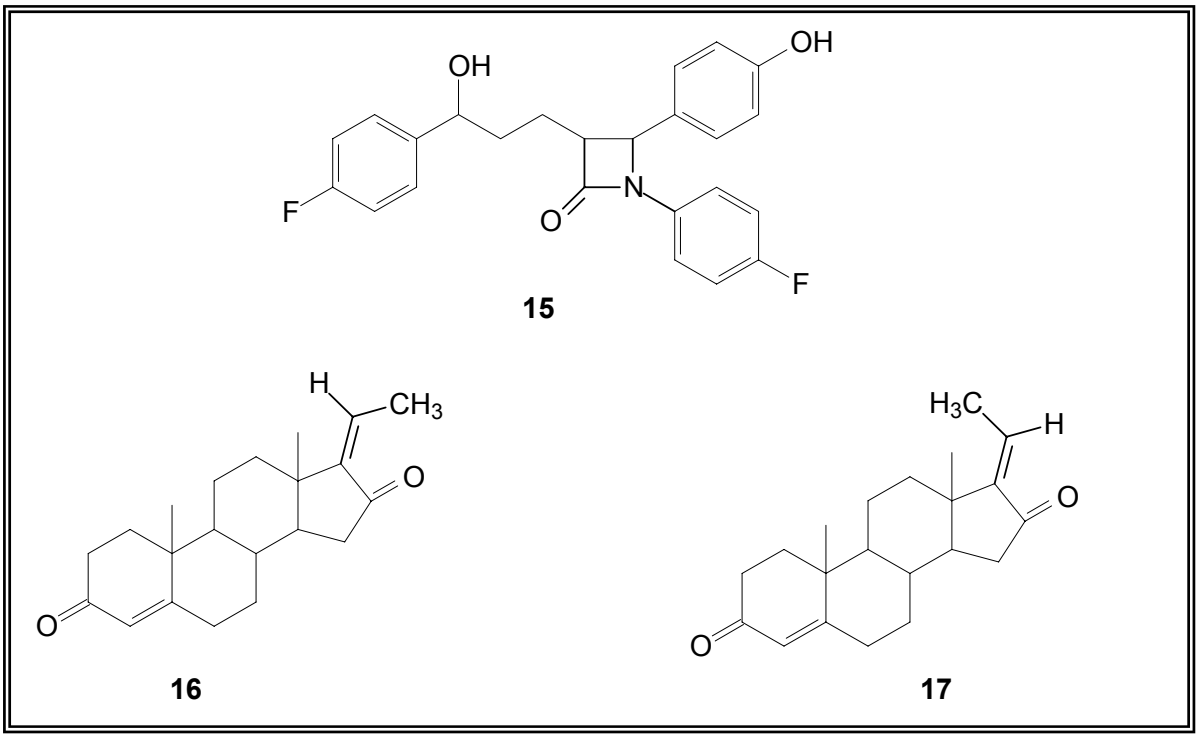


Figura 5: Fármacos ezetimibe (**15**) e gugulsterona (Z e E) (**16** e **17**) indicados para o tratamento e hipercolesterolemia, avaliados sob condição de estresse.

Nos estudos de estabilidade do sulfato de indinavir (**18**) e zidovudina (**19**) (Figura 6), fármacos com atividade inibitória do HIV, há formação de produtos de degradação em todas as condições de estresse as quais estes foram submetidos. No estudo do sulfato de indinavir (**18**) quando em tampão fosfato (pH 8,0 70° C, por 1 h) ou, em meio alcalino (NaOH 1 N 70° C, por 1 h) e oxidativo (H_2O_2 30% 65° C, por 30 min) verificou-se a presença de produtos mais polares que o fármaco original. Já na condição ácida (HCl 1 N 70° C, por 1 h), há a formação de um produto mais apolar, similarmente ao estudo térmico (80° C, 2 h), verificando-se

formação de ambos os tipos de produtos (KAUL et al., 2004). Diversamente, para a zidovudina (**19**), todos os produtos de degradação formados pela exposição do fármaco (HCl 0,1 M 5 dias; H_2O, 5 dias; NaOH 0,1 M, 5 dias; H_2O_2 3 e 30%, 2 dias; luminosidade por 5 dias) foram mais polares que o reagente (DUNGE et al., 2005).

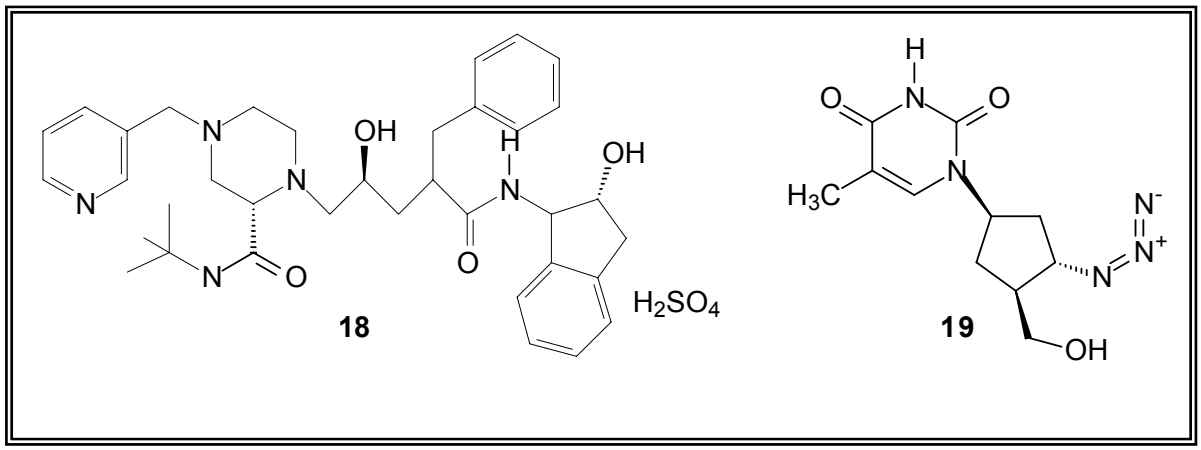


Figura 6: Fármacos utilizados no tratamento da AIDS: sulfato de indinavir (**18**) e zidovudina (**19**).

Outros estudos de estresse, com diferentes especialidades terapêuticas de fármacos, também foram realizados objetivando a avaliação da segurança e qualidade de produtos. Alguns exemplos são: fármacos de ação antiplaquetária e vasodilatadora (cilostazol) (**20**) (FAYED et al., 2007), anti-tuberculose (isoniazida) (**21**) (BHUTANI et al., 2007), anti-hipertensiva (maleato de enalapril) (**22**) (BHARDWAJ; SINGH, 2008), osteoartrite (diacereína) (**23**) (GIANNELLINI et al., 2005), antidepressivo (venlafaxina) (**24**) (ASAFU-ADJAYE et al., 2007) e antitumoral C 1311 (**25**) (BROK et al., 2005) (Figura 7). Nestes estudos, o desenvolvimento de um método analítico, de acordo com ICH, assegurou o monitoramento da formação de produtos de degradação.

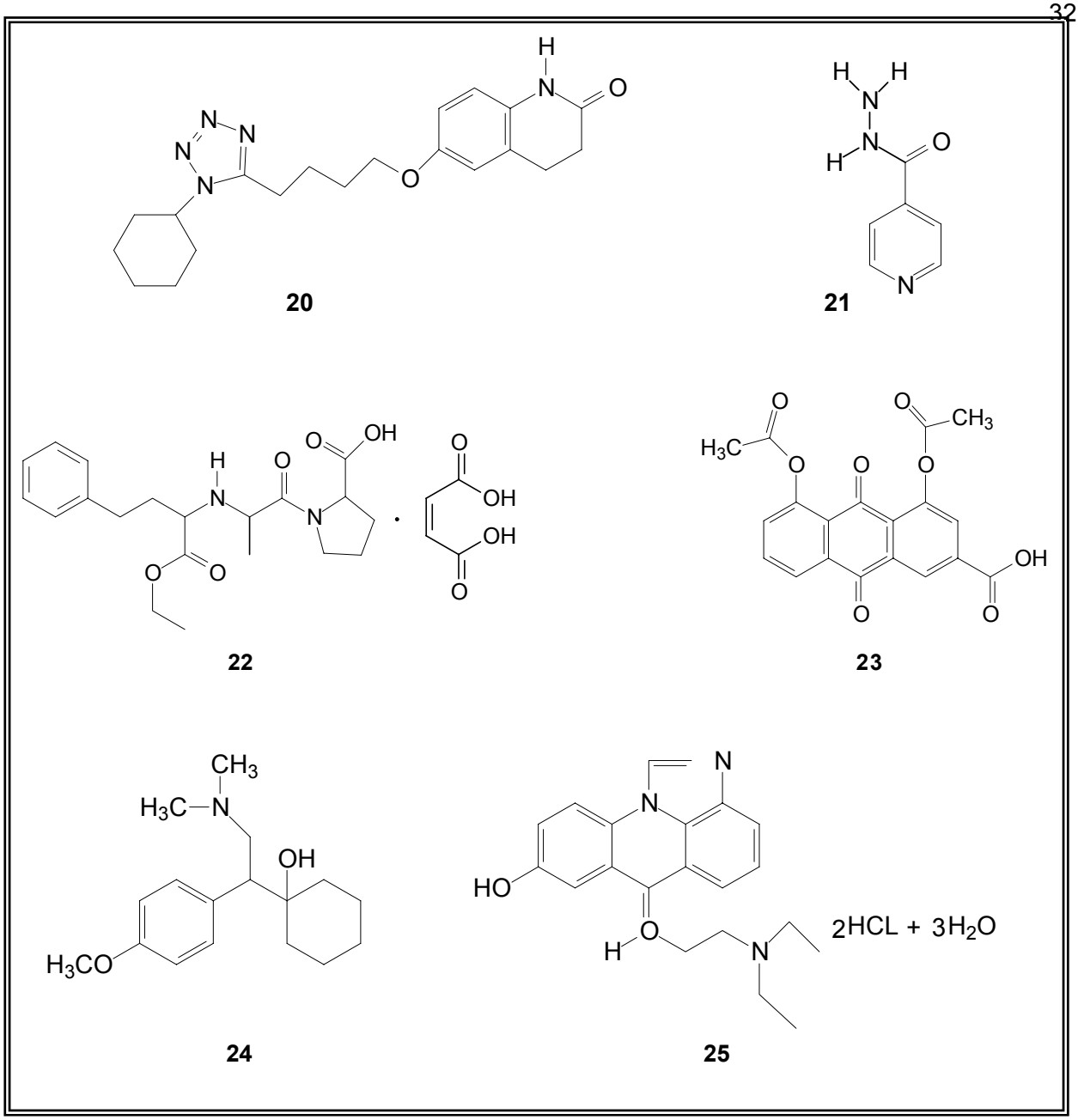


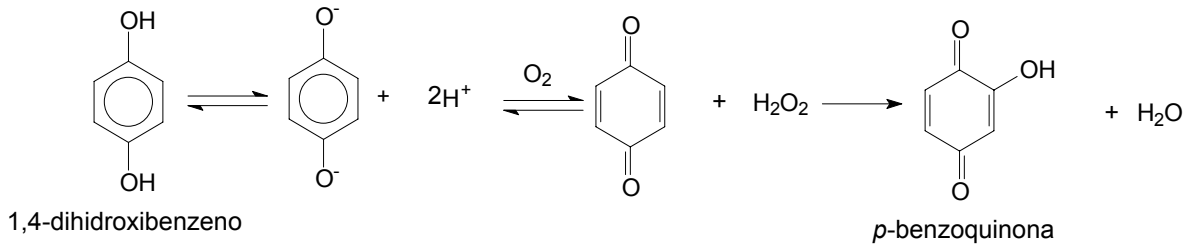
Figura 7: Fármacos submetidos a estudos de estabilidade, segundo ICH.

1.2.3 Reações químicas relacionadas a processos de degradação

Os fármacos expostos às condições de estresse em estudos de estabilidade podem sofrer diferentes reações, como por exemplo, hidrólise, oxidação, redução, fotólise e pirólise. Outras reações como decomposição e racemização também podem ocorrer sem haver correlação ao agente de estresse.

Especificamente, os grupos fenólicos são mais suscetíveis às reações de fotólise e oxidação. Nestes, as reações de oxidação são determinadas pelo número de ligações carbono-oxigênio, levando à formação de quinonas, como apresentado

no esquema abaixo, em que 1,4-dihidroxibenzeno é convertido em *p*-benzoquinona (Esquema 1).



1,4-dihidroxibenzeno

p-benzoquinona

Esquema 1: Reação de oxidação de grupo fenólico (CONNORS; AMIDON; STELLA, 1986).

Já as moléculas que apresentam grupos cromóforos como nitro, cetonas e sulfonas, duplas e triplas ligações são sensíveis à fotólise. Quanto maior a ocorrência destes grupos maior mobilidade dos elétrons na molécula e menor energia de ativação para reações de degradação (NUDELMAN, 1975).

1.2.4 Cinética das reações químicas

A cinética é o estudo da velocidade das reações químicas e dos mecanismos envolvidos. Tais dados possibilitam verificar a rapidez com que os reagentes são consumidos no meio, monitorar a formação de produtos, estabelecer a meia-vida de fármacos e ainda, determinar e propor condições ideais de uso e armazenamento (KOSTENBAUDER; BOGARDUS, 1995). Adicionalmente, permitem avaliar a influência da concentração dos reagentes e produtos, e a ação de fatores como solventes, pressão e temperatura, na velocidade das reações químicas.

A constante da velocidade da reação (*k*) é estabelecida pela concentração consumida do reagente ou pela concentração formada de produto (dc) por período de tempo (dt). A velocidade reacional pode ser calculada aplicando-se a equação geral (**1**), que descreve a relação concentração-velocidade.

$$- dc / dt = k \qquad (1)$$

Onde, -dc / dt é a razão com que a concentração do reagente diminui em função do tempo. O sinal negativo indica redução da concentração do reagente durante a reação.

A cinética das reações pode ser classificada, geralmente, em: reações de ordem zero, de primeira ou segunda ordem. Na equação da velocidade, a soma dos expoentes aos quais estão elevadas as concentrações, é que determina a ordem da reação (CONNORS; AMIDON; STELLA, 1986; RUSSEL, 1994).

As reações químicas podem ser representadas pelas equações abaixo (**2** e **3**):

$$A \rightarrow B \qquad (\mathbf{2})$$

$$A + B \rightarrow C \qquad (\mathbf{3})$$

Nas reações (**2** e **3**) os produtos gerados são designados por (**B** e **C**), respectivamente.

Nas reações de **ordem zero**, a velocidade da reação independe da concentração do(s) reagente(s), ou seja, mesmo que ocorra aumento da concentração de um reagente a velocidade da reação permanece inalterada. A velocidade de uma reação de ordem zero pode ser calculada aplicando-se a seguinte equação (**4**):

$$k = (C_0 - C) / t \qquad (\mathbf{4})$$

Onde C_0 é a concentração inicial e C é a concentração no tempo *t.*

Para se estabelecer a meia-vida da reação ($t_{1/2}$), ou seja, o período de tempo necessário para que a concentração do reagente reduza à metade de seu valor inicial, utiliza-se a equação (**5**):

$$t_{1/2} = C_0 / 2k \qquad (\mathbf{5})$$

Onde C_0 é a concentração inicial do reagente A.

Nas reações de **primeira ordem** existe proporcionalidade direta entre a concentração de um dos reagentes e a velocidade de reação. Nestes casos, quando a concentração de um reagente duplica, a velocidade da reação também

duplica. A velocidade de uma reação de primeira ordem pode ser calculada empregando-se a equação (**6**):

$$k = (1/t) \cdot \ln C_0 / C \qquad (6)$$

Para o cálculo da meia-vida da reação de primeira ordem emprega-se a equação **7**. A meia-vida da reação de primeira ordem é independente da concentração inicial, já que o tempo necessário para a concentração do reagente reduzir à metade do valor inicial é o mesmo necessário para a concentração reduzir à quarta parte, devido à proporcionalidade entre a concentração e a velocidade da reação.

$$t_{1/2} = 0{,}693 / k \qquad (7)$$

Nas reações de **segunda ordem**, a velocidade de reação é proporcional à concentração de dois reagentes ou à segunda potência de um deles. Neste caso, quando a concentração de um reagente é duplicada, a velocidade da reação é aumentada em quatro vezes. A equação da velocidade de uma reação de segunda ordem pode ser expressa pela equação **8**:

$$1/C = (1/C_0) + kt \qquad (8)$$

No cálculo da meia-vida da reação de segunda ordem emprega-se a equação **9**. Neste caso, a meia-vida da reação depende da concentração inicial, já que não há proporcionalidade entre a concentração do reagente consumido em função do tempo.

$$t_{1/2} = 1 / kC_0 \qquad (9)$$

Aplicando-se o modelo gráfico, para a determinação da cinética da reação, tem-se: para reações de ordem zero o gráfico deve ser construído com dados da concentração do reagente *versus* o tempo (Figura 8); para as reações de primeira

ordem, pelo logaritmo da concentração *versus* o tempo (Figura 9); ou de segunda ordem, pelo inverso da concentração *versus* o tempo (Figura 10) (RUSSEL, 1994).

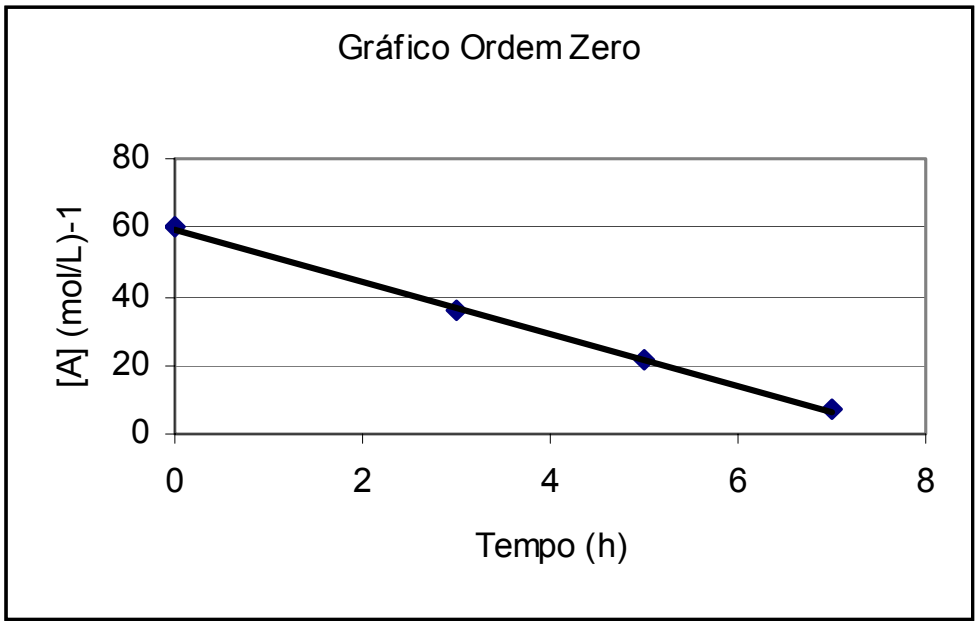


Figura 8: Representação gráfica para reação de ordem zero: valores de concentração do reagente A (mol/L^{-1}) em função do tempo (h).

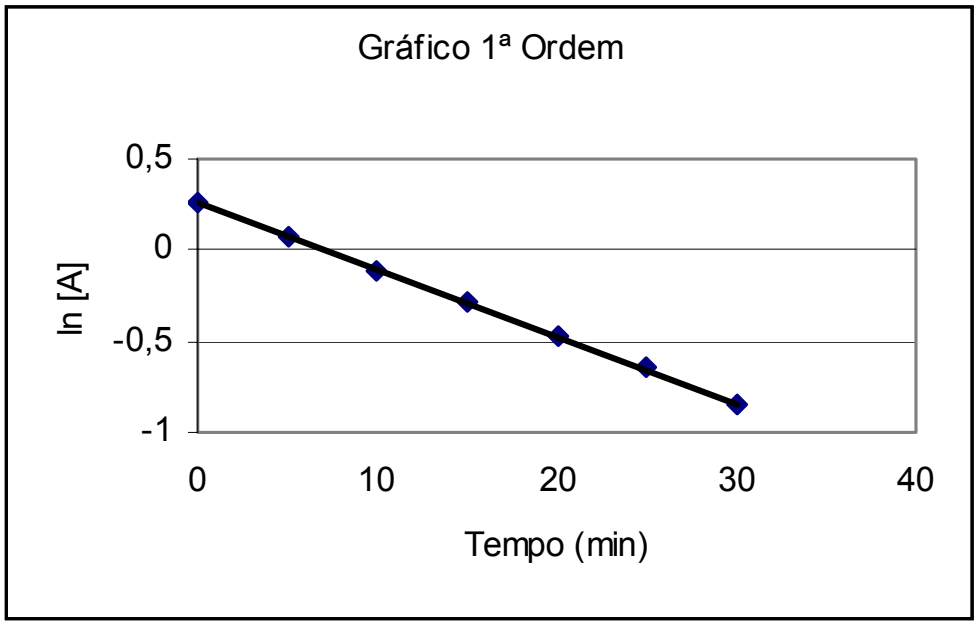


Figura 9: Modelo gráfico para reação de primeira ordem: valores do logaritmo natural da concentração do reagente A em função do tempo (min).

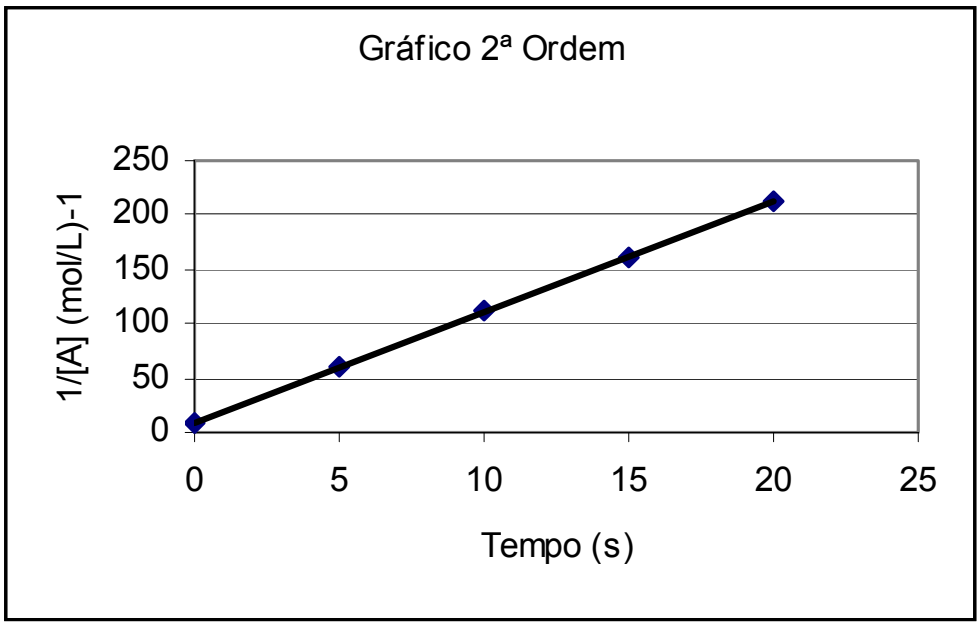


Figura 10: Exemplo gráfico para reação de segunda ordem: inverso dos valores da concentração do reagente A (mol/L^{-1}) em função do tempo (s).

Mediante a análise do gráfico elaborado como descrito anteriormente, verifica-se e a correlação entre os dados, e aquele que mais se aproxima da linearidade indica a ordem da reação (NUDELMAN, 1975).

A correlação entre o percentual do fármaco não degradado *versus* o tempo é usualmente empregada em gráficos de dispersão XY na determinação da ordem da reação química. A literatura apresenta, dentre outros estudos, a avaliação da influência do pH e temperatura nos processos de degradação do cloridrato de cefetamete pivoxila. Neste caso, o fármaco foi exposto a diferentes condições hidrolíticas (faixa de pH entre 0,44 e 8,00), e temperaturas variando entre 333 a 363 K (59,5 a 89,5° C), obtendo-se um processo de degradação que obedece a uma cinética de segunda ordem (JELINSKA; DOBROWOLSKI; OSZCZAPOWICZ, 2004). Já no estudo de fotoestabilidade do nifedipino realizou-se a exposição do fármaco à luz UV (40 W, por 300 min), obtendo-se cinética de ordem zero no início da reação (até 175 min) e, posteriormente, cinética de segunda ordem (SHAMSIPUR et al., 2003).

Tal metodologia de avaliação da degradação também tem contribuído para a determinação da cinética de degradação de produtos naturais. A estabilidade do ácido litospérmico B (LAB), um ácido polifenólico da espécie *Salvia miltiorrhiza*, foi

monitorada em meio com pH variados. Neste, foi possível observar que LAB é mais estável em pH 2,0 demonstrando cinética de primeira ordem na reação de hidrólise (GUO et al., 2007).

Pelo exposto, o desenvolvimento e validação de um método analítico indicativo da degradação do fármaco original é justificável, pois possibilita o monitoramento da qualidade de novos fármacos e /ou produtos farmacêuticos.

1.2.5 Métodos analíticos indicativos de estabilidade

O processo de degradação de um fármaco pode ser monitorado por um método analítico suficientemente sensível e seletivo, que permita detectar com exatidão e, precisão, os produtos degradados. Os métodos indicativos de estabilidade são metodologias analíticas validadas capazes de detectar mudanças nas propriedades químicas, físicas ou microbiológicas de um fármaco, de modo a quantificar seus ativos, produtos de degradação ou outros componentes, sem interferências (BAKSHI; SINGH, 2002).

As técnicas mais comumente empregadas nas análises de amostras submetidas a testes de estabilidade são titulometria, espectrometria, análise térmica e cromatografia. Esta última, aliada a detectores por espectrometria de massas e arranjo de diodos (PDA), tem sido aplicada com maior frequência devido à possibilidade de quantificar concentrações relativamente baixas de produtos de degradação, com exatidão, alta capacidade de resolução e sensibilidade mas, principalmente, elevada especificidade (BAKSHI; SINGH, 2002).

Os detectores PDA, diferentemente dos detectores UV-VIS tradicionais (operam com um feixe único de radiação UV-VIS, medindo a absorbância num único comprimento de onda), têm fontes intercambiáveis com lâmpadas de tungstênio e deutério (Figura 11). As emissões de radiação destas lâmpadas são focalizadas através de uma lente sobre a amostra. Assim, todo o espectro de emissão da lâmpada incide sobre a mesma, sendo que a radiação incidente será, em parte, absorvida. Esta radiação que atravessou a amostra irá incidir sobre uma lente que focaliza o feixe sobre uma fenda, e desta sobre uma grade de difração. Esta grade irá difratar a radiação, separando os seus diferentes comprimentos de onda, sendo que cada um deles irá incidir sobre um arranjo do diodo. Este diodo, ao ser irradiado, produz uma corrente elétrica cuja magnitude depende da

intensidade da emissão. Através de um circuito de calibração adequado, esta corrente será transformada em absorbância, na faixa de 200 a 800 nm, resultando no espectro de absorção por varredura (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

Adicionalmente, o uso do PDA também permite que seja realizada a avaliação da pureza pela sobreposição dos espectros do início, topo e final do pico cromatográfico (“upslope”, “top” e “downslope”) e o armazenamento simultâneo dos dados. Com este recurso, é possível reconhecer, de maneira eficiente, picos interferentes nas análises cromatográficas, e ainda facilita na identificação de espécies e na escolha das melhores condições cromatográficas na determinação quantitativa de fármacos (MASTER, 1994; SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

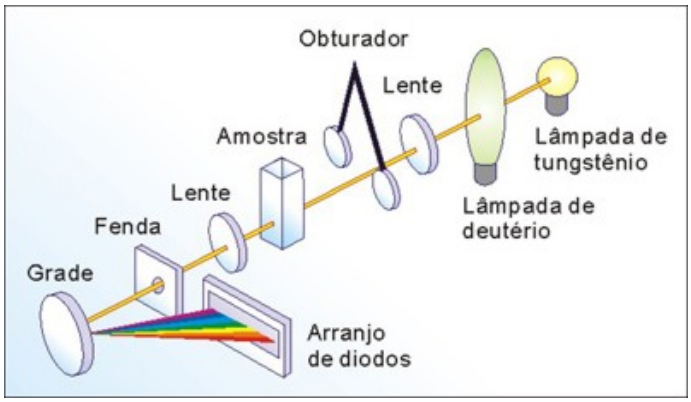


Figura 11: Esquema óptico de um espectrofotômetro de detector de arranjo de diodos (Fonte: http://www.chemkeys.com).

A utilização de detector PDA permite ainda, a determinação da absortividade molar (Є), que representa a quantidade exata de luz UV que é absorvida pela amostra. Esta é uma constante física que caracteriza a substância analisada. Pela medida do Є é possível verificar a quantidade de energia eletromagnética requerida para excitar um elétron para um nível superior de energia, provocando a transição $\pi \rightarrow \pi^*$, promovendo a absorção de energia (MURRY, 2006). O cálculo do Є pode ser realizado aplicando-se a equação (**10**) (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 1979):

$$Є = A / (C \times l) \qquad \textbf{(10)}$$

Onde: A é absorbância; C concentração (g por 100 mL) e *l* o caminho óptico através da amostra (cm).

Complementarmente à identificação cromatográfica, a caracterização química estrutural dos produtos de degradação pode ser realizada utilizando-se técnicas clássicas como ressonância magnética nuclear (RMN), espectrometria de massas (EM), infravermelho (IV), dentre outras.

1.3 Validação da metodologia analítica de quantificação de fármacos

A validação de metodologias quantitativas abrange um conjunto de procedimentos que visam assegurar a confiabilidade dos resultados encontrados, em ensaios experimentais (BRASIL, 2003; ICH, 2005). Além disto, possibilita a avaliação da adequação do método analítico à aplicação pretendida e ainda, o estabelecimento de procedimentos e cuidados necessários para a realização das análises sendo, por isto, um dos requisitos para registro de produtos junto às autoridades regulatórias mundiais.

No Brasil, a ANVISA e o INMETRO são as agências responsáveis pela certificação dos laboratórios aptos a realizarem validações analíticas comerciais. Outras entidades como IUPAC e ICH, que tem atuação internacional, também têm estabelecidos guias e normas com recomendações e requisitos mínimos para a avaliação de métodos analíticos comerciais. Estas instituições visam, através da normatização, harmonizar diferenças nas aplicações de análises de produtos farmacêuticos em todo o mundo.

Neste sentido, a validação analítica deve atender à finalidade de aplicação do método. Sendo assim, os procedimentos de validação de metodologia estão classificados em 4 categorias, de acordo com a finalidade de procedimento analítico empregado (Quadro 2). Para cada uma destas categorias estão indicados os testes a serem executados, como descritos no quadro 3.

Para o registro de medicamentos no Brasil, além da validação analítica, publicou-se recentemente uma orientação legal que prevê o monitoramento da degradação de fármacos sob condições de estresse (BRASIL, 2008). Os ensaios estabelecidos neste informe técnico preconizam a identificação e quantificação de produtos de degradação, segundo método validado indicativo da estabilidade.

Quadro 2. Classificação dos testes, segundo sua finalidade.

Categoria	Finalidade do teste
I	Testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas
II	Testes quantitativos ou ensaio limite para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias-primas
III	Testes de performance (*p.e.* dissolução, liberação do ativo)
IV	Testes de identificação

Fonte: BRASIL, 2003.

Quadro 3. Ensaios necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade.

Parâmetro	Categoria I	Categoria II		Categoria III	Categoria IV
		Quantitativo	Ensaio limite		
Especificidade	Sim	Sim	Sim	*	Sim
Linearidade	Sim	Sim	Não	*	Não
Intervalo	Sim	Sim	*	*	Não
Precisão intra-dia	Sim	Sim	Não	Sim	Não
Precisão inter-dia	**	**	Não	**	Não
Limite de detecção	Não	Não	Sim	*	Não
Limite de quantificação	Não	Sim	Não	*	Não
Exatidão	Sim	Sim	*	*	Não
Robustez	Sim	Sim	Sim	Não	Não

* pode ser necessário, dependendo da natureza do teste específico.

** não é necessária se houver comprovação da reprodutibilidade.

Fonte: BRASIL, 2003.

Para substâncias isoladas ou matérias-primas pode-se monitorar a substância original realizando sua quantificação, desde que seletivamente. Neste caso, a validação analítica é conduzida de modo a atender aos critérios exigidos para metodologias analíticas da categoria I. Desta forma, os parâmetros a serem avaliados na validação deste método analítico são: especificidade/seletividade, linearidade, intervalo, precisão, limite de quantificação, exatidão e robustez (BRASIL, 2003).

1.3.1 Especificidade/seletividade

É a capacidade que o método possui de avaliar exatamente uma substância na presença de outros componentes como *p.e.* impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz. No caso de medicamentos, a seletividade do método pode ser demonstrada por meio da comparação da análise de amostras contendo apenas placebo, e aquelas contendo somente o analito (BRASIL, 2003).

1.3.2 Linearidade e Intervalo

É a capacidade de uma metodologia analítica demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro do intervalo especificado. Este parâmetro da validação pode ser expresso por uma curva padrão. Havendo relação linear, os resultados do teste deverão ser tratados por métodos estatísticos apropriados para determinação do coeficiente de correlação linear (R^2), intersecção com o eixo y, coeficiente angular e desvio padrão relativo (BRASIL, 2003).

1.3.3 Limites de Detecção e Quantificação

O limite de detecção (LD) é considerado a menor concentração do analito presente em uma amostra que é possível detectar, porém, não necessariamente, quantificar. O limite de quantificação (LQ) é estabelecido como a menor quantidade de analito de uma amostra que pode ser quantificado com precisão e exatidão, sob condições analíticas estabelecidas (BRASIL, 2003).

1.3.4 Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de amostra equivalente. A precisão pode ser expressa pelo desvio padrão relativo (DPR) ou pelo coeficiente de variação (CV%) e é avaliada de duas formas (BRASIL, 2003).

A precisão intra-dia ou intra-ensaio avalia a repetibilidade do método, com o mesmo analista e mesma instrumentação. Já a precisão intermediária, inter-dia ou

inter-ensaio é avaliada por meio de análises em dias diferentes e/ou analistas diferentes. Para métodos cromatográficos, o ICH preconiza controlar a variabilidade a valores menores que 5% .

1.3.5 Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo, em relação ao valor verdadeiro. A exatidão é calculada como porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado à amostra, ou como a diferença percentual entre as médias e o valor verdadeiro aceito, acrescida dos intervalos de confiança (BRASIL, 2003).

A exatidão do método deve ser determinada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da especificidade do mesmo. É expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente.

1.3.6 Robustez

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o uso normal (BRASIL, 2003).

Durante o desenvolvimento da metodologia, deve-se considerar a avaliação da robustez e, se verificada susceptibilidade do método às variações nas condições analíticas, estas deverão ser controladas e precauções devem ser incluídas durante a análise.

Objetivos

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

- Desenvolvimento e validação de um método analítico por CLAE-PDA para quantificação do 4-NRC e separação de seus prováveis produtos de degradação, sob condições de estresse físico-químicas.

2.2 Objetivos Específicos

- Obtenção dos dados relativos aos parâmetros analíticos de validação cromatográfica como seletividade, linearidade, limites de quantificação e detecção, precisão intra e inter-dias, além de exatidão e robustez.
- Estudo preliminar da estabilidade do 4-NRC, frente a condições de estresse fotolítico e hidrolítico;
- Avaliação do modelo de cinética de degradação do 4-NRC, sob condições de estresse.

Material e Métodos

3. Material e Métodos

3.1 Materiais

3.1.1 Reagentes e Soluções

- Água ultra pura obtida em unidade de purificação MilliQ (Simplicity 185, Millipore®).
- Reagentes de grau analítico (P.A.): acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH) (F. Maia®); acetona (ACE), diclorometano (DCM), éter etílico (ETE) e n-hexano (HEX) (Vetec®); clorofórmio ($CHCl_3$) (Impex®); peróxido de hidrogênio 50% (H_2O_2) (Brazmo®); ácido clorídrico (HCl) (Quimex®); hidróxido de sódio (NaOH) (Biotec®).
- Reagentes de grau espectroscópico: ácido trifluoracético (TFA) (Sigma Aldrich®); acetonitrila (ACN), etanol (EtOH) e metanol (MeOH) (J. T. Backer®).
- Sílica gel G 60 PF 254 (partículas 15 µm) para cromatografia em camada preparativa; Sephadex® LH 20 para cromatografia em coluna aberta, cromatoplacas de silicagel 60 sem indicador fluorescente para cromatografia em camada delgada, com espessura 0,25mm (Merck®).
- As placas cromatográficas foram visualizadas com radiações na região do ultravioleta (254 e 365 nm) e reveladas com vanilina sulfúrica (1 g/100 mL + 2% de ácido sulfúrico concentrado), com posterior aquecimento.

3.1.2 Equipamentos

- Balanças analíticas (A 6200, Tecnal®; AG 200, Gehaka® e FA 2104N, Celtac®); bomba de vácuo (TE 058, Tecnal®); Rotaevaporador (Q 344 B, Quimis®); peagômtero (TEC-2, Tecnal®); banho-maria (Alpha®).
- Câmara de fotoestabilidade (Zem®) instalada na Indústria Farmacêutica Halex Istar Ltda. A câmara dispõe de fonte de luz similar ao padrão de emissão D65/ID65, como lâmpada fluorescente artificial combinando emissão visível e UV (200 – 800 nm). D65 corresponde ao padrão internacional reconhecido para a luz do dia como definido na ISO 10977 (1993). ID65 é o equivalente ao padrão de luz indireta de interiores.

- Cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) (Shimadzu®), acoplado a detector de fotodiodos SPD M20A – DAD, hifenado a coluna analítica LC Column Slim Pack CLC ODS (M) 5 µm, 250 x 4,6 mm (Shimadzu®) e pré-coluna CLC GODS, 100 x 4,4 mm (Shimadzu®). As análises foram realizadas no programa LCsolution.
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) (Shimadzu®), acoplado a detector de ultravioleta SPD 10AVVP, hifenado a coluna analítica LC Column Slim Pack CLC ODS (M) 5 µm, 250 x 4,6 mm (Shimadzu®) e pré-coluna CLC GODS, 100 x 4,4 mm (Shimadzu®). As análises foram realizadas no programa Class VP 5.0.
- Luxímetro digital (MLM 1010, Minipa®).
- Micropipetas de volume variável 100 µL e 1000 µL (Pipetman, Gilson®).

3.1.3 Material botânico

As raízes de *Pothomorphe umbellata* foram coletadas no jardim de espécies cultivadas de *Piperaceae* do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (USP), em março de 2006. O material botânico foi identificado e uma amostra depositada no Instituto de Botânica, da USP (exsicata kato-0671).

3.2 Métodos

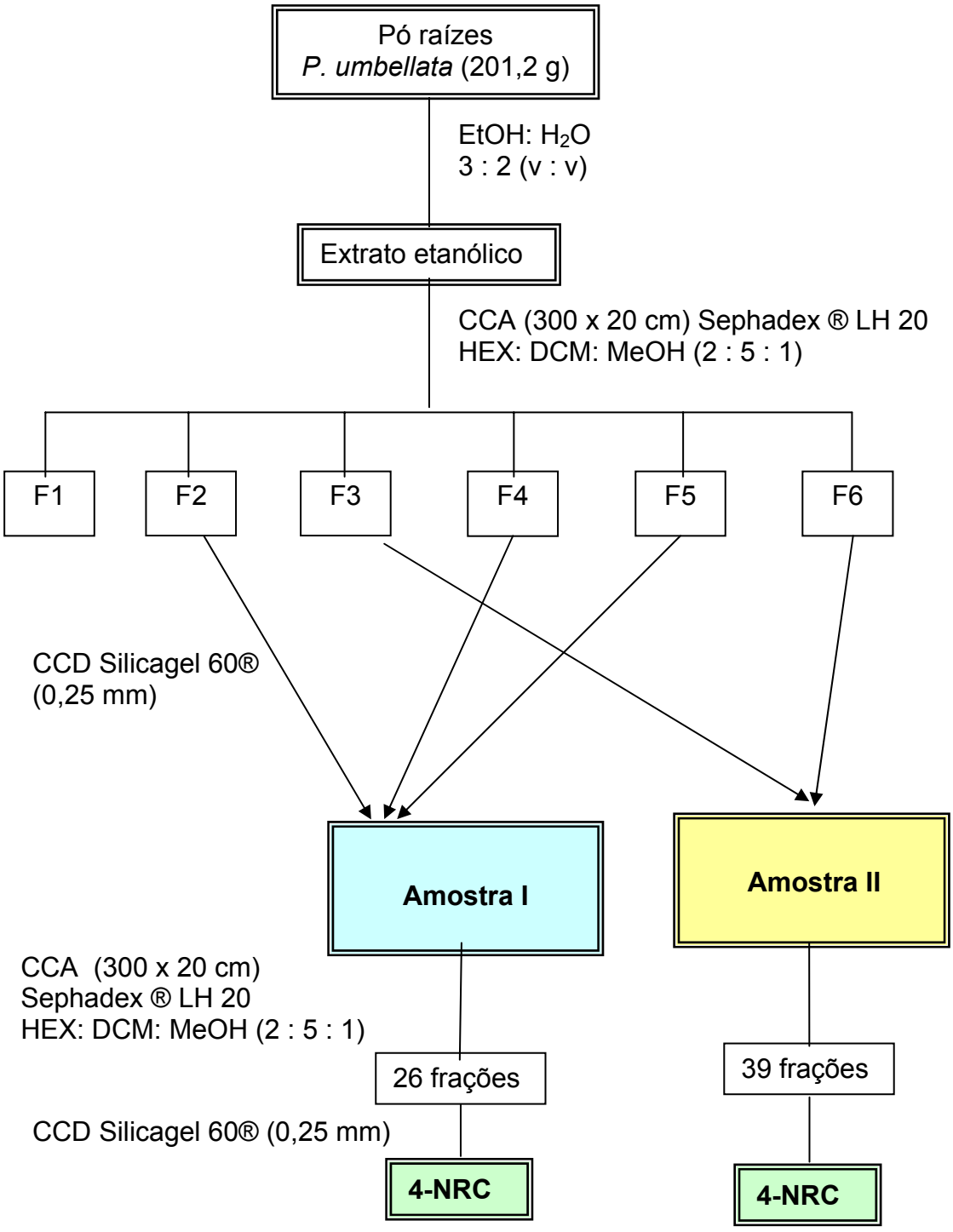
3.2.1 Preparo do extrato bruto de *Pothomorphe umbellata* e isolamento do 4-NRC

A obtenção e fracionamento do extrato de *P. umbellata* foram executados previamente de acordo com o método descrito por Soares (2007), no Laboratório de Biofarmácia e Farmacocinética da UFG e sumarizado a seguir (Esquema 2).

O extrato de *P. umbellata* foi obtido a partir da secagem e moagem de suas raízes em moinho de facas. O pó obtido foi tamizado [tamis nº II (Bertel®)] e submetido à percolação, com EtOH: H_2O (3 : 2 v/v) até o esgotamento da droga vegetal, segundo Farmacopéia Brasileira 1ª edição (1926). Este foi rotaevaporado e seco. O fracionamento e purificação do 4-NRC foram realizados em coluna cromatográfica aberta (CCA) (300 x 20 mm) com Sephadex® LH 20, utilizando

HEX: DCM: MeOH, na proporção de 2 : 5 : 1, como fase móvel. As frações obtidas (6) foram analisadas por cromatografia em camada delgada (CCD) com Silicagel 60® (0,25 mm), utilizando $CHCl_3$: EtOH (95 : 5) e purificadas até obtenção do 4-NRC puro. Estas frações (6) foram mantidas sob refrigeração a -20º C e protegidas com papel alumínio contra a incidência de luz. Quando descongeladas, procedeu-se a reunião destas de acordo com os perfis cromatográficos, reduzindo-as em duas subfrações (amostras I e II), conforme esquema 2.

As amostras I e II foram submetidas a CCA, seguindo as mesmas condições cromatográficas anteriormente descritas. Da amostra I, foram recolhidas 26 frações, e da amostra II, 39 frações (Tabela 1). Estas foram submetidas à evaporação do solvente e análise em CCD para reunião e repurificação. Na análise em CCD foram empregados dois sistemas cromatográficos, a saber: DCM: BZN: ETE (4 : 2 : 1), e o outro, $CHCl_3$: EtOH (95 : 5). Os resultados estão descritos no item 4.1.



Esquema 2: Fluxograma do fracionamento cromatográfico do 4-NRC, a partir de raízes de *P. umbellata*. Legenda: F1 - F6: frações 1 a 6.

Tabela 1: Volumes das frações repurificadas do 4-NRC, a partir de CCA.

Amostra I	
Frações	**Volume coletado (mL)**
F1 a F24	1 mL
F25 e F26	40mL
Amostra II	
Frações	**Volume coletado (mL)**
F1 e F2	9 mL
F3-F5	7 mL
F6 a F35	1 mL
F36 a F38	2 mL
F39	12 mL

3.2.2 Desenvolvimento e otimização de método analítico em CLAE-PDA para separação de produtos de degradação do 4-NRC

Para quantificação do 4-NRC e separação dos produtos de degradação relacionados foi desenvolvido um método analítico em CLAE, com detecção fotométrica com arranjo diodos (PDA). Baseado em condições cromatográficas de estudos anteriormente realizados (REZENDE, 2002; SOARES, 2007), desenvolveu-se o método analítico deste estudo. Diferentes gradientes de eluição, tempo e proporção entre os solventes orgânicos foram avaliadas para a mistura MeOH: ACN: TFA 0,1%, com o objetivo de promover adequada separação dos produtos de degradação do 4-NRC. O fluxo de FM empregado nos testes foi de 1 ml/min, durante toda a corrida. Alguns dos exemplos de sistemas de eluição testados:

- Sistema 1:

Tempo (min)	MeOH (%)	ACN (%)	TFA 0,1% (%)
0 a 1	55	5	40
1 a 15	67	15	18
15 a 25	52	30	18
25 a 28	55	5	40

- Sistema 2:

Tempo (min)	MeOH (%)	ACN (%)	TFA 0,1% (%)
0 a 1	55	5	40
1 a 15	67	15	18
15 a 33	52	30	18
33 a 35	55	5	40

- Sistema 3:

Tempo (min)	MeOH (%)	ACN (%)	TFA 0,1% (%)
0 a 1	55	5	40
1 a 30	67	15	18
30 a 35	72	10	18
35 a 38	52	30	18

- Sistema 4:

Tempo (min)	MeOH (%)	ACN (%)	TFA 0,1% (%)
0 a 1	55	5	40
1 a 30	67	15	18
30 a 50	55	5	40

A separação cromatográfica foi testada empregando-se amostra padrão do 4-NRC puro (100 µg/mL, em EtOH) e outra semi-quantitativa de 4-NRC degradado, obtida após exposição em condição oxidativa (H_2O_2 50%), por 48 horas, em meio aquoso. Os subprodutos do 4-NRC obtidos foram extraídos utilizando $CHCl_3$ e, em seguida, diluídos com EtOH e posterior injeção em CLAE. Os dados obtidos na otimização do método analítico estão apresentados no item 4.2.

3.2.3 Validação do método analítico para avaliação do 4-NRC, sob condições de estresse físico-químicas, por CLAE-PDA

Na validação do método analítico foram preparadas amostras de 4-NRC nas concentrações de 5,0; 10,0; 25,0; 50,0; 125,0; 250,0; 375,0 e 500,0 µg/mL em EtOH e armazenadas em frascos âmbar para proteção contra incidência de luz.

Duplicatas destas soluções de trabalho foram analisadas por CLAE-PDA, em três dias consecutivos. As soluções foram mantidas a -20º C.

As condições cromatográficas empregadas foram desenvolvidas empregando MeOH: ACN: TFA 0,1% como fase móvel em modo gradiente (sistema 4; tabela 2), fluxo de 1,0 mL/min e monitoramento a 254 e 282 nm, com volume de injeção de 40 µL. O tempo total de corrida obtido foi de 50 minutos.

Tabela 2: Gradiente da fase móvel empregado no método analítico validado.

Tempo	MeOH (%)	ACN (%)	TFA 0,1% (%)
0 a 1 min	55	5	40
1 a 30 min	67	15	18
30 a 50 min	55	5	40

As curvas de calibração foram construídas utilizando as áreas dos picos cromatográficos *versus* as concentrações nominais das soluções de trabalho para obtenção coeficiente de correlação linear (r). Durante a validação foram avaliados os parâmetros de desempenho analítico do método.

3.2.3.1 Seletividade

A seletividade do método foi avaliada a partir dos perfis cromatográficos da fase móvel (MeOH: ACN: TFA 0,1%), do solvente utilizado no preparo das soluções de trabalho (EtOH) e da solução do 4-NRC, em 254 e 282 nm,. A ausência de sobreposição de pico(s) cromatográfico(s) no tempo de retenção do 4-NRC caracteriza a seletividade do método.

3.2.3.2 Linearidade

A linearidade do método foi estabelecida a partir da correlação entre as áreas dos picos cromatográficos das oito soluções de trabalho do 4-NRC (5,0; 10,0; 25,0; 50,0; 125,0; 250,0; 375,0 e 500,0 µg/mL) *versus* as concentrações nominais do 4-NRC, sob monitoramento a 254 e 282 nm. A equação da reta (y = ax + b) foi determinada, calculando-se o intercepto (b), a inclinação (a) e o coeficiente de

regressão linear (r). Para métodos cromatográficos analíticos, usualmente é preconizado r ≥ 0,99 (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

3.2.3.3 Limites de Detecção e Quantificação

O LD e LQ foram calculados segundo dados obtidos da curva de calibração realizada em 3 dias consecutivos (n=6), com concentrações de 5,0 a 500,0 µg/mL. Para os cálculos de LD e LQ foram empregadas as seguintes equações **11** e **12**:

$$\mathbf{LD = (3 \times DPb) / IC} \qquad \mathbf{LQ = (DPb \times 10) / IC} \quad (\mathbf{11} \text{ e } \mathbf{12})$$

Onde: DPb é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y (n=6) e IC é a inclinação da curva de calibração (BRASIL, 2003).

3.2.3.4 Precisão

A precisão intra-dia do método foi avaliada durante 3 dias diferentes, com a injeção em duplicada de oito concentrações do 4-NRC em EtOH. Para cálculo da precisão intra-dia avaliou-se o desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV) das médias das concentrações obtidas a cada dia.

Para a precisão inter-dias foi considerada a razão entre o desvio padrão e a média das médias diárias (n=3). Para cálculo da precisão utilizou-se a seguinte equação **13**:

$$\mathbf{DPR = (DP/CMD) \times 100} \quad (\mathbf{13})$$

Onde, DP é o desvio padrão e CMD, a concentração média obtida (BRASIL, 2003).

3.2.3.5 Exatidão

A exatidão do método foi determinada pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente. Para cálculo de exatidão foi utilizada a equação **14**:

$$\mathbf{Exatidão = \frac{concentração\ média\ experimental}{concentração\ teórica} \times 100} \quad (\mathbf{14})$$

Adicionalmente, calculou-se a porcentagem de erro sistemático, pela equação **15**:

$$\textbf{Exatidão}_{\%erro} = \frac{\textbf{conc. média experimental – conc. teórica}}{\textbf{conc. média experimental}} \times 100 \quad (\textbf{15})$$

3.2.3.6 Robustez

A robustez do método foi avaliada mediante alteração da fase móvel como a marca dos solventes e utilização de analistas diferentes, em equipamentos diferentes. Os resultados da validação analítica do método desenvolvido neste trabalho estão descritos no item 4.3.

3.2.4 Exposição do 4-NRC a condições de estresse

Anteriormente à avaliação das amostras submetidas às condições de estresse propostas neste trabalho, foi realizada a análise do 4-NRC intacto de acordo com o método validado (sistema gradiente 4). Os resultados destas análises estão apresentados no item 4.4.1.

3.2.4.1 Estudo fotolítico do 4-NRC

3.2.4.1.1 Preparo da amostra para exposição fotolítica

A solução utilizada no estudo fotolítico foi preparada a partir da pesagem do 4-NRC padrão puro (10 mg) e dissolução em 20 mL EtOH: H_2O (2 : 1), para concentração final de 500 µg/mL. Alíquotas de 1 mL desta solução foram transferidas para 10 *"vials".* Destes, dois foram protegidos da luz (controle).

3.2.4.1.2 Exposição das amostras em câmara de fotoestabildade

Os *"vials"* foram dispostos, na câmara de fotoestabilidade, lado a lado, de modo a promover a exposição máxima à fonte de luz e evitar a formação de

sombra. As amostras foram expostas a não menos que 1,2 milhões de lux/hora. O teste foi conduzido sob condições controladas de temperatura (30 ± 2º C) e umidade (75 ± 5%). As coletas, em duplicata, foram realizadas após 6, 24, 72 e 144 horas, e submetidas à análise cromatográfica. A amostra controle foi avaliada ao final do experimento (144 h).

A determinação do período de exposição foi estabelecida empregando-se a equação **16**, de acordo com o guia Q1B (ICH, 1996). Inicialmente, foi verificada a incidência de luminosidade no interior da câmara com o auxílio de luxímetro digital. Este valor foi aplicado à equação 16 e obtido o tempo mínino de exposição na câmara de fotoestabilidade para que ocorra a degradação da substância.

Tempo de exposição das amostras (h) = 1.200.000 / leitura do luxímetro (**16**)

Os resultados das análises das amostras expostas à ação fotolítica, por CLAE-PDA, estão apresentados no item 4.4.2.

3.2.4.2 Estudo hidrolítico do 4-NRC

3.2.4.2.1 Preparo da amostra para exposição alcalina

A solução do 4-NRC (10 mg) foi preparada em 10 mL EtOH: NaOH 0,1 M (1:4). A concentração final da solução foi de 1000 µg/mL e o pH 13,00. A solução foi acondicionada em tubo de vidro de borossilicato (tipo 1), vedado com tampa rosqueável e protegida da incidência de luz, por até 24 h. Decorridos os intervalos de exposição (1, 6, 12 e 24 horas), alíquotas (200 µL) foram retiradas e imediatamente analisadas por CLAE-PDA. Os resultados das análises cromatográficas das amostras expostas em meio alcalino estão apresentados no item 4.4.3.

3.2.4.2.2 Preparo da amostra para exposição ácida

A solução do 4-NRC (10 mg) foi preparada em EtOH : HCl 0,1 M (1 : 1), para concentração final 1000 µg/mL e pH de 1,00. Igualmente, um tubo de vidro de borossilicato (tipo 1) vedado com tampa rosqueável, foi utilizado para acondicionar

a solução, ao abrigo da luz e aquecida a 60° C, por até 48 horas. Durante os intervalos de exposição (1, 6, 12, 24, 40 e 48 horas), alíquotas (200 µL) foram retiradas e imediatamente analisadas por CLAE-PDA. As análises cromatográficas das amostras ácidas estão apresentados no item 4.4.4.

É importante ressaltar que, anteriormente à realização deste experimento, foi realizado um estudo piloto em que a solução do 4-NRC foi preparada como descrito acima, entretanto, esta foi mantida em temperatura ambiente. A análise cromatográfica das amostras-piloto evidenciaram um lento decaimento na concentração do 4-NRC, mesmo após 48 h em meio ácido. Baseado neste dado, o estudo foi então ajustado e as amostras submetidas a aquecimento.

Resultados e Discussão

4. Resultados e Discussão

4.1 Purificação do extrato bruto de *P. umbellata* e obtenção do 4-NRC

O processo de purificação do extrato bruto de *P. umbellata*, resultou na obtenção de 0,42 g do 4-NRC, representando um rendimento de 11,5% em relação ao extrato seco (raízes). A utilização das técnicas de CCA em Sephadex® e CCD possibilitou a obtenção da substância de interesse (4-NRC) com elevado grau de pureza, preservando suas características físico-químicas, com rendimento relativamente alto quando comparado à purificação em fase estacionária acídica, como sílica gel, onde observa-se a degradação do mesmo (SOARES, 2007).

Na análise da pureza das amostras de 4-NRC houve adequada separação cromatográfica. O fracionamento das amostras I e II (Esquema 2), quando analisado por CCD de sílicagel 60 e fase móvel $CHCl_3$: EtOH (95 : 5), evidenciou a presença de 4-NRC. Após revelação com vanilina sulfúrica (Figura 12) observa-se o aparecimento de coloração arroxeada. (Rf = 0,67), referente ao 4-NRC.

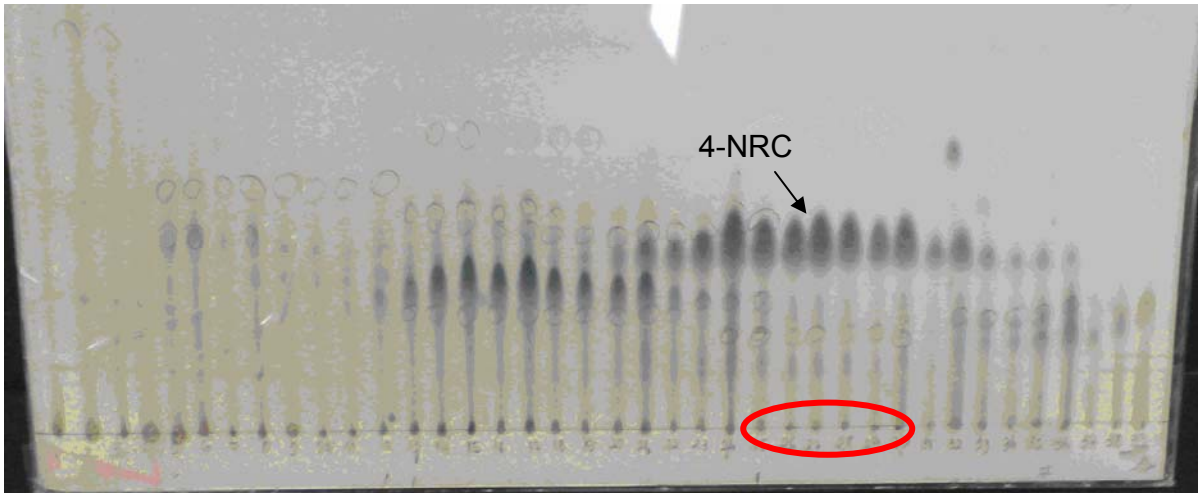


Figura 12: Cromatoplaca detalhando as frações contendo 4-NRC. Fase móvel: $CHCl_3$: EtOH (95 : 5); revelador: vanilina sulfúrica 1%.

O perfil de pureza da amostra padrão do 4-NRC selecionada para estudos de estabilidade, com t_R = 25,49 min, é destacado no cromatograma na figura 13. Pelo monitoramento realizado em 282 (Figura 13A) e 254 (Figura 13B) nm observa-se excelente simetria e resolução cromatográfica dos picos (*p.e*. ausência de cauda

ou “front”) e ausência de interferentes no espectro de varredura do 4-NRC (Figura 13C) evidenciando a pureza da amostra.

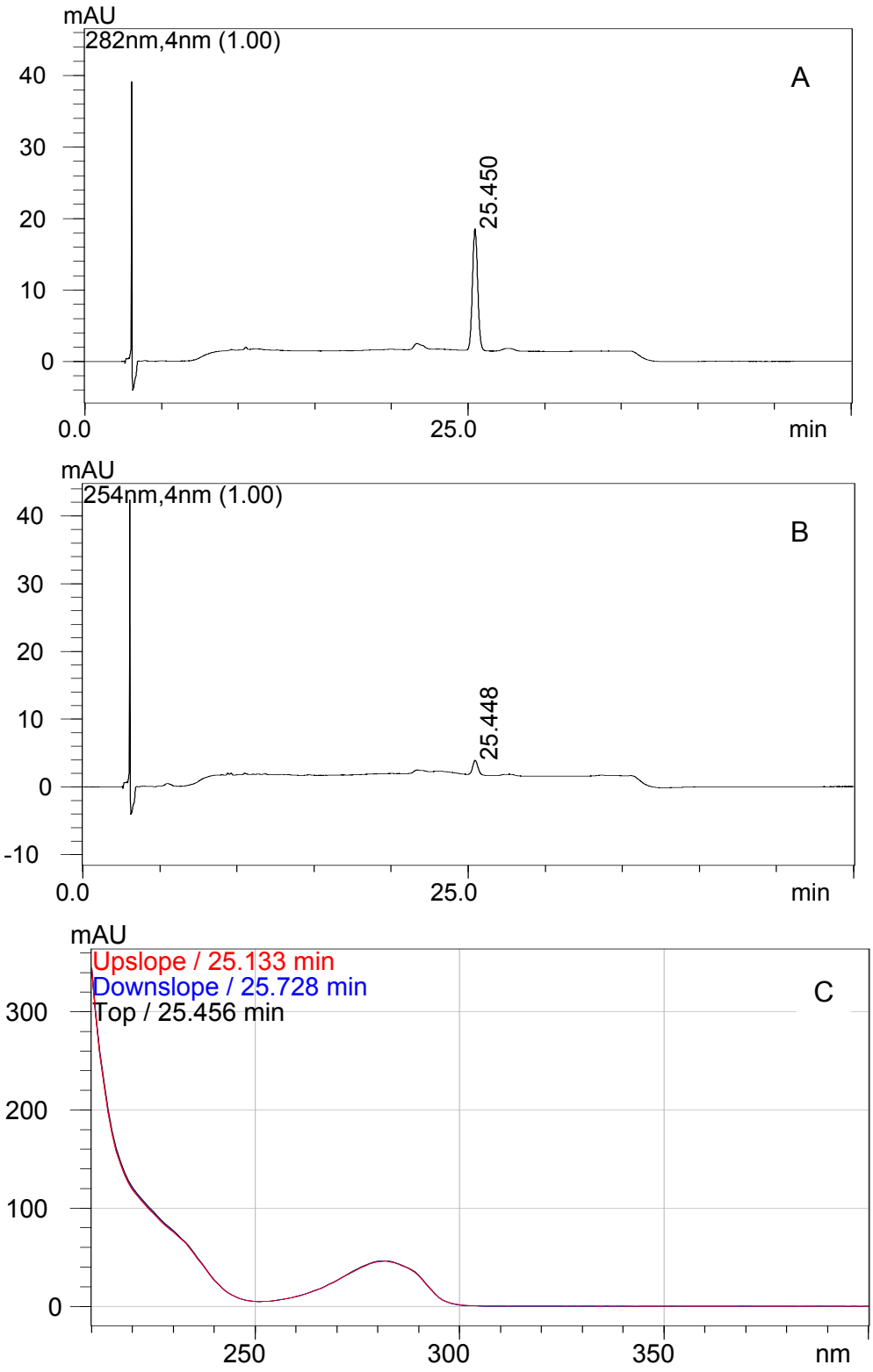


Figura 13: Cromatogramas da fração 3 (sistema gradiente 4) por CLAE-PDA (**A**: 282; **B**: 254 nm), fase móvel MeOH: ACN: TFA 0,1%, coluna C18 (250 mm x 4,6 mm) e fluxo de 1,0 mL/min. **C**: Espectro de varredura UV do pico do 4-NRC em t_R 25,45 min.

4.2 Otimização do método analítico para quantificação do 4-NRC e separação de seus produtos de degradação

Na análise do 4-NRC, a técnica CLAE tem sido amplamente aplicada por ser uma metodologia de fácil automatização e dada sua seletividade e sensibilidade. Geralmente as condições cromatográficas empregadas utilizam fase móvel com elevada proporção de solventes orgânicos e fase estacionária com característica apolar (*p.e.* C18), favorecendo a separação e quantificação do analito, com boa resolução e relativa sensibilidade. Freqüentemente, a detecção ultravioleta tem sido empregada como método de escolha na quantificação do 4-NRC na escala de microgramas (REZENDE; BARROS, 2004; SILVA et al., 2005), dada à presença de sistemas π eletrônicos conjugados na molécula em questão (MURRY, 2006). Também têm sido empregadas outras propriedades físico-químicas de detecção desta molécula, como o potencial REDOX na detecção eletroquímica (ROPKE et al., 2002) ou ainda, a avaliação de peso molecular como na espectrometria de massas (REZENDE, 2002), sempre que se necessita sensibilidade na faixa de nanogramas, como em estudos *p.e.* farmacocinéticos.

Baseando-se nas condições cromatográficas anteriormente estabelecidas, a otimização do método analítico por CLAE-PDA, foi realizada avaliando-se diferentes sistemas de eluição dos solventes MeOH, ACN e TFA 0,1%, como FM. Dentre os testes realizados, aquele que demonstrou melhor separação dos constituintes da amostra do 4-NRC degradado (H_2O_2 50%) foi o sistema 4 (item 3.2.2). Neste, empregou-se gradiente de MeOH: ACN: TFA 0,1% nas proporções 55 : 5 : 40 de 0 a 1 min, 67 : 15 : 17 de 1,01 a 30 min e em 30,01 min foi reestabelecido o gradiente inicial, para condicionamento adequado da coluna e injeção da amostra seguinte. Nestas condições foi possível a separação dos produtos degradados em tempos de retenção diferentes daquele do 4-NRC, assegurando a especificidade do método.

4.3 Validação do método analítico de avaliação do 4-NRC por CLAE-PDA

4.3.1 Seletividade

A seletividade do método foi demonstrada pela comparação dos cromatogramas obtidos da fase móvel (Figura 14), EtOH (Figura 15) e solução do 4-NRC em EtOH (Figura 16). Nestas condições, não se observa a presença de interferentes em tempos de retenção equivalentes ou próximos ao pico do 4-NRC.

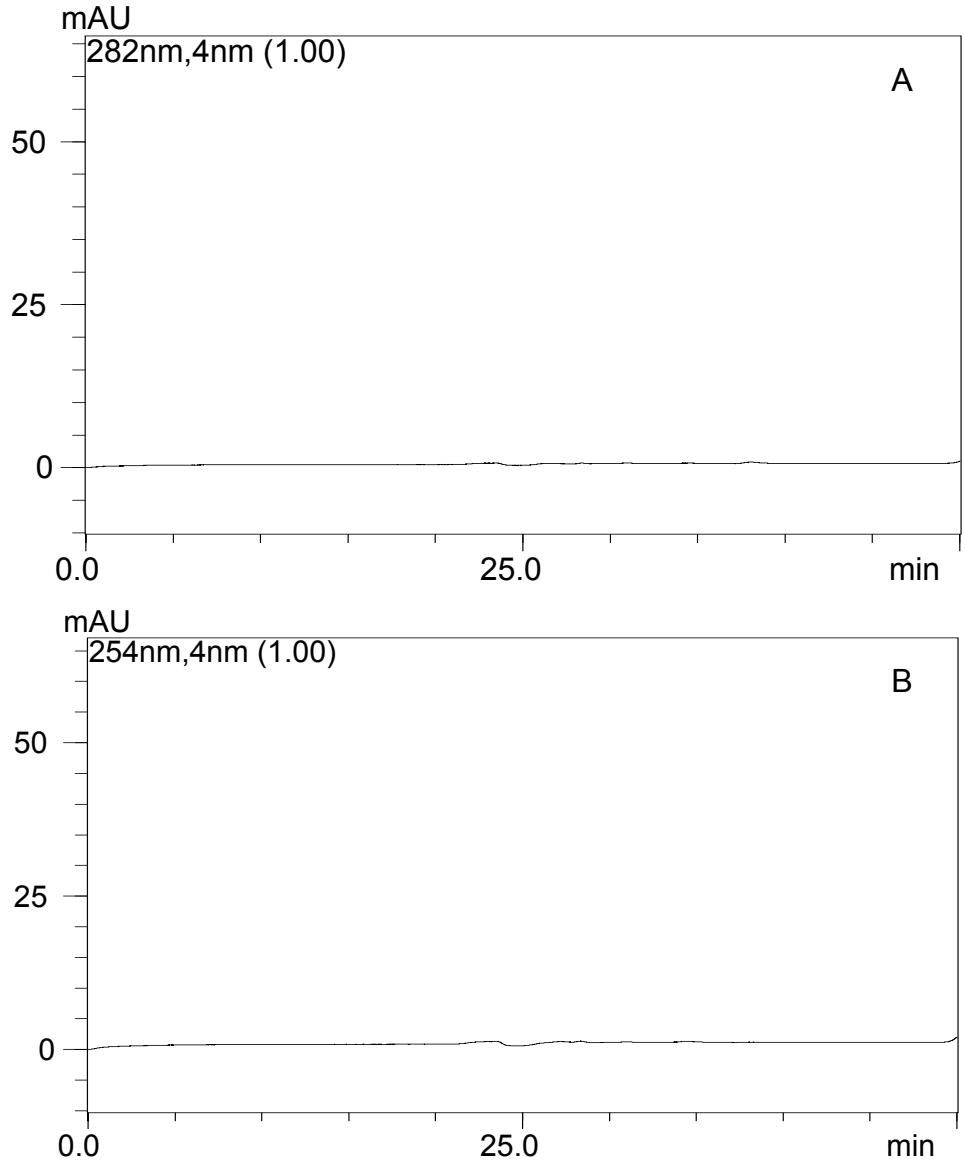


Figura 14: Cromatogramas da fase móvel com sistema gradiente 4 (MeOH: ACN: TFA 0,1%), com fluxo 1 mL/min, obtido em CLAE-PDA (**A**: 282 nm; **B**: 254 nm) e coluna C18 (250 mm x 4,6 mm).

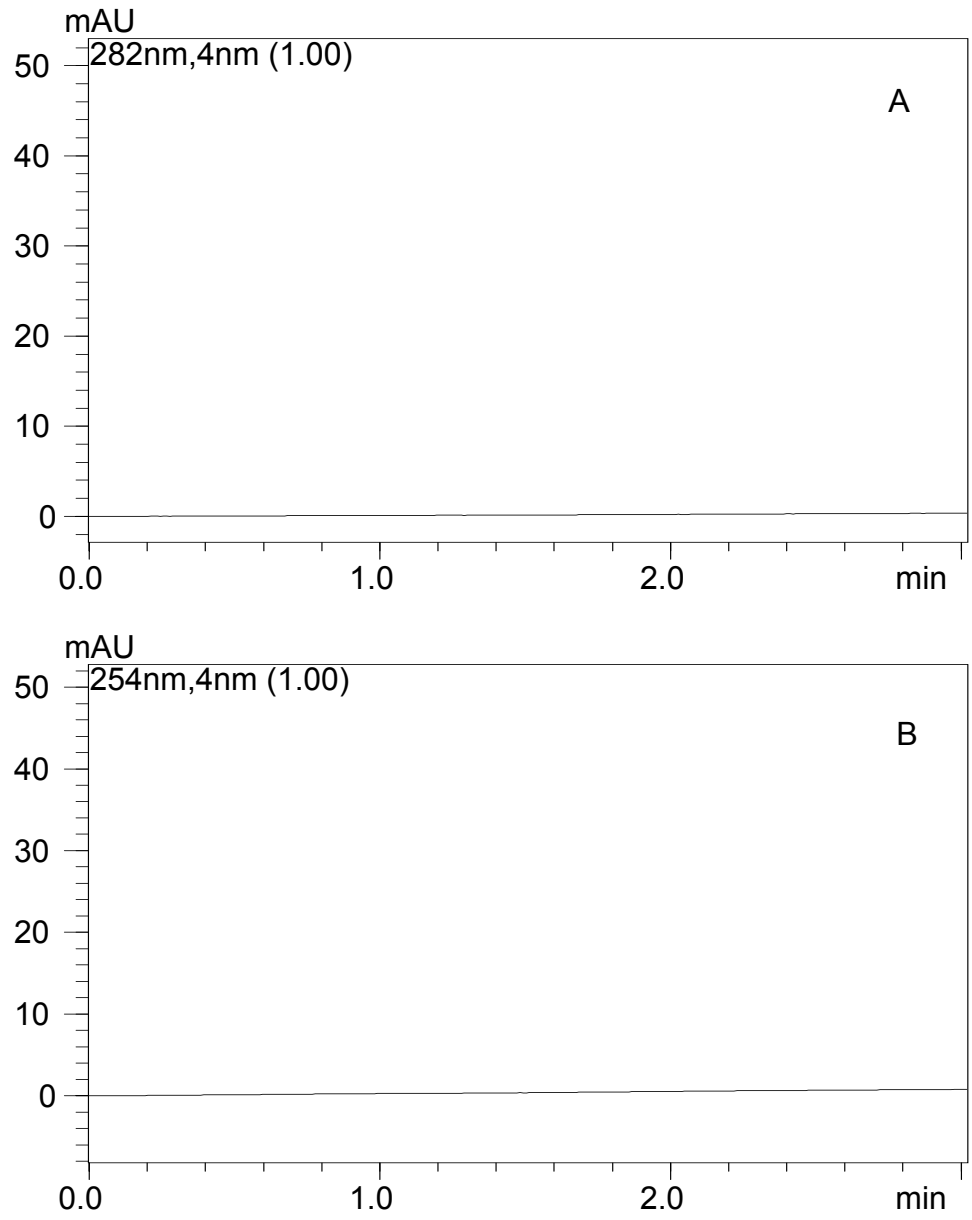


Figura 15: Cromatogramas do solvente (EtOH) com sistema gradiente 4 (MeOH: ACN: TFA 0,1%), com fluxo 1 mL/min, obtido em CLAE-PDA (**A**: 282 nm; **B**: 254 nm) e coluna C18 (250 mm x 4,6 mm).

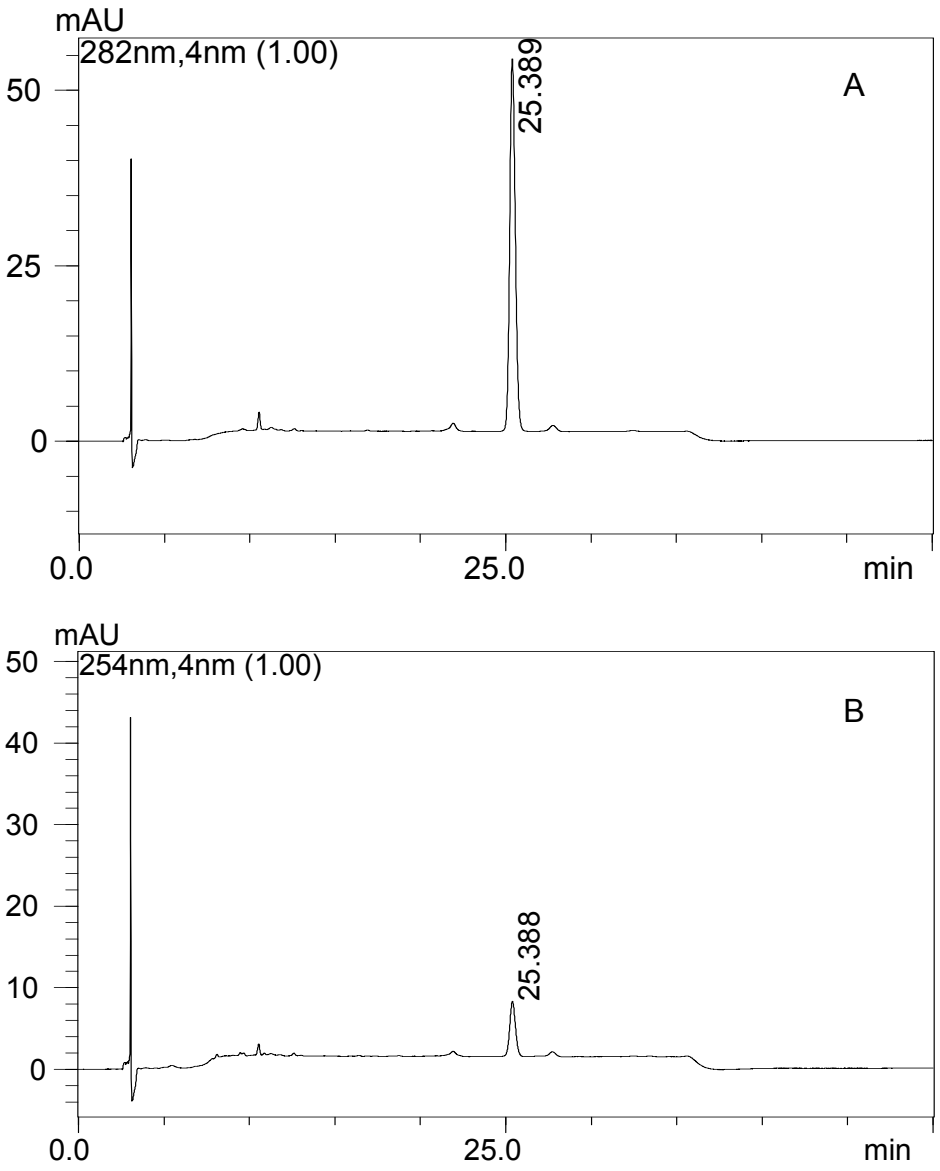


Figura 16: Cromatogramas da solução etanólica do 4-NRC (50 µg/mL) com sistema gradiente 4 (MeOH: ACN: TFA 0,1%), com fluxo 1 mL/min, obtido em CLAE-PDA (**A**: 282 nm; **B**: 254 nm) e coluna C18 (250 mm x 4,6 mm).

4.3.2 Linearidade

Os dados obtidos para a curva de calibração estão apresentados na tabela 3. A figura 17 representa uma das curvas de calibração da validação analítica. Estes resultados demonstram coeficientes de regressão linear adequados (r = 0,99972 ± 0,00015), segundo parâmetros amplamente difundidos (ANVISA, 2003; ICH, 2005).

Tabela 3. Coeficientes das equações lineares das soluções de calibração do 4-NRC em EtOH (5,0 a 500,0 µg/mL).

Dias	Inclinação (IC)	Intercepto (b)	r
Dia 1	21341	-22326	0,9996
	21439	-35476	0,9997
Dia 2	21032	-23417	0,9998
	21351	-42316	0,9995
Dia 3	21255	-31845	0,9998
	21010	-48750	0,9999
Média	**21238,00**	**-34021,67**	**0,99972**
DP	**178,04**	**10409,81**	**0,00015**

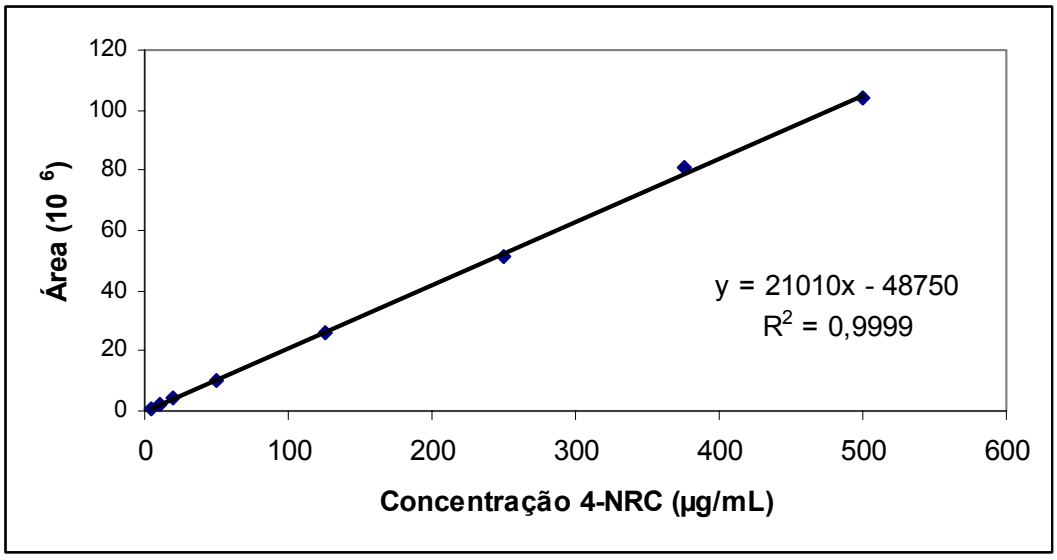


Figura 17: Curva de calibração da análise do 4-NRC, no intervalo de concentração nominal 5,0 a 500,0 µg/mL, referente à faixa linear do método.

4.3.3 Limites de Detecção e Quantificação

O LD calculado foi de 1,47 µg/mL, baseado nos dados da curva de calibração analítica (Tabela 3). O LQ calculado para o método foi de 4,90 µg/mL tendo em vista que, para concentrações decrescentes do analito até a menor concentração da curva de calibração (5,0 µg/mL), os valores de CV (tabela 4) variaram entre 0,14% (intra dia) e 1,91 % (inter dia) e, portanto, foram inferiores a 5% (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

4.3.4 Precisão

Os resultados de precisão intra e inter-dia do método, para várias concentrações, estão apresentados na tabela 4. Os valores de coeficiente de variação inter-dias máximo e mínimo foram de 4,89 e 0,59, respectivamente, indicando adequada precisão do método (ANVISA, 2003; ICH, 2005).

4.3.5 Exatidão

Os resultados de exatidão obtidos compreendem valores na faixa de 98,46% a 104,88% (Tabela 4). Tais dados encontram-se dentro dos valores internacionalmente aceitos para validação de metodologia analítica. Os percentuais de erros obtidos, comumente do tipo sistemáticos, foram de -1,57% a 4,64%, estando do mesmo modo adequados à validação da metodologia analítica (BRASIL, 2003; ICH, 2005) (Tabela 4).

Tabela 4. Dados de precisão e exatidão analítica do 4-NRC por CLAE-PDA, durante 3 dias da validação do método.

	Concentrações nominais (µg/mL)							
	5	**10**	**20**	**50**	**125**	**250**	**375**	**500**
	Concentrações obtidas (µg/mL)							
Dia 1	5,07	10,29	22,33	51,14	121,05	247,26	370,86	505,23
	5,10	10,31	22,03	50,66	121,34	246,78	370,96	505,36
Dia 2	4,88	10,72	20,29	49,96	125,07	244,85	374,63	502,76
	4,99	11,03	21,13	51,18	125,76	246,22	375,96	503,67
Dia 3	5,12	10,29	19,87	49,46	123,40	243,99	371,02	497,42
	5,13	10,28	20,20	49,82	124,25	247,77	376,01	499,03
Dia 1 (média,n=2, DP)	5,09±0,02	10,30±0,01	22,18±0,21	50,90±0,34	121,20±0,21	247,02±0,34	370,91±0,07	505,30±0,09
CV intra-dia 1 (%)	0,42	0,14	0,96	0,67	0,17	0,14	0,02	0,02
Dia 2 (média,n=2, DP)	4,94±0,08	10,88±0,22	20,71±0,59	50,57±0,86	125,42±0,49	245,54±0,97	375,30±0,94	503,22±0,64
CV intra-dia 2 (%)	1,54	2,09	2,83	1,72	0,40	0,39	0,25	0,13
Dia 3 (média,n=2, DP)	5,13±0,01	10,29±0,01	20,04±0,23	49,14±0,45	123,83±0,60	245,88±2,67	373,52±3,53	498,23±1,14
CV intra-dia 3 (%)	0,14	0,07	1,11	0,90	0,49	1,09	0,95	0,23
Média 3 dias (n=3, DP)	5,05±0,10	10,49±0,32	20,98±0,03	50,20±0,96	123,48±1,94	246,15±1,46	373,24±2,56	502,25±3,30
CV inter-dia (%)	1,91	3,02	4,89	1,90	1,57	0,59	0,69	0,66
Exatidão inter-dia(%)	100,97	104,87	104,88	100,41	98,78	98,46	99,53	100,45
Exatidão (% de erro)	*0,96*	*4,64*	*4,65*	*0,41*	*-1,23*	*-1,57*	*-0,47*	*0,45*

4.3.6. Robustez

Não foram verificadas mudanças significativas nos resultados frente às alterações propostas para a avaliação da robustez, como a execução da análise por analistas diferentes e em equipamentos diferentes, com variação das marcas de solvente grau espectrométrico, porém com a mesma coluna (Shimadzu®; 5 µm, 250 x 4,6 mm) (Tabela 5).

Tabela 5. Dados da robustez: avaliação do t_R frente a alteração de parâmetros analíticos.

Variável avaliada	Tempo de retenção médio do 4-NRC (n = 6)	Desvio Padrão (CV %)
Analista: Fabiana Equipamento: CLAE Shimadzu® modelo LC M20A Solventes MeOH e ACN: J. T. Backer®	25,32 min	1,05
Analista: Carina Equipamento: CLAE Shimadzu® modelo LC 10AV Solventes MeOH e ACN: Tedia®	24,98 min	1,34

4.4 Análise das amostras expostas à condição de estresse

4.4.1 Análise das amostras intacta do 4-NRC em EtOH, por CLAE-PDA

Previamente às análises das amostras submetidas às condições fotolítica e hidrolítica, analisou-se uma amostra intacta do 4-NRC em EtOH (500 µg/mL), protegida da incidência luminosa (Figura 18). O pico cromatográfico do 4-NRC, detectado em 25,37 min quando monitorado a 282 (Figura 18A) e 254 nm (Figura 18B), demonstrou um espectro de absorbância (Figura 18C) característico do analito, ao longo de toda a extensão do pico (“upslope”, “downslope” e “top”), confirmando sua identidade e pureza (KIJJOA et al., 1980).

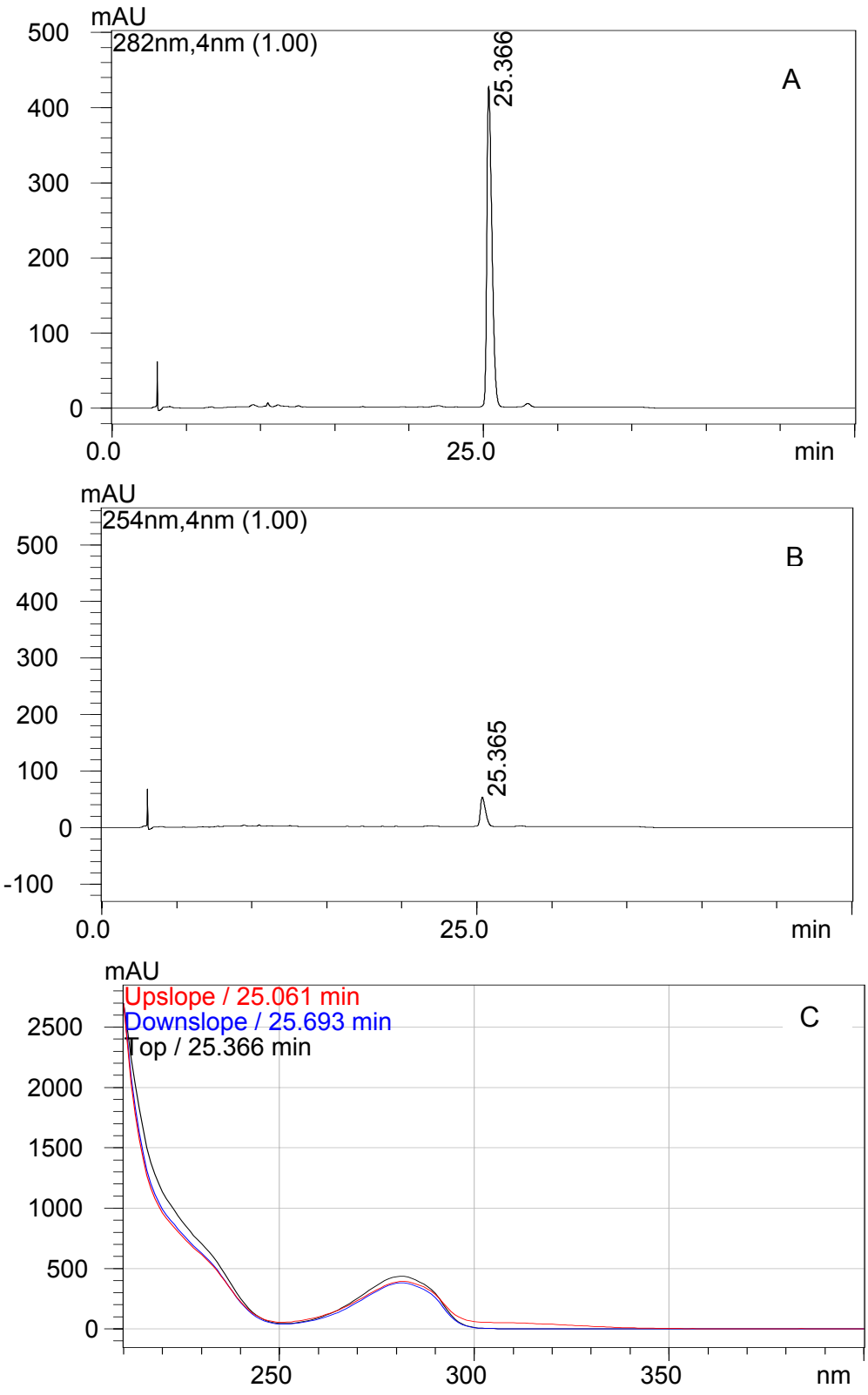


Figura 18: Cromatogramas da amostra intacta do 4-NRC/EtOH (500 µg/mL), com sistema gradiente 4 (MeOH: ACN: TFA 0,1%), com fluxo 1 mL/min, obtido em CLAE-PDA (**A**: 282 nm; **B**: 254 nm) e coluna C18 (250 mm x 4,6 mm). **C**: Avaliação da pureza do pico pela varredura espectral (UV) no início, meio e fim do pico.

4.4.2 Análise das amostras expostas à condição fotolítica, por CLAE-PDA

As amostras expostas à condição fotolítica foram analisadas, em CLAE-PDA, de acordo com os intervalos de tempo pré-determinados (6, 24, 72 e 144 h), conforme padronizado pelo método validado (sistema gradiente 4).

Após 6 h de exposição em câmara de estabilidade, o cromatograma da amostra já evidencia a diminuição da concentração do 4-NRC (Figura 19; 26,02 min; 155,15 µg/mL). Observa-se ainda, a presença de produtos de degradação mais polares que 4-NRC logo após 4 min (**1**) do início da corrida, após 13 min (**2**) e ainda, no intervalo entre 20-25 min (**3** e **4**), como apresentado na figura 19. No entanto, o pico cromatográfico com t_R próximo de 4 min (**1**) foi o mais expressivo, com intensidade superior ao do 4-NRC.

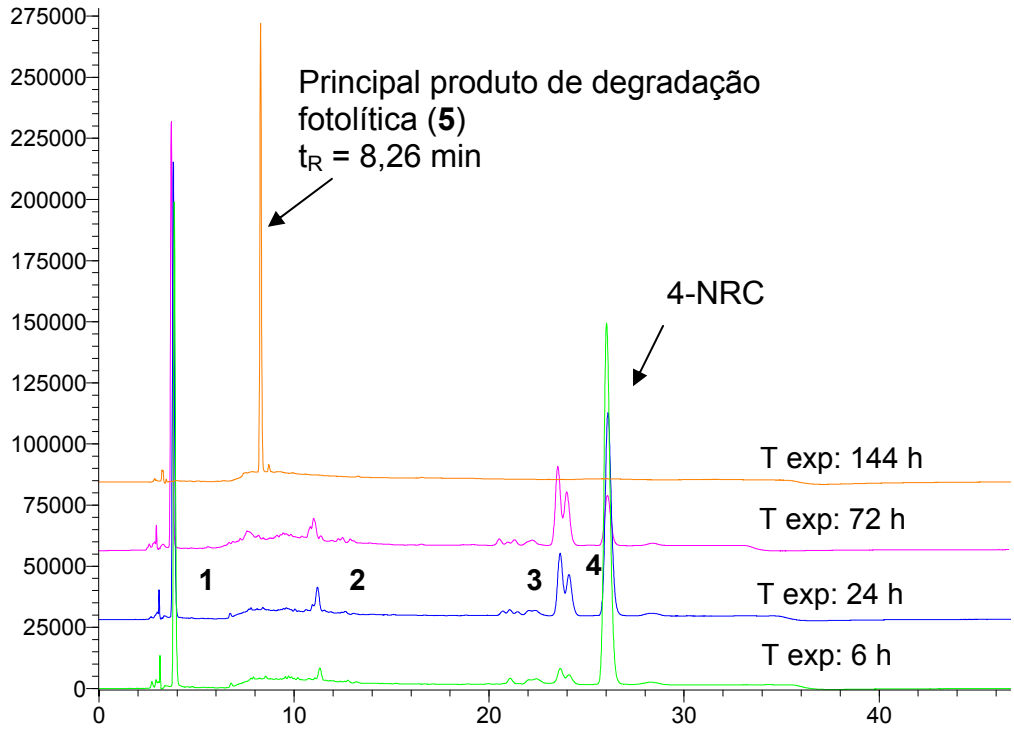


Figura 19: Cromatogramas das amostras do 4-NRC após 6, 24, 72 e 144 horas de exposição fotolítica do 4-NRC, com sistema gradiente 4 (MeOH: ACN: TFA 0,1%), fluxo 1 mL/min, em CLAE-PDA, coluna C18 (250 mm x 4,6 mm), 282 nm.

A avaliação espectrofotométrica na faixa do ultravioleta para o pico do produto de degradação fotolítica mais intenso (**1**), com t_R em 3,92 min, demonstra máximo de absorbância em 231 nm e picos secundários em 280 e 310 nm (Figura

20A), apresentando contaminantes neste mesmo tempo de retenção. No entanto, de acordo com espectro de varredura deste pico (Figura 20B), foram detectadas impurezas ao final do mesmo.

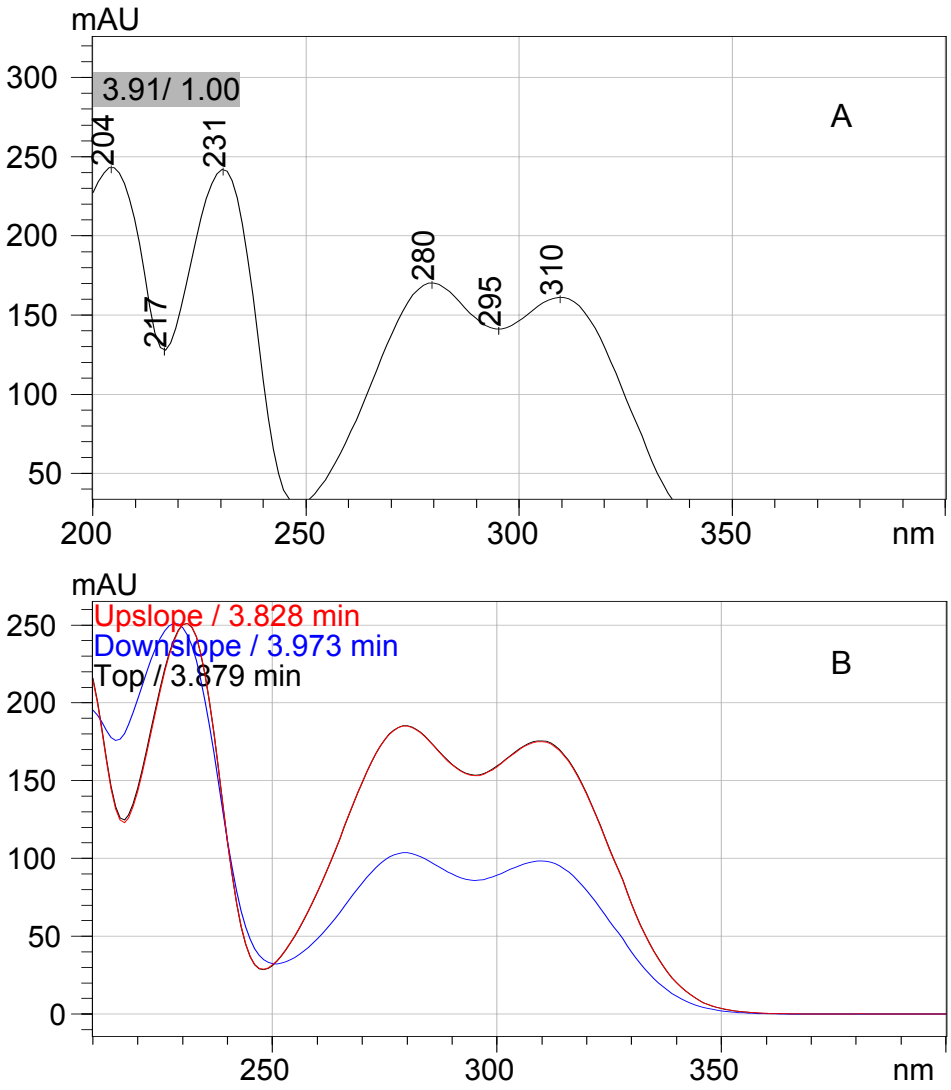


Figura 20: **A**: Espectro de ultravioleta do pico (**1**), com t_R 3,92 min, após 24 horas de exposição fotolítica. **B**: Avaliação da pureza do pico (t_R 3,92 min).

Decorridas 24 horas de exposição da amostra à luminosidade, há expressiva diminuição da concentração de 4-NRC (26,36 min; 89,59 µg/mL), comparativamente ao tempo de exposição anterior (6 horas). Observa-se ainda, o aumento das áreas dos picos (**2**) em t_R 13 min, e (**3** e **4**) entre 20-25 min, apontando a elevação na formação destes concomitante à diminuição da

concentração do 4-NRC (Figura 19). Perfil semelhante foi observado após 72 h de exposição, com o decréscimo acentuado da concentração do 4-NRC (27,94 min; 23,97 µg/mL) e a detecção de picos em t_R idênticos àqueles evidenciados anteriormente.

Após 144 h de exposição luminosa, houve a formação de um produto (**5**) ainda não observado nos cromatogramas anteriores, com t_R 8,26 minutos (Figura 19). Nesta análise não foi possível detectar, tampouco, quantificar a presença de 4-NRC, sugerindo que o mesmo tenha sido totalmente consumido no meio reacional. Assim, confirma-se que o tempo mínimo de exposição proposto neste trabalho (95 h), foi suficiente para provocar a extensa degradação da substância, considerando-se a intensidade luminosa (12.733 lux) medida no interior da câmara, aplicada na equação **16** (item 3.2.4.1.2).

Adicionalmente, após 144h verificou-se o desaparecimento dos picos relativos aos produtos de degradação formados com t_R 13 min (**2**) e entre 20 e 25 min (**3** e **4**). Para o principal produto de degradação fotolítica **(5**) (t_R = 8,26 min), o espectro ultravioleta (Figura 21) indica um máximo de absorção em 230 nm, indicando a ocorrência de um deslocamento hipsocrômico. É possível que a maior solvatação do par de elétrons *n* não-ligado tenha ocasionando a diminuição de energia no orbital *n* do grupo cromóforo (duplas ligações da porção isoprênica ou do anel aromático) (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002), ou ainda, tenha havido perda de grupos cromóforos na molécula de 4-NRC. Outros picos de absorção secundários do produto (**5**) foram verificados em 279 e 310 nm.

Mediante a análise comparativa dos cromatogramas obtidos após 6 h de exposição fotolítica até o final do experimento (144 h) (Figura 19) observa-se que o produto majoritário formado inicialmente (**1**) (t_R = 3,97 min) foi substituído pelo produto (**5**) com t_R 8,26 min. A origem do produto fotolítico (**5**) pode ser tentativamente explicada baseada nos indícios acima citados, onde a formação do produto mais polar (t_R = 3,97 min) precede ao mais apolar (t_R = 8,26 min) pela formação de um radical de reação fotolítica, ou ainda, por meio de dimerização por acoplamento oxidativo. No entanto, dados de RMN de ^{1}H, ^{13}C, espectros de massas e IV dos produtos purificados são indispensáveis para a determinação química estrutural dos produtos, tentativamente propostos.

Avaliando a figura 21B, verificamos que houve relativa sobreposição dos espectros no início, topo e final do pico cromatográfico do produto (**5**) indicando que

o mesmo apresenta grau de pureza parcial, porém satisfatório para assegurar, que mediante a validação da metodologia analítica aqui desenvolvida foi possível separar os principais produtos de degradação do 4-NRC.

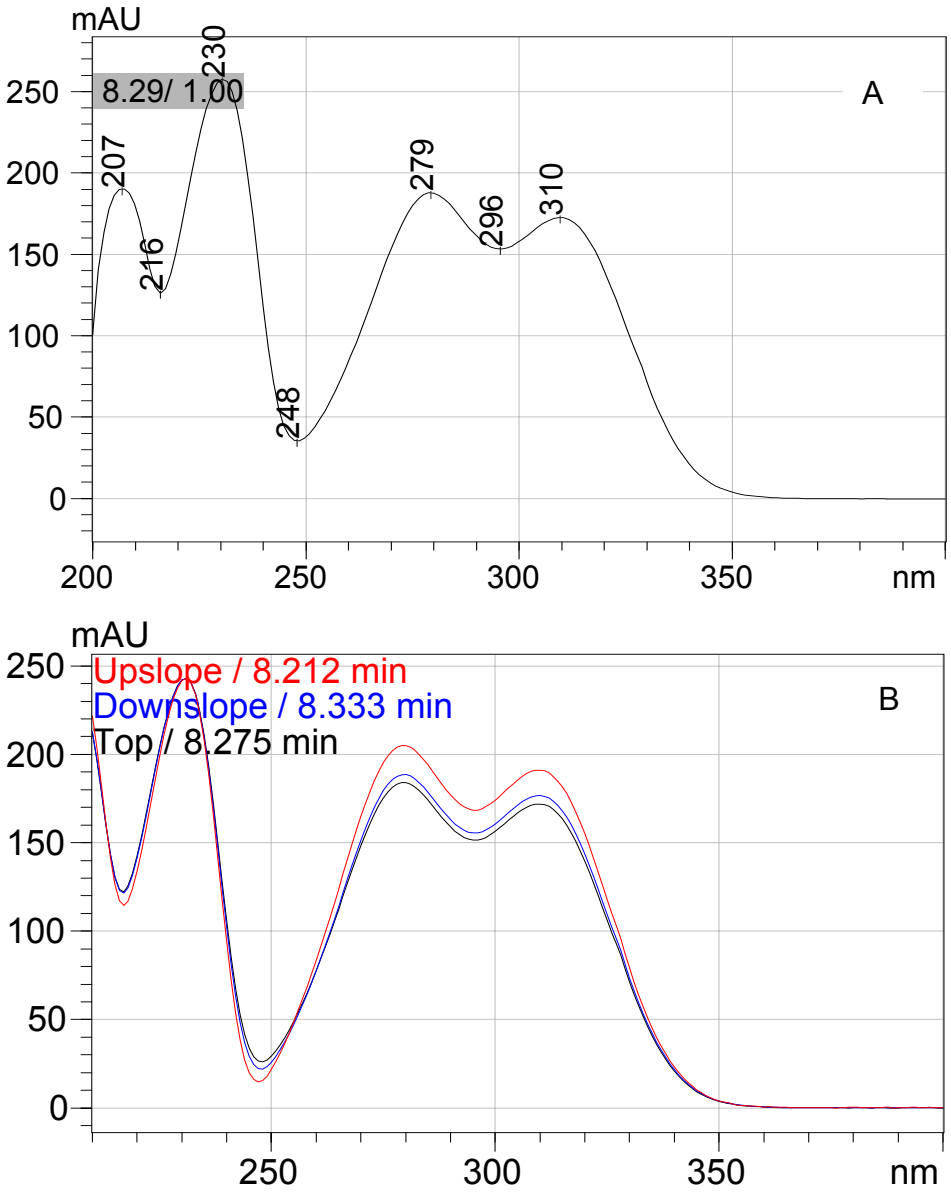


Figura 21: **A**: Espectro de ultravioleta do produto de degradação fotolítica (**5**), com t_R = 8,26 min, após 144 horas de exposição. **B**: Avaliação da pureza do pico (t_R = 8,26 min).

Diferentemente das informações indicativas da estabilidade do 4-NRC já obtidas frente à luminosidade UVB (280 a 320 nm) (SILVA et al., 2005), verificamos que quando há combinação de fontes de luz UV e visível (200 a 800 nm), ocorre degradação da substância em até 144 h, sugerindo que a instabilidade da mesma deve estar relacionada à luz visível, ou à presença de outras substâncias

antioxidantes/estabilizantes na meio analisado.

Ao final do experimento, a análise realizada para a amostra controle (protegida da incidência de luz), monitorada em 282 e 254 nm, indicou a estabilidade do 4-NRC e manutenção de sua característica original de absorbância (Figura 22). A concentração quantificada nesta amostra foi de 489,93 µg/mL.

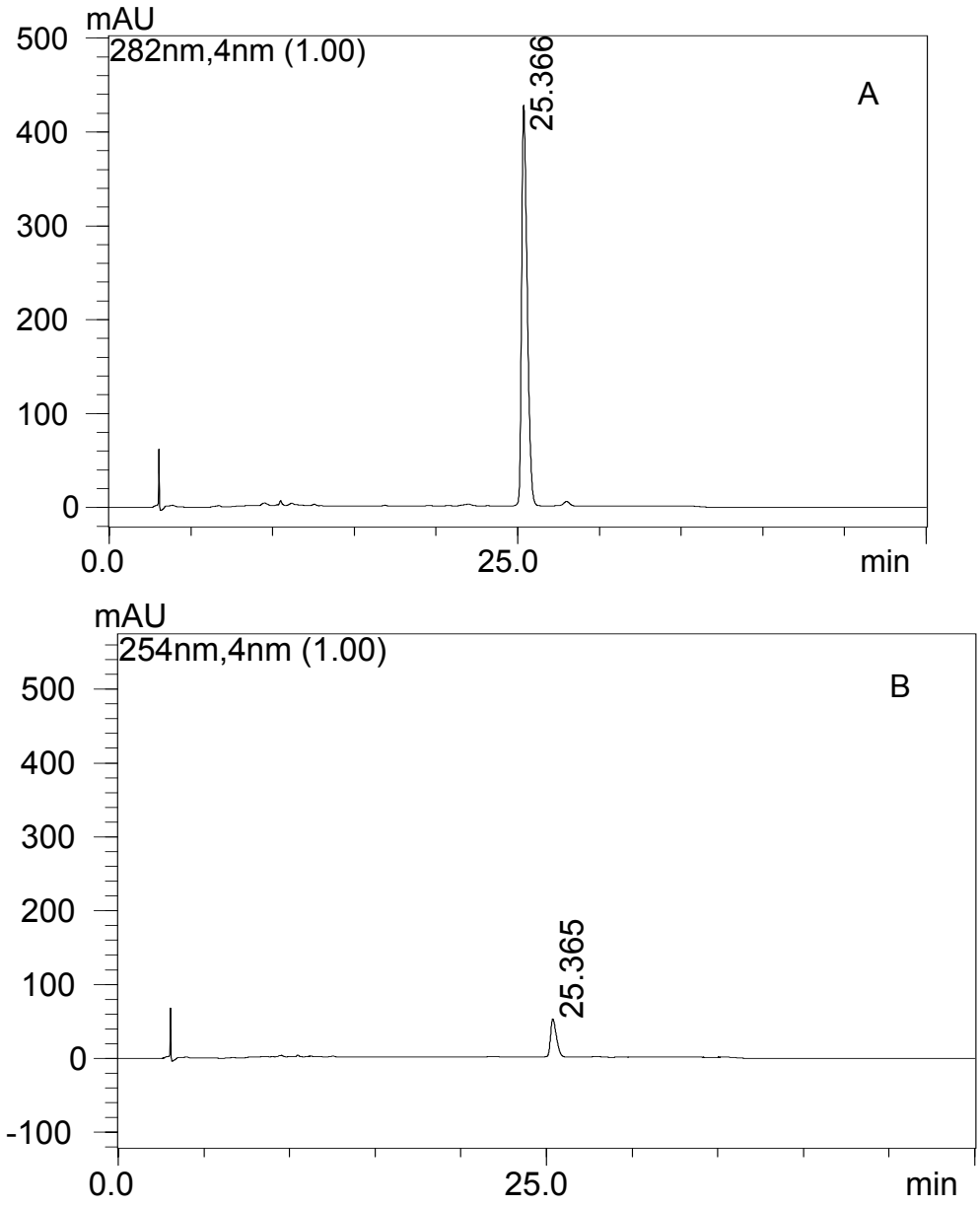


Figura 22: Cromatogramas da amostra controle do 4-NRC, após 144 h de exposição, protegido com papel alumínio, com sistema gradiente 4 (MeOH: ACN: TFA 0,1%), com fluxo 1 mL/min, obtido em CLAE-PDA (**A**: 282 nm; **B**: 254 nm) e coluna C18 (250 mm x 4,6 mm).

4.4.3. Análise das amostras do 4-NRC expostas ao meio alcalino, por CLAE-PDA

Os dados cromatográficos (sistema gradiente 4) das amostras coletadas após intervalos de 1, 6, 12 e 24 horas de exposição em pH alcalino (pH 13,00) mostraram perfil semelhantes (Figura 23). Nestes observa-se dois produtos de degradação em 25,6 e 26,8 min (**1** e **2**, respectivamente), ambos com perfil cromatográfico mais apolar que o 4-NRC. O máximo de absorbância do pico majoritário (**1**) ocorreu em 264 nm (Figura 24A), para o qual foi observada elevada pureza, confirmada pela sobreposição dos espectros de UV (Figura 24B).

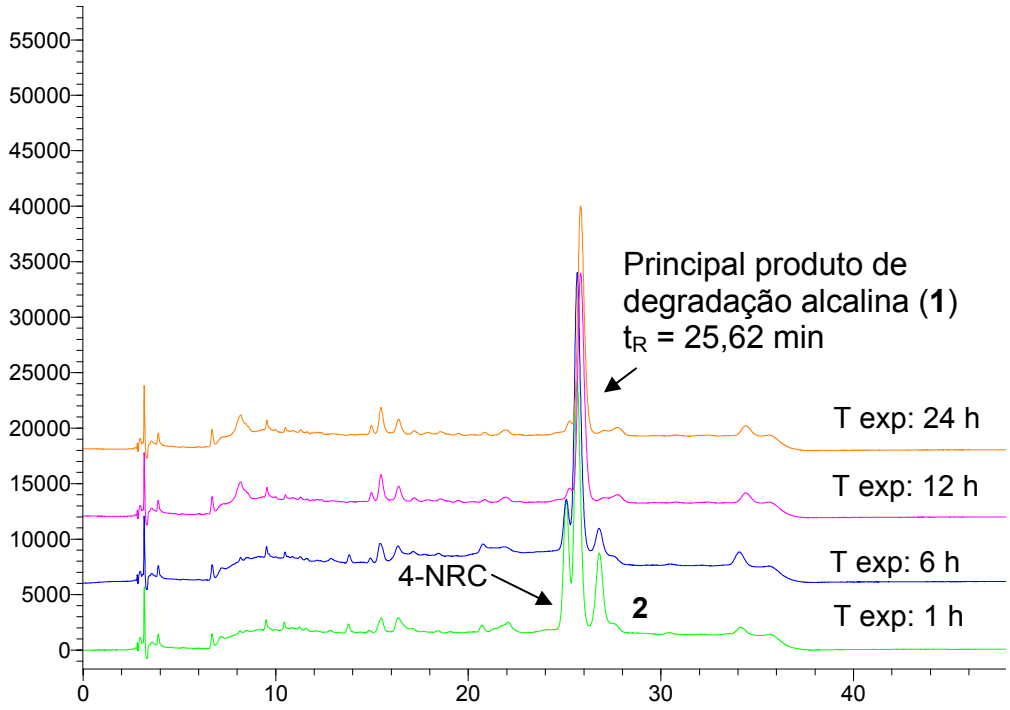


Figura 23: Cromatogramas das amostras do 4-NRC após 1, 6, 12 e 24 horas de exposição alcalina, com sistema gradiente 4 (MeOH: ACN: TFA 0,1%), com fluxo 1 mL/min, obtido em CLAE-PDA, coluna C18 (250 mm x 4,6 mm) e monitorado em 282 nm.

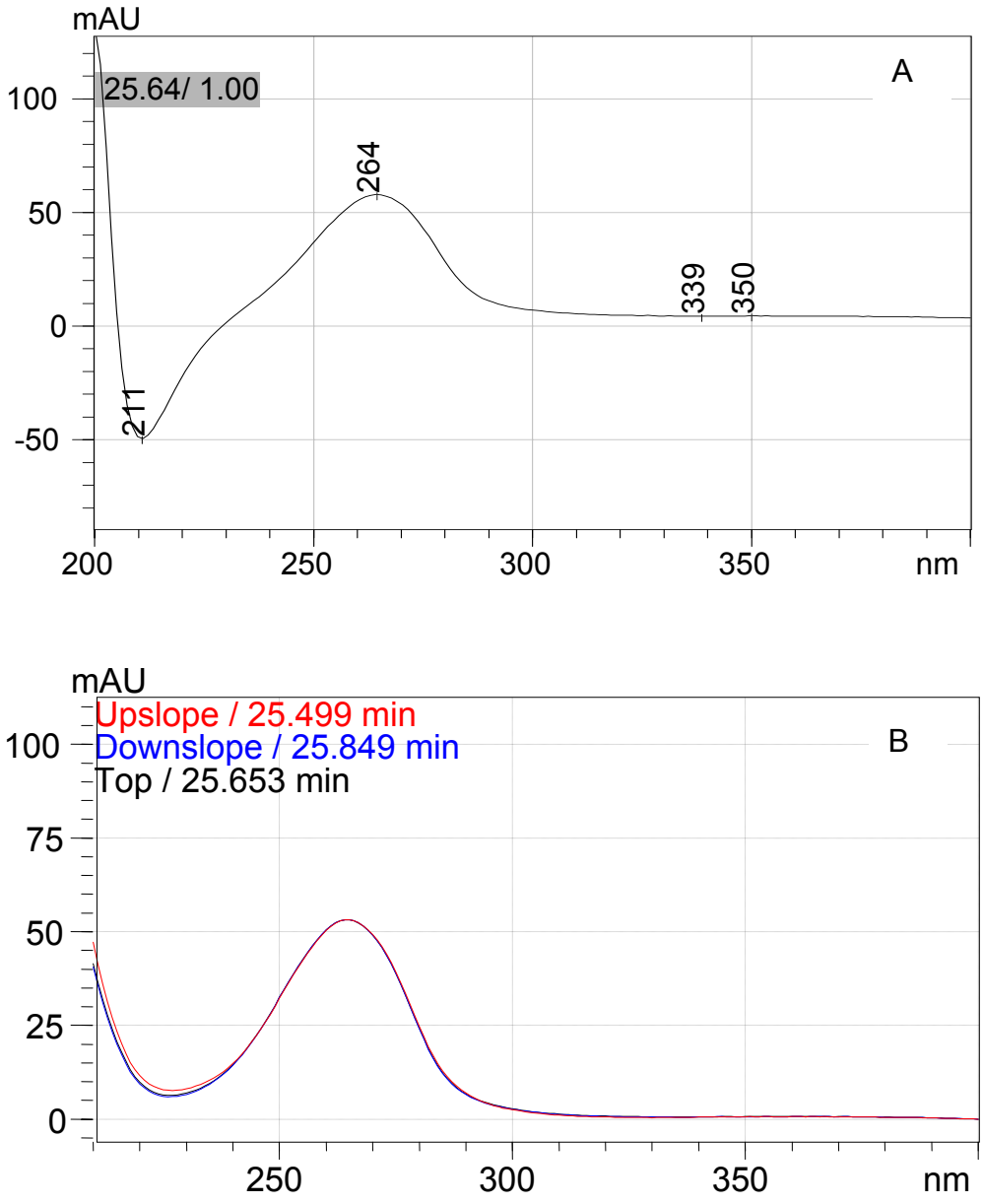


Figura 24: **A**: Espectro de ultravioleta do produto de degradação majoritário (**1**), com t_R 25,6 min, após 1 hora de exposição alcalina. **B**: Avaliação da pureza do pico (t_R 25,6 min) .

Após 1h de exposição alcalina, confirmou-se a identidade do 4-NRC pelo espectro de UV, com máximo de absorbância em 281 nm (Figura 25) presente na amostra (25,08 min; 13,48 µg/mL).

Após 6h de exposição em meio alcalino, o cromatograma obtido demonstrou acentuada diminuição da concentração do 4-NRC (Figura 23), infelizmente abaixo do LQ do método, não sendo possível assegurar, com precisão, o valor

quantificado (~ 4,40 µg/mL). Além disto, observa-se que o produto de degradação (**2**) (t_R = 26,8 min) sofreu redução na área o pico, relativamente a exposição após 1 h, sugerindo decréscimo de sua concentração.

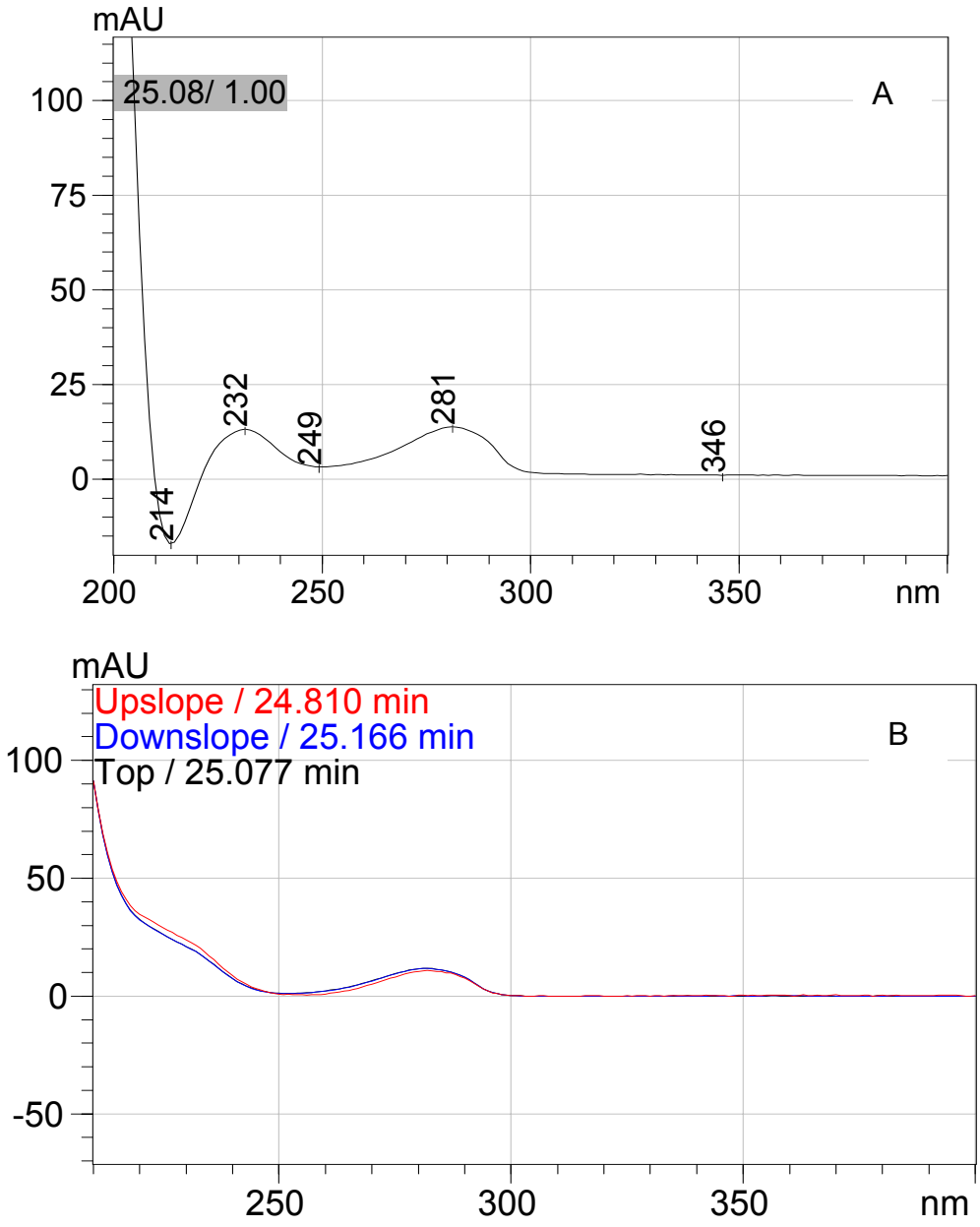


Figura 25: **A**: Espectro de ultravioleta do 4-NRC, com t_R = 25,08 min, após 1 h de exposição em meio alcalino. **B**: Avaliação da pureza do pico (t_R 25,08 min).

Decorridas 12 h de exposição em pH 13,00, o cromatograma da amostra apresentou indícios de uma concentração ainda menor de 4-NRC, também abaixo do LQ (Figura 23). Já a área do pico cromatográfico referente ao produto de degradação majoritário (**1**) (t_R = 25,57 min) sofreu discreta alteração quando

comparada com as medidas anteriores. Nesta amostra, já não foi possível visualizar o pico cromatográfico relativo ao produto de degradação (**2**).

Após 24 horas de exposição alcalina, o 4-NRC encontra-se extensamente degradado (Figura 23) totalizando, nesta amostra, ~2,52 µg/mL (< LQ). A avaliação espectrométrica do pico de degradação (**1**) revelou absorbância máxima em 264 nm, embora com inadequada pureza do pico da amostra (Figura 26),

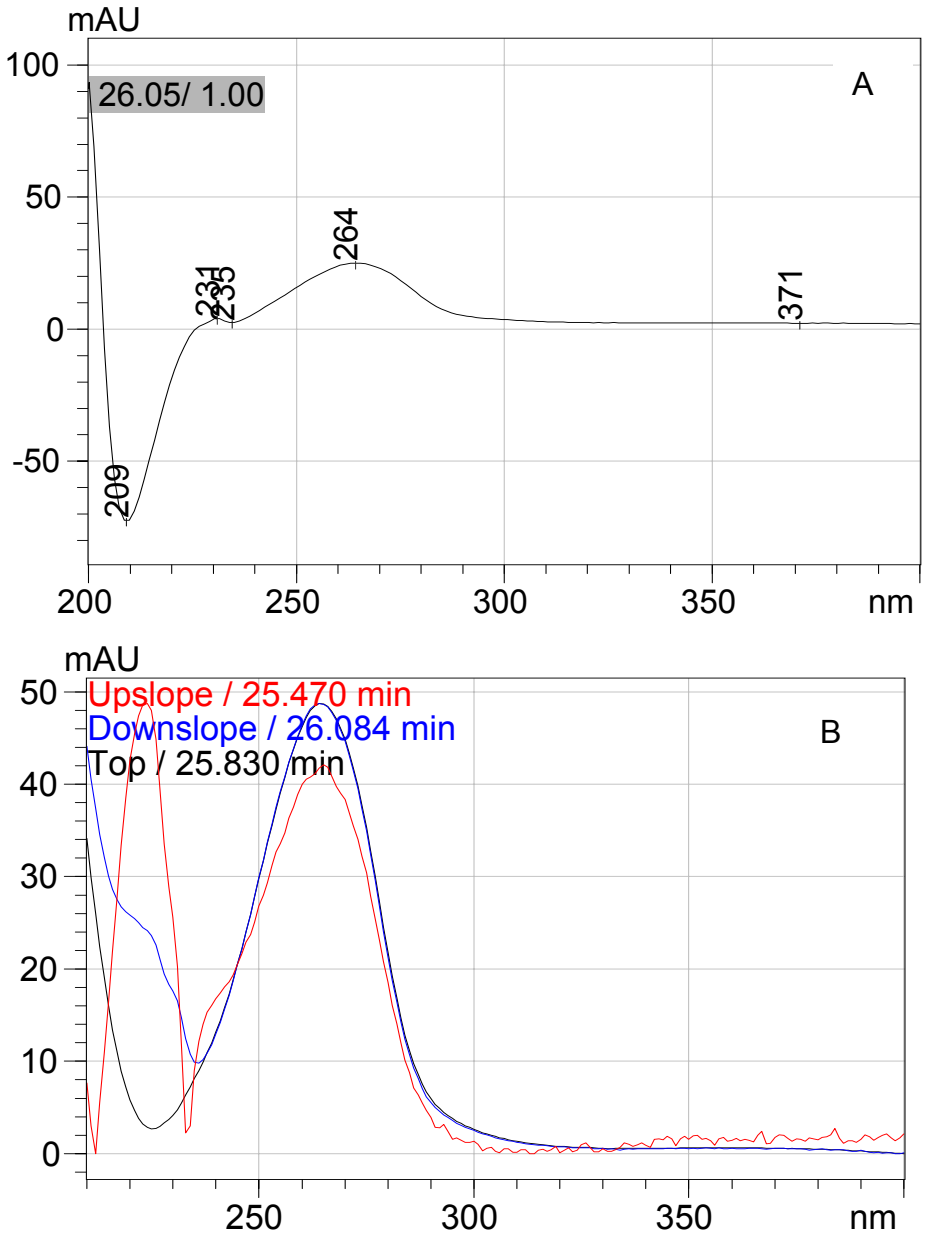


Figura 26: **A**: Espectro de ultravioleta do produto majoritário (**1**), t_R 25,8 min, após 24 horas em meio alcalino. **B**: Avaliação da pureza pico (t_R 25,8 min).

Quanto à natureza química dos produtos de degradação gerados no meio alcalino e baseando-se na proximidade dos t_R evidenciados nos cromatogramas

(Figura 23) sugere-se uma possível similaridade química estrutural para as substâncias (**1** e **2**) relativamente ao 4-NRC. Neste contexto, a proposta estrutural dos componentes (**1**) e (**2**) deve considerar ainda, o comportamento químico de grupos fenólicos em meio básico, *i.e.*, formação de quinonas no meio reacional aliada ao comportamento cromatográfico mais apolar destes, relativamente ao 4-NRC.

4.4.4 Análise das amostras expostas ao meio ácido, a 60° C, por CLAE-PDA

As amostras do 4-NRC expostas a HCl 0,1 M, a 60° C, foram analisadas após 1, 6, 12, 24, 40 e 48 horas por CLAE-PDA, segundo método validado (sistema gradiente 4). Nos cromatogramas obtidos destas amostras (Figura 27) observa-se significativa redução do 4-NRC, concomitantemente à formação do produto **(1),** como um amplo pico com t_R ~ 11,9 min. Também é possível verificar a formação de produtos de degradação secundários, mais polares que o 4-NRC, ao longo do estudo.

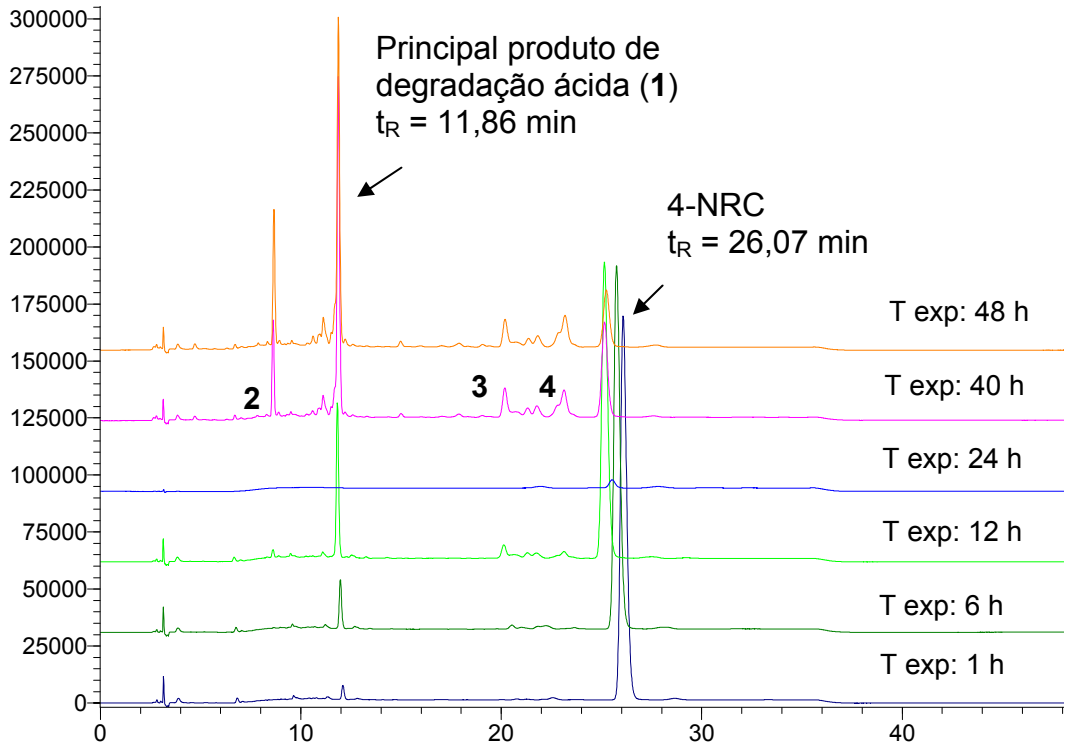


Figura 27: Cromatogramas das amostras do 4-NRC após 1, 6, 12, 24, 40 e 48 horas de exposição ácida, a 60° C, com sistema gradiente 4 (MeOH: ACN: TFA 0,1%), com fluxo 1 mL/min, obtido em CLAE-PDA, coluna C18 (250 mm x 4,6 mm)

e monitorado em 282 nm.

Após 1 hora de exposição em meio ácido (pH 1,00), a 60° C, o cromatograma da amostra (Figura 27), evidencia a presença do 4-NRC (26,07 min; 176,31 µg/mL), e a detecção inicial do produto (**1**) mais polar que 4-NRC, com t_R 11,86 min.

Decorridas 6 horas de exposição ao meio ácido, a 60° C, a análise cromatográfica revela discreta redução da concentração do 4-NRC (25,74 min; 165,50 µg/mL), com elevação do produto de degradação (**1**) (t_R ~ 12 min), como pode ser observado na figura 27.

Após 12 e 24 horas de exposição ácida é possível verificar a intensificação da formação do produto de degradação (**1**) e o desaparecimento do 4-NRC no meio reacional (12 h: t_R = 25,34 min, 131,87 µg/mL; 24 h: t_R = 25,78 min, 77,03 µg/mL). Após 12h, outros produtos de degradação mais polares que o 4-NRC (**3** e **4**), com t_R entre 20 e 25 min (Figura 27) são também formados e permaneceram no meio reacional até o final do experimento.

Após 40 horas, a concentração do 4-NRC foi de 43,64 µg/mL (25,44 min). A intensidade do pico (**1**) em 11,9 min elevou-se, em relação à análise anterior (24 h) (Figura 27).

Ao final do experimento (48 h), a concentração do 4-NRC foi de 28,16 µg/mL (25,23 min) e a intensidade do pico do produto (**1**) (t_R = 11,86 min) foi superior ao do 4-NRC, com máximo de absorbância em 281 nm (Figura 28). Observa-se ainda, a intensificação da formação do produto **2** (Figura 27). A avaliação do espectro de UV do pico referente ao produto de degradação ácida (**1**), com t_R 11,86 min, demonstrou maior absorbância em 281 nm e significativa pureza da substância, já que houve sobreposição dos espectros no início e final do pico (Figura 28).

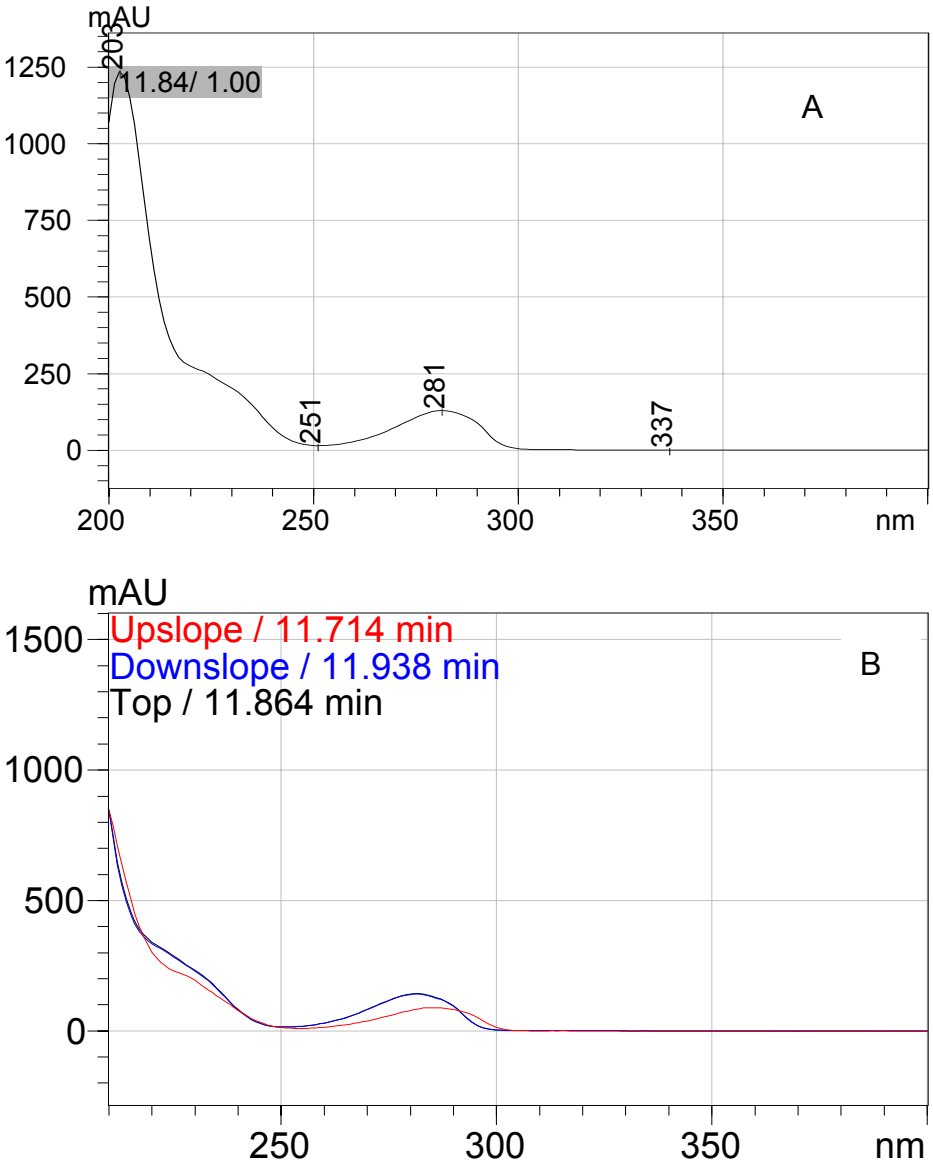


Figura 28: **A**: Espectro de absorção UV do produto de degradação ácida (**1**) do 4-NRC, com t_R 11,84 min, após 48 horas de exposição em meio ácido, a 60° C. **B**: Avaliação da pureza do pico com t_R 11,84 min.

4.5 Caracterização química estrutural do 4NRC e produtos de degradação

Para a caracterização da identidade química estrutural dos produtos de degradação é necessária a utilização de técnicas de isolamento e purificação destes produtos e posteriores análises de RMN de ^{1}H e ^{13}C, infravermelho etc., além da EM. Alternativamente à técnica de isolamento e purificação, empregam-se técnicas analíticas mais onerosas como as hifenadas *p.e.* CLAE/EM/EM e/ou

CL/RMN. Embora, as técnicas de isolamento e purificação por cromatografia em camada delgada preparativa e coluna aberta tenham sido aplicadas, a pequena quantidade de amostra disponível, não foi suficiente para proceder tais análises.

Entretanto, pode-se calcular o coeficiente de absortividade molar máximo ($Є_{max}$) para a banda *B* do 4-NRC nas amostras expostas à ação fotolítica e em meio ácido. O coeficiente de absortividade molar máximo ($Є_{max}$) para a banda *B* do 4-NRC (λ = 282 nm) foi de 3230 ± 0,0447. Este $Є_{máx}$ encontrado é intermediário aos análogos estruturais do 4-NRC, como *o*-catecol ($Є_{max}$ = 2300, λ = 276 nm) e o ânion catecolato ($Є_{max}$ = 3500, λ = 292 nm) (Tabela 6), corroborando os dados encontrados neste estudo (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 1979).

O deslocamento batocrômico da banda *B* evidenciado entre *o*-catecol e o 4-NRC pode ser justificado pela substituição de grupos alquila no benzeno. Especificamente em relação ao 4-NRC, a presença da cadeia isoprênica lateral, pode favorecer a hiperconjugação entre os elétrons σ das ligações alquila (C-H) contribuindo com a ressonância com o anel. Adicionalmente, a presença de grupos auxocrômicos, como OH, no caso do ânion catecolato, também favorece o deslocamento batocrômico da banda *B* para comprimentos de onda maiores devido à existência, no ânion, de um par de elétrons não ligantes adicional que interage com o sistema eletrônico π do anel.

Tabela 6. Valores de absortividade molar do 4-NRC e análogos estruturais.

Substância Química	**Absortividade molar ($Є_{max}$)**	**Comprimendo de onda máximo (λ)**
o-catecol	2300	276 nm
4-NRC	3230	282 nm
Ânion catecolado	3500	292 nm

4.6 Cinética de degradação do 4-NRC sob condições de estresse

Para determinação da cinética da reação de degradação, os dados de concentração das amostras do 4-NRC, expostas à condição fotolítica e hidrolítica ácida e básica, foram analisados em gráficos de dispersão de dados, onde o

decaimento da concentração do 4-NRC (µg/mL) é monitorado em função do tempo de exposição (h).

A determinação da velocidade de degradação hidrolítica do 4-NRC, em meio alcalino, não foi possível dada à sua rápida degradação, pois as concentrações obtidas do 4-NRC, nos tempos de coleta selecionados neste estudo, logo atingiram concentrações inferiores ao LQ (Tabela 7). Por este motivo, não foi possível calcular a velocidade de decaimento, tampouco a ordem da reação, dada a indisponibilidade de substrato (4-NRC) para o reteste.

Tabela 7: Concentrações (µg/mL) e percentuais remanescentes (%) do 4-NRC em função do tempo (h) de exposição alcalina.

Tempo de exposição (h)	**Concentração 4-NRC (µg/mL)**	**% 4-NRC**
0	500	100,00
1	13,48	2,96
6	< LQ	-----
12	< LQ	-----
24	< LQ	-----

Já na exposição fotolítica, verificou-se que a cinética de degradação é mais lenta. Nesta, observa-se um decaimento linear da concentração do 4-NRC (Figura 29), quando analisamos os valores do inverso da concentração (1/C) em função do tempo de reação (Tabela 8). Esta representação gráfica é indicativa de um processo de degradação *cinética de segunda ordem*, pois há excelente correlação linear entre os dados. Nestes casos, a velocidade da reação é geralmente dependente da concentração de dois reagentes, ou ainda, da concentração de apenas um dos substratos, elevada à segunda potência (NUDELMAN, 1975; RUSSEL, 1994).

Tabela 8: Concentrações (µg/mL) e percentuais remanescentes (%) do 4-NRC em função do tempo (h) de exposição fotolítica.

Tempo de exposição (h)	Concentração 4-NRC (µg/mL)	% 4-NRC
0	500	100,00
6	155,15	31,03
24	89,59	17,97
72	23,97	4,49
144	---	---

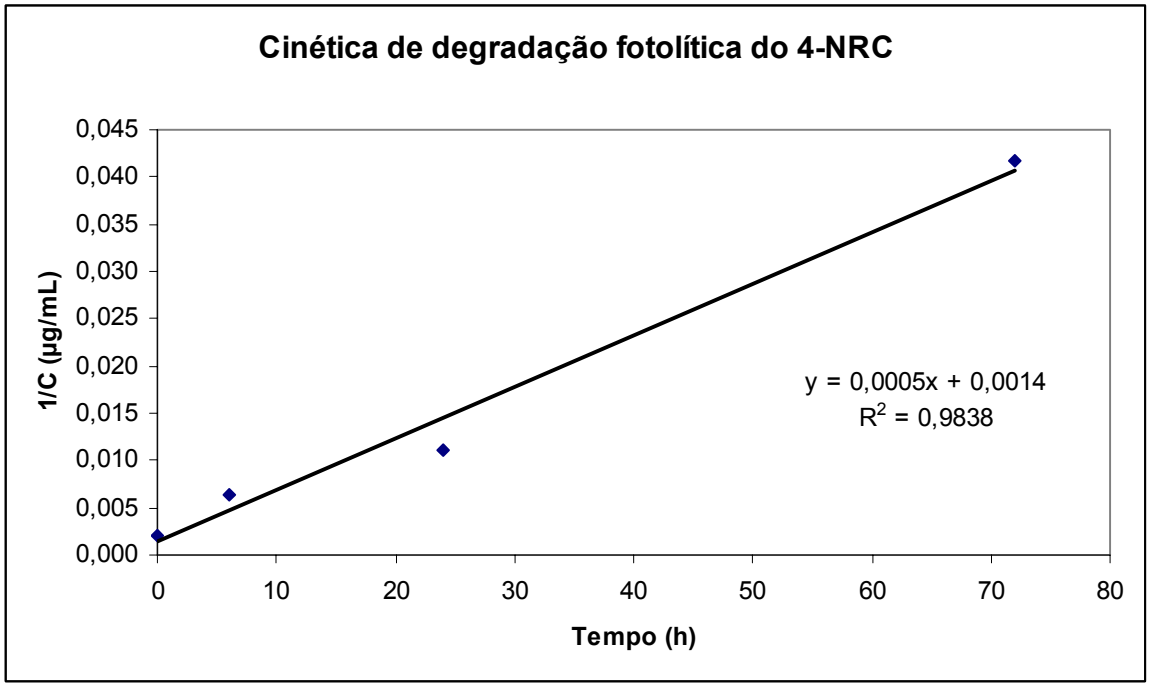


Figura 29: Cinética de degradação fotolítica do 4-NRC. Gráfico de dispersão dos valores do inverso da concentração (µg/mL) em função do tempo (h).

Na exposição ácida do 4-NRC, o tratamento dos dados foi semelhante àquele aplicado à cinética da reação fotolítica. O ajuste linear dos dados foi obtido pelo tratamento gráfico (Figura 30) do inverso da concentração (1/C) em função do tempo (Tabela 9), indicando uma reação cuja velocidade de degradação é de 2ª ordem.

Tabela 9. Concentrações do 4-NRC (µg/mL) e percentual remanescente (%) em função do tempo (h) de exposição em meio ácido (pH 1,0, 60 º C).

Tempo de exposição (h)	Concentração 4-NRC (µg/mL)	% 4-NRC
0	1000,00	100,00
1	176,31	17,63
6	165,50	16,55
12	131,87	13,18
24	77,03	7,70
40	43,64	4,36
48	21,18	2,18

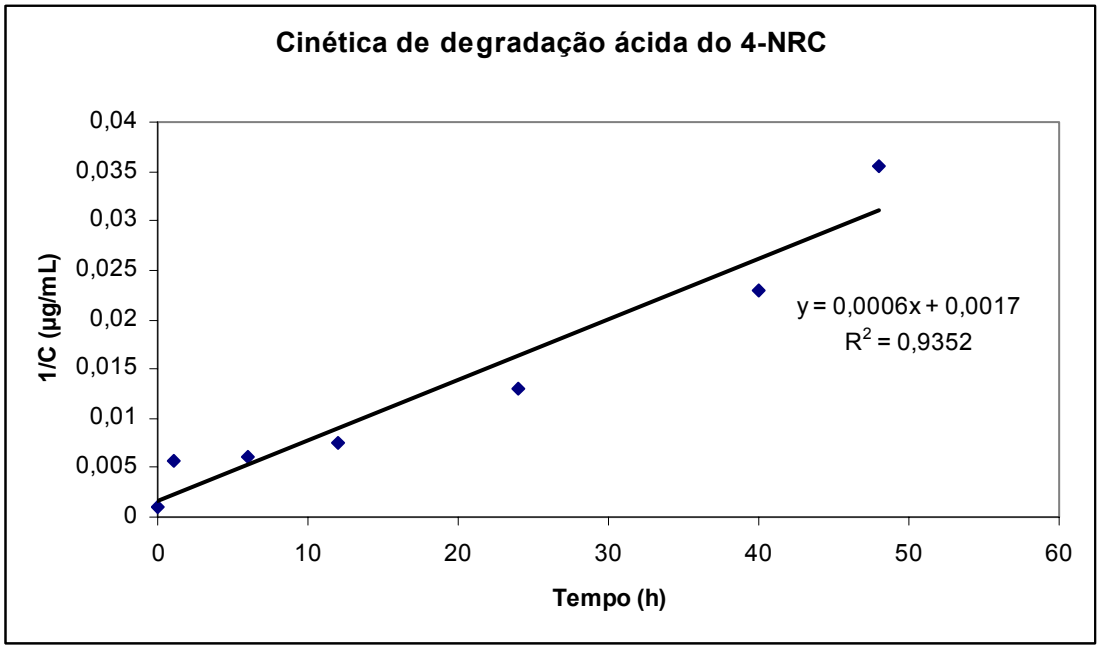


Figura 30: Cinética de degradação ácida do 4-NRC, a 60° C. Gráfico de dispersão dos valores do inverso da concentração (µg/mL) em função do tempo (h).

A constante de velocidade (*k*) encontrada para a reação fotolítica foi de 5,51 x 10^{-4} μg^{-1}.mL.h^{-1} e, para a degradação hidrolítica ácida, 9,63 x 10^{-4} μg^{-1}.mL.h^{-1}. Os resultados obtidos evidenciam uma degradação rápida e extensiva do 4-nerolidilcatecol, quando submetido às condições de estresse recomendadas pelo FDA. Observa-se ainda que o tratamento dos dados obtidos, segundo uma cinética

de segunda ordem produziu um ótimo ajuste à regressão linear ($R^2 \geq 0,93$),dada pela análise do inverso da concentração do reagente, exposto ao agente estressante.

A meia-vida do 4-NRC ($t_{1/2}$), segundo as condições experimentais fotolítica e hidrolítica ácida utilizadas neste estudo, e dadas as constantes de velocidade destas reações, em meio ácido, foi de 1,03 h, e quando exposto à condição fotolítica foi de 3,63 h.

Conclusões

5. Conclusões

A otimização do método, que avaliou diferentes gradientes de eluentes (metanol, acetonitrila e água), promoveu a separação do analito e de seus produtos de degradação possibilitando a distinção entre os componentes da amostra. O emprego da técnica cromatográfica acoplada a detector PDA possibilitou conhecer o perfil de absorbância dos produtos de degradação na região ultravioleta, avaliar a pureza dos picos cromatográficos, assim como conhecer os comprimentos de onda de absorbância máxima e, monitorar, em paralelo, outros destes, de modo a garantir a seletividade do método na presença de possíveis produtos do meio reacional.

Assim, o método analítico desenvolvido por CLAE-PDA demonstrou exatidão e precisão na obtenção dos dados, além de sensibilidade e seletividade adequadas para avaliação do 4-NRC e seus produtos de degradação formados após exposição às condições de estresse, para a maioria dos intervalos de tempo selecionados. Conseqüentemente, o método desenvolvido neste trabalho possibilita a avaliação da pureza do 4-NRC em análises de controle de qualidade.

A degradação acelerada do 4-NRC sob condições de estresse foi evidenciada e monitorada, com sucesso, após validação do método analítico desenvolvido. A formação de produtos de degradação do 4-NRC, sob estresse fotolítico, confirmou evidências de sensibilidade a este agente. Nesta condição foi possível verificar a formação de produtos mais polares que o 4-NRC, sendo que o principal produto de degradação fotolítica foi formado após 144 h de exposição à luminosidade integrada UV-Vis. A cinética de degradação do 4-NRC exposto à luminosidade foi de 2ª ordem.

A sensibilidade à degradação do 4-NRC, em meio ácido e alcalino, foram confirmadas segundo as condições experimentais avaliadas neste estudo. Verificou-se que a degradação é mais rápida em meio alcalino (pH 13,00) que em meio ácido, de forma tal que, não foi possível identificar a ordem da reação em meio básico, dado ao rápido desaparecimento do 4-NRC. Verificou-se que, logo nas primeiras horas, ocorreu total degradação do 4-NRC em meio básico, mesmo à temperatura ambiente. Os produtos de degradação alcalina majoritários mostraram-se mais apolares que o 4-NRC, e foram detectados durante todas as coletas, no meio reacional.

Já em meio ácido, os dados da concentração do 4-NRC presentes na solução (pH 1,00) possibilitaram estabelecer que a cinética de degradação do 4-NRC foi de 2ª ordem, necessitando da elevação da temperatura para promover a aceleração de tal reação. Nesta condição, observou-se que decorridas 48h de exposição em ácida, ainda foi possível quantificar o 4-NRC, demonstrando maior estabilidade nesta condição. Os produtos de degradação hidrolítica ácida se mostraram mais polares que o 4-NRC e a presença do principal produto de degradação, com t_R 11,86 min, pode ser acompanhada desde a primeira hora de exposição da substância.

Assim, ao final deste trabalho, propõe-se que as condições de armazenamento do 4-NRC isolado devem ser amenas, ou seja, deve-se armazená-lo sempre sob abrigo da luz, por meio de proteção física com papel alumínio, e/ou frascos âmbar, de superfície neutra (*p.e*. borossilicato neutro) evitando assim, frascos de vidro alcalino. Quando em solução, o pH do meio deve ser neutro, evitando-se extremos de pH ácidos e, principalmente, meio básico. Ademais, deve-se considerar o armazenamento sob refrigeração, uma vez que a elevação da temperatura acelera a velocidade das reações de degradação deste potencial candidato a fármaco.

Perspectivas

6. Perspectivas

Acredita-se que as informações sobre a estabilidade do 4-NRC, possam contribuir tanto na utilização desta substância como em outros trabalhos de pesquisa, tendo em vista que foi possível confirmar as suspeitas de instabilidade elevada deste potencial fármaco.

Além disto, espera-se que seja possível, por trabalhos complementares a este, a caracterização dos produtos de degradação formados em condições de estresse, utilizando-se técnicas como RMN ^{1}H e ^{13}C, infravermelho e EM.

Adicionalmente, poderá ser planejada a avaliação cinética em meio alcalino, com coletas de amostras em intervalos de tempos inicialmente mais curtos, a fim de se assegurar a determinação da cinética de degradação do 4-NRC neste meio. Além disto, poderão ser propostos estudos complementares de estabilidade visando:

- determinar as melhores condições de utilização do 4-NRC, em soluções e solventes com pH variados,

- avaliar a degradação do 4-NRC em condições oxidativa e térmica,

- realizar estudos de estabilidade associando diferentes fatores de estresse, como variação de temperatura e alteração da faixa de pH, exposição luminosa e variação de pH, exposição luminosa e alteração de temperaturas.

- avaliar o comportamento do 4-NRC frente a fatores de estresse, quando associado na forma de um complexo de inclusão, em hidroxipropil-beta-ciclodextrina, comparativamente ao 4-NRC puro.

Assim, a obtenção destas informações sobre o 4-NRC poderá impulsionar futuros investimentos no desenvolvimento de formulações com componentes naturais seguras, estáveis e eficazes, sejam eles medicamentos ou cosméticos. Além disto, estudos complementares acerca da segurança, toxicidade e eficácia do 4-NRC e *P. umbellata* poderão ser realizados pela comunidade científica a fim de corroborar o potencial terapêutico desta espécie genuinamente brasileira.

Referências Bibliográficas

7. Referências bibliográficas

AGRAWAL, H.; KAUL, N.; MAHADIL, P. K. R. HPTLC method for gugguldterone II. Stress degradation studies on guggulsterone. *J. Pharm. Biom. Anal*., v.36, p.23-31, 2004.

AMORIM, C. Z.; FLORES, C. A.; GOMES, B. E.; MARQUES, A. D.; CORDEIRO, R. S. B. Screening for antimalarial activity in the genus *Pothomorphe. J. Ethnopharmacol*., v.24, p.101-106, 1988.

ASAFU-ADJAYE, E. B.; FAUSTINO, P. J.; TAWAKKUL, M. A.; ANDERSON, L; W.; YU, L. X.; KWON, H.; VOLPE, D. A. Validation and application of a stability-indicating HPLC method for the *in vitro* determination of gastric and intestinal stability of venlafaxina. *J. Pharm. Biom. Anal*., v.43, p.1854-1859, 2007.

BAKSHI, M.; SINGH, B.; SINGH, A.; SING, S. The ICH guidance in practice: stress degradation studies on ornidazole and development of a validated stability-indicating assay. *J. Pharm. Biom. Anal*., v.26, p.891-897, 2001.

BAKSHI, M.; SINGH, S. Development of validated stability-indicating assay methods – critical review. *J. Pharm. Biom. Anal*., v.28, p. 1011-1040, 2002.

BAKSHI, M.; SINGH, S. ICH guidance in practice: establishment of inherent stability of secnidazole and development of a validated stability-indicating high-performance liquid chromatographic assay method. *J. Pharm. Biom. Anal*., v.36, p.769-775, 2004a.

BAKSHI, M.; SINGH, S. HPLC and LC-MS studies on stress degradation behaviour of tinidazole and development of a validated specific stability-indicating HPLC assay method. *J. Pharm. Biom. Anal*., v.34, p.11-18, 2004b.

BAKSHI, M.; OJHA, T.; SINGH, S. Validated specific HPLC methods for determination of prazosin, terazosin, doxazosin in the presence of degradation

products formed under ICH-recommended stress conditions. *J. Pharm. Biom. Anal*., v.34, p.19-6, 2004.

BARROS, S. 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. (Pariparoba). *J. Assoc. Adv. Sci*., v.48, p.114-116, 1997.

BARROS, S.; ROPKE, C. D.; SAWADA, T. C. H.; SILVA, V. V.; PEREIRA, S. M. M.; BARROS, S. B. M. et al. Assessment of acute and subchronic oral toxicity of ethanolic extract of *Pothomorphe umbellata* L. Miq. (Pariparoba). *Braz. J. Pharm. Sci*., v.41, p.53-61, 2005.

BASTOS, W. L. Metabolismo secundário de. In Química Orgânica. Araraquara: Universidade Estadual Paulista, 1998. p. 95.

BERGAMO, D. C. B.; KATO, M, J.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M. Biosynthetic origins of the isoprene units of 4-nerolidylcatechol in *Pothomorphe umbellata. J. Braz. Chem. Soc.* v.16, p.1406-1409, 2005.

BERNARD, H. O.; TIELI, K. Isolierrung von 1-Allyl-2,3-dimethoxy-4,5-methylendioxybenzol (=dill-apiol) aus *Heckeria umbellata* (L.) Kunth (Piperaceae). *Helv. Chim. Acta*. v.61, p.2273, 1978.

BHARDWAJ, S. P.; SINGH, S. Study of forced degradation behavior of enalapril maleate by LC and LC-MS and development of a validated stability-indicating assay method. *J. Pharm. Biom. Anal*., v.46, p.113-120, 2008.

BHUTANI, H.; SINGH, S.; VIR, S.; BHUTANI, K. K.; KUMAR, R.; CHAKRABORTI, A. K.; JINDAL, K. C. LC and LC-MS study of stress decomposition behaviour of isoniazid and establishment of validated stability-indicating assay method. *J. Pharm. Biom. Anal*., v.43, p.1213-1220, 2007.

BIOKA, D.; ABENA, A. Psycopharmacological profile of *Piper umbellatum* aqueous extract. *L´Encephale*, v.16, p.205-208, 1990.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos". Diário Oficial da União. Brasília, 02 de junho de 2003.Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/bioequivalencia/legis.htm. Acesso em: 01 de maio de 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 1, de 29 de julho de 2005. Autoriza *ad referendum*, a publicação do "Guia para a Realização de Estudos de Estabilidade". Diário Oficial da União. Brasília, 01 de agosto de 2005. Disponível em: http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php. Acesso em: 06 de março de 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Informe técnico nº 1, de 15 de julho de 2008. Esclarecimento sobre o item 2.9 do anexo da Resolução RE nº 1 de 29/07/2005, que trata do Guia para Realização dos Estudos de Estabilidade Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/informes/2008/01_160708.htm. Acesso em: 20 de julho de 2008.

BROK, M. W. J.; NUIJEN, B.; HILLEBRAND, M. J. W.; GRIESHABER, C. K.; HARVEY, M. D.; BEIJNEN, J. H. Development and validation of an LC-UV method for the quantification and purity determination of the novel anticancer agent C1311 and its pharmaceutical dosage form. *J. Pharm. Biom. Anal*., v.39, p.46-53, 2005.

CONNORS, K. A.; AMIDON, G. L.; STELLA, V. J. *Chemical stability of pharmaceuticals: A handbook for pharmacists.* 2. ed. New York: Wiley, 1986.

DESMACHELIER, C.; BARROS, S.; REPETTO, M.; LATORRE, L. R.; KATO, M.; COUSSIO, J; CICCIA, G. 4-Nerolydilcatechol from *Pothomorphe ssp* scavenges peroxyl radicals and inhibits Fe(II)-dependent DNA damage. *Planta Med*., v.67, p.561-563, 1997a.

DESMACHELIER, C.; MONGELLI, E.; COUSSIO, J; CICCIA, G. Inhibition of lipid peroxidation and iron (II)-dependent DNA damage by extracts of *Pothomorphe peltata* (L.) Miq. *Braz. J. Med. Biol. Res*.; v.30, p.85-91, 1997b.

DUNGE, A.; SHARDA, N.; SINGH, B.; SINGH, S. Validated specific HPLC method for determination of zidovudine during stability studies. *J. Pharm. Biom. Anal*., v.37, p.1109-1114, 2005.

FAYED, A. S.; SHEHATA, M. A.; ASHOUR, A.; HASSAN, N. Y.; WESHAHY, S. A. Validated stability-indicating methods for determination of cilostazol in the presence of its degradation products according to the ICH guidelines. *J. Pharm. Biom. Anal*., v.45, p.407-416, 2007.

GANESAN, A. The impact of natural products upon modern drug discovery. *Curr. Opin. Chem. Biol.* v.12, p. 2-12, 2008.

GIANNELLINI, V.; SALATORE, F.; BARTOLUCCI, G.; CORAN, S. A.; BAMBAGIOTTI-ALBERTI, M. A validated HPLC stability method for the determination of diacerhein in bulk drug substance. *J. Pharm. Biom. Anal*., v.39, p.776-780, 2005.

GUO, Y.; ZHANG, D.; WANG, H.; XIU, Z.; WANG, L.; XIAO, H. Hydrolytic kinetics of lithospermic acid B extracted from roots of *Salvia miltiorrhiza*. *J. Pharm. Biom. Anal*., v.43, p.435-439, 2007.

GUSTAFSON, K. R.; CARDELINA II, J. H.; McMAHON, J. B.; PANNELL, L. K.; CRAGG, G. M.; BOYD, M. R. The peltatols, novel HIV-inhibitory catechol derivates from *Pothomorphe peltata. J. Org. Chem*., v.57, p.2809-2811, 1992.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION (ICH); Stability testing: Photostability testing of new drug substances and products, Q1B, 1996. Disponível em: http://www.ich.org/cache/compo/276-254-1.html. Acesso em: 03 de maio de 2008.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION (ICH); Stability testing of new drugs substances and products, Q1A, 2003. Disponível em: http://www.ich.org/cache/compo/276-254-1.html. Acesso em: 03 de maio de 2008.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION (ICH); Validation of Analytical Procedures: Methodology, Q2B, 2005. Disponível em: http://www.ich.org/cache/compo/276-254-1.html. Acesso em: 03 de maio de 2008.

JELINSKA, A.; DOBROWOLSKI, L.; OSZCZAPOWICZ, I. The influence of pH, temperature and buffers on the degradation kinetics of cefetamet pivoxil hydrochloride in aquous solutions. *J. Pharm. Biom. Anal*., v.35, p.1273-1277, 2004.

KATO, M. J.; CHU, A.; DAVIN, L. B.; LEWIS, N. G. Biosynthesis of antioxidant lignans in Sesamum indicum seeds. Phytochemistry, v.47, p. 583, 1998.

KAUL, N.; AGRAWAL, H.; PARADKAR, A. R.; MAHADIK, K. R. The ICH guidance in practice: stress degradation studies on indinavir sulphate and development of a validated specific stability-indicating HPTLC assay method. *Il Farmaco*, v.59, p.729-738, 2004.

KIJJOA, A.; GIESBERCHT, A. M.; AKISSUE, M. K.; GOTTLIEB, O. R.; GOTTLIEB, H. E. The chemistry of Brazilian *Piperaceae*. 2. 4-nerolidylcatechol from *Pothomorphe umbellata*. *Plan. Med*., v.39, p.85-87, 1980.

KOSTENBAUDER, H. B.; BORGADUS, J. B. Reactions kinetics. In: *Remington: The science and Practice of pharmacy*. 19. ed. Pensilvânia: Mack, 1995. Cap. 18.

LEWIS, N. G.; KATO, M. J.; LOPES, N. P.; DAVIN, L. B. Lignans: Diversity, biosynthesis and functions. In: *Chemistry of Amazon*. Washington: ACS, 1995.

MASTER, M. C. M. *HPLC: A practical user's guide*. New York: Wiley VCH, 1994.

MONGELLI, E.; DESMARCHELIER, F.; COUSSIO, J.; CICCIA, G. Actividad antimicrobiana e interciónncon el AND de plantas medicinales de la Amazonia peruana. *Rev. Arg. Microb*., v.27, p.199-203, 1995.

MONGELLI, E.; ROMANO, A.; DESMARCHELIER, C.; COUSSIO, J.; CICCIA, G. Cytotoxic 4-nerolidylcatechol from *Pothomorphe peltata* inhibits topoisomerase I activity. *Planta Med*., v.65, p.376-378, 1999.

MURRY, J. M. *Química orgânica*. 6ed. São Paulo: Pioneira Thomson Learnig, 2006.

NUDELMAN, N. E. S. *Estabilidad de medicamentos*. Buenos Aires: El Ateneo, 1975.

PARMAR, V. V.; JAIN, S. C.; BISHT, K. S.; JAIN, R.; TANEJA, P.; JHA, A.; TYAGI, O. D.; PRASAD, A. K.; WENGEL, J.; OLSEN, C. E.; BOLL, P. M. Phytochemistry of the genus *Piper*. *Phytochemistry*, v.46, p. 597, 1997.

PANIZZA, S. *Plantas que curam*. 25. ed. São Paulo: Ibrasa, 1998.

PECKOLT, W. Contribuição à matéria médica vegetal do Brasil: Estudo farmacognóstico de *Heckeria umbellata* (L.) Kunth. In *Mem*. *Inst. Butantan*. v.15, p.59-68, 1941.

PERAZZO, F. F.; SOUZA, G. H. B.; LOPES, W.; CARDOSO, L. G. V.; CARVALHO, J. C. T.; NANAYKKARA, N. P. D.; BASTOS, J. K. Anti-inflam atory and analgesic properties of water-ethanolic extract from *Pothomorphe umbellata* (*Piperaceae*) aerial parts. *J. Ethnopharm*., v.99, p.215-220, 2005.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFÂNIO, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. *Química Nova,* v. 25, p.45-61, 2002.

OJHA, T.; BAKSHI, M.; CHAKRABORTI, A. K.; SINGH, S. The ICH guidance in practice: stress decomposition studies on three piperazinyl quinazoline adrenergic

receptor-blocking agents and comparison of their degradation behaviour. *J. Pharm. Biom. Anal*., v.31, p. 775-783, 2003.

RATES, S. M. K. Plants source of drugs. *Toxicon*., v.39, n.5, p.603-613, 2001.

REZENDE, K. R. *Biodisponibilidade oral do 4-nerolidilcatecol isolado e em extrato bruto de Pothomorphe umbellata (L.) Miq. administrado a ratos Sprangue Dawley*. 2002. Tese de Doutorado em Fármacos – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

REZENDE, K. R.; BARROS, S. B. M. Quantification of 4-nerolidylcatechol from *Pothomorphe umbellate* (*Piperaceae*) in rat plasma samples by HPLC-UV. *Braz. J. Pharm. Sci*. v.40, n.3, p.373-380, 2004.

RIEDEL, O. O. Subsídios para o estudo farmacognóstico da *Heckeria umbellata* (L.) Kunth. *Trib. Farm*., v.9, p.269-283, 1941.

ROMANOS, M. T. V.; SERPA, M. J. A.; SANTOS, M. G. M.; RIBEIRO, A. C. F.; VALENTIN, Y. Y.; COSTA, S. S.; WIGG, M. D. Inhibitory Effect of Extracts of Brazilian Marine Algae on Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1)-Induced Syncytium Formation In Vitro. *Cancer Investigation*, v. 20, p. 46-54, 2002.

ROPKE, C. D. *Avaliação da atividade antioxidante de Pothomorphe umbellata L. Miq. na pele*. 1999. Dissertação de Mestrado em Fármacos e Medicamentos – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

ROPKE, C. D.; KANEKO, T. M.; RODRIGUES, R. M.; SILVA, V. V.; BARROS, S.; SAWADA, T. C. H.; KATO, M. J.; BARROS, S. B. M. Evaluation of percutaneous absorption of 4-nerolidylcatechol from four topical formulations. *Int. J. of Pharm*.; v.249, p.109-116, 2002.

ROPKE, C. D.; MEIRELLES, R. R.; SILVA, V. V.; SAWADA, T. C.; BARROS, S. B. M. *Pothomorphe umbellata* extract prevents α-totpherol depletion after UV-radiation. *Photoch. Photob*., v.78, n.5, p.436-439, 2003.

ROPKE, C. D.; SAWADA, T. C.; da SILVA, V. V.; MICHALANY, N. S.; BARROS, S. B. M. Photoprotective effect of *Pothomorphe umbellata* root extract against ultraviolet radiation induced chronic skin damage in the hairless mouse. *Clin. Exp. Dermatol*., v.30, p.272-276, 2005.

ROPKE, C. D.; da SILVA, V. V.; KERA, C. Z.; MIRANDA, D. V.; de ALMEIDA, R. L.; SAWADA, T. C.; BARROS, S. B. M. *In vitro* and *in vivo* inhibition of skin matrix metalloproteinases by *Pothomorphe umbellata* root extract. *Photochem*. *Photobiol*. v.82, p.439-442, 2006.

RUSSEL, J. B. *Química geral*. 2. ed. São Paulo: MaKron Brok, 1994.

SHAMSIPUR, M.; HEMMATEENEJAD, B.; AKHOND, M.; JAVIDNIA, K.; MIRI, R. A study of the photo-degragation kinetics of the nefedipine by multivariate curve resolution analysis. *J. Pharm. Biom. Anal*., v.31, p.1013-1019, 2003.

SILVA, R. A. D. *Pharmacopeia dos Estados Unidos do Brasil*. São Paulo: Cia Ed. Nacional, 1926.

SILVA, G. A. A. B.; BAVER, L. Contribuição ao estudo do óleo essencial de *Heckeria umbellata* (L.) Kunth. *Rev. Bras. Farm*., v. 53, p.59-61, 1972.

SILVA V. V.; ROPKE, C. D.; de ALMEIDA, R. L.; MIRANDA, D. V.; KERA, C. Z.; RIVELLI, D. P.; SAWADA, T. C. H.; BARROS, S. B. M. Chemical stability and SPF determinations of *Pothomorphe umbellata* extract gel and photostability of 4-nerolydilcatechol. *Int. J. Phamac*., v.303, p.125-131, 2005.

SILVERSTEIN, R..; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C. *Identificação espectrométrica de compostos orgânicos*. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1979.

SINGH, S.; SINGH, B.; BAHUGUNA, R.; WADHWA, L.; SAXENA, R. Stress degradation studies on ezetimibe and development of a validated stability-indicating HLPC assay. *J. Pharm. Biom. Anal*., v.41, p.1037-1040, 2006.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. *Princípios de análise instrumental*. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.

SOARES, L. A. *Preparação e caracterização do complexo de inclusão do 4-nerolidilcatecol de Pothomorphe umbellata (Piperaceae) em 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina.*2007. Dissertação de Mestrado em Fármacos e Medicamentos – Faculdade de Farmácia – Universidade Federal de Goiás, Goiás, 2007.

TABOPDA, T. K.; NGOUPAYO, J.; LIU, J. L.; MITAINE-OFFER, A.C.; TANOLI, S. A. K.; KHAN, S. N.; MUHAMMAD, S. A.; NGADJUI, B. T.; TSAMO, E.; LACAILLE-DUBOIS, M. A.; LUU, B. Bioactive aristolactams from *Piper umbellatum*. *J. Phytochem*., v.69, p. 1726-1731, 2008.

VALADARES, M. C.; REZENDE, K. R.; PEREIRA, E. R. T.; SOUSA, M. C.; GONÇALVES, B.; ASSIS, J. C.; KATO, M. J. Protective effects of 4-nerolylcatechol against genotoxicity. *Food Chem. Toxicol*., v.45, p.1975-1978, 2007.

www.chemkeys.com. Acesso em: 10 de setembro de 2008.

YUNKER, T. G. The Piperaceae of Brazil. *Hoehnea*. v.3, p.28-29, 1973.

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo