



**UNIVERSIDADE DO VALE DO ITAJAÍ**

**DANIELA MAES DUTRA**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO POR CLAE PARA  
ANÁLISE DA ESTABILIDADE DE SOLUÇÕES EXTRATIVAS E  
EXTRATO SECO DE *Ipomoea pes-caprae brasiliensis* (L.) R. Br.  
(Convolvulaceae)**

Itajaí  
2013

**UNIVERSIDADE DO VALE DO ITAJAÍ**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS**  
**FARMACÊUTICAS**  
**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E**  
**SUBSTÂNCIAS SINTÉTICAS BIOATIVAS**

**DANIELA MAES DUTRA**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO POR CLAE PARA**  
**ANÁLISE DA ESTABILIDADE DE SOLUÇÕES EXTRATIVAS E**  
**EXTRATO SECO DE *Ipomoea pes-caprae brasiliensis* (L.) R. Br.**  
**(Convolvulaceae)**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade do Vale do Itajaí como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof. Dr<sup>a</sup>. Tania Mari Bellé Bresolin

Co-orientadora: Prof. Dr<sup>a</sup>. Angélica Garcia Couto

Itajaí, fevereiro de 2013

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO POR CLAE PARA  
ANÁLISE DA ESTABILIDADE DE SOLUÇÕES EXTRATIVAS E  
EXTRATO SECO DE *Ipomoea pes-caprae brasiliensis* (L.) R. Br.  
(Convolvulaceae)**

DANIELA MAES DUTRA

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração Produtos Naturais e Substâncias Bioativas e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade do Vale do Itajaí.

---

Prof<sup>a</sup>. Tania Mari Bellé Bresolin, Dr<sup>a</sup>.  
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Apresentado perante a Banca Examinadora composta pelos Professores:

---

Prof<sup>a</sup>. Tania Mari Bellé Bresolin, Dr<sup>a</sup>. (UNIVALI)  
Presidenta e Orientadora

---

Prof<sup>a</sup>. Angélica Garcia Couto, Dr<sup>a</sup>. (UNIVALI)  
Co-orientadora

---

Prof. Clóvis Antônio Rodrigues, Dr. (UNIVALI)  
Membro interno

---

Prof. Rogério Correa, Dr. (UNIVALI)  
Membro interno

---

Prof. Brás Heleno de Oliveira, Dr. (UFPR)  
Membro externo

Itajaí (SC), 22 de fevereiro de 2013.

## AGRADECIMENTOS

A minha **Família**, fundamental pra me dar motivação e força pra continuar.  
Minha gratidão e amor eternos.

Ao meu marido **Ricardo**, pelo companheirismo, amor e dedicação incondicionais.

A minha orientadora **Tania** e co-orientadora **Angélica** pelos conhecimentos adquiridos, confiança, paciência, atenção e amizade.

Aos professores **Clóvis** e **Rogério** pelas contribuições desde o começo, quando esta dissertação ainda era um projeto.

Ao professor **Brás** pela disponibilidade e profissionalismo na avaliação e correção deste trabalho.

Aos professores **Rene, Henri, Théo** e **Ruth** pela atenção dedicada.

As minhas amigas e profissionais **Luciana, Sabrina, Eliziane, Priscila** e **Melissa** pelo grandioso apoio e demonstração de carinho, sempre dispostas a ajudar.

Aos meus **Amigos** de sempre pra sempre, que estiveram ao meu lado nessa caminhada e me apoiaram para a realização de mais um sonho.

A **Deus**, que está comigo em todos os momentos, iluminando meu caminho e protegendo-me todos os dias.

*“Uma vontade acha uma maneira.”*

*Orison Marden*

# DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO POR CLAE PARA ANÁLISE DA ESTABILIDADE DE SOLUÇÕES EXTRATIVAS E EXTRATO SECO DE *Ipomoea pes-caprae brasiliensis* (L.) R. Br. (Convolvulaceae)

**Daniela Maes Dutra**

Fevereiro de 2013

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Tania Mari Bellé Bresolin.

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Angélica Garcia Couto.

Área de concentração: Produtos Naturais e Substâncias Sintéticas Bioativas

Número de páginas: 129 p.

A *Ipomoea pes-caprae brasiliensis* (L.) R. Br. (Convolvulaceae), conhecida como salsa-da-praia é usada popularmente no tratamento de queimadura por água-viva. Entre suas substâncias ativas destaca-se a isoquercitrina (ISO). Este trabalho visou desenvolver e validar um método por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para analisar a estabilidade da droga vegetal (DV), da solução extrativa (SE) e do extrato seco por *spray dryer* (ES). A planta foi coletada na praia da Esplanada (Jaguaruna-SC). A droga vegetal representada por folhas (60%) e caules (40%) foi analisada quanto às características botânicas, perda por dessecação, pureza microbiológica, perfil cromatográfico e teor de ISO por CLAE, cinzas totais e cinzas ácido insolúveis. A SE foi elaborada a 12,5% (m/v) da DV com etanol 70 °GL e maceração dinâmica por 18 h. Para a obtenção do ES, a SE foi submetida à evaporação a vácuo até redução de 70% do volume inicial e adicionada de dióxido de silício coloidal (20% em relação ao resíduo seco) e submetida à secagem por *spray dryer*. O ES foi analisado quanto ao rendimento do processo, aspecto, pH, morfologia do pó, umidade, pureza microbiológica, perfil em cromatografia em camada delgada (CCD) e CLAE e teor de ISO. O ES e a DV foram submetidos ao estudo de estabilidade acelerado (40°C, 75% UR por 6 meses), de longa duração (30°C, 75% UR por 12 meses) e fotoestabilidade (radiação UV e visível). Para a CLAE, empregou-se coluna Phenomenex® (Luna) C18 (250 x 46 mm, 5 µm), 30 °C, fluxo de 1,0 mL/min com detecção em 254 nm. A fase móvel foi composta por água acidificada (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) pH 3,0 (A) e acetonitrila (B) em sistema gradiente. O método por CLAE foi validado segundo normas oficiais, incluindo testes de degradação forçada. O método mostrou-se linear na faixa de 5-50 µg/mL de ISO. Os limites de quantificação e de detecção da ISO foram de 1,88 µg/mL e 0,56 µg/mL, respectivamente. O método apresentou boa precisão (DPR <2%, intra-dia e 2,3%, inter-dias) e exatidão, com recuperação média de 99,12% de ISO, sem interferência da matriz vegetal. A degradação do marcador foi maior nos testes de oxidação e radiação UV, porém não interferiu no tempo de retenção da ISO. A DV apresentou teor de ISO de 3,86 (±0,01) mg/g e o ES, teor de de 10,04 (±0,03) mg/g. Após 135 dias de estudo de estabilidade acelerada e 6 meses de longa duração, o ES apresentou conformidade, estando dentro da faixa de ± 10% em relação ao teor inicial. Porém a DV não foi aprovada no estudo de longa duração. O método por CLAE mostrou ser adequado para o controle de qualidade da SE e ES e para monitorar a estabilidade da DV e do ES. Mediante os resultados obtidos, espera-se obter produtos intermediários estáveis para o futuro desenvolvimento de formulações semissólidas tópicas seguras e eficazes para o tratamento de afecções cutâneas, baseada na biodiversidade nacional.

**Palavras-chave:** atividade anti-inflamatória, CLAE, estudo de estabilidade, extrato seco, *Ipomoea pes-caprae brasiliensis*, soluções extrativas, validação analítica.

# DEVELOPMENT AND VALIDATION OF LC-UV METHOD FOR ANALYSIS OF STABILITY OF EXTRACTIVE SOLUTIONS AND SPRAY DRIED EXTRACT FROM *Ipomoea pes-caprae brasiliensis* (L.) R. Br. (Convolvulaceae)

**Daniela Maes Dutra**

February 2013

Supervisor: Dr. Tania Mari Bellé Bresolin.

Supervisor: Dr. Angélica Garcia Couto.

Area of concentration: Natural Products and Bioactive Synthetic Substances.

Number of pages: 129 p.

The *Ipomoea pes-caprae brasiliensis* (L.) R. Br (Convolvulaceae), known as salsa-the-beach is used for the treatment of burns by jellyfish. Among its active ingredients stands out isoquercitrin (ISO). This work aimed to develop and validate a method for High Performance Liquid Chromatography (HPLC) to analyze the stability of the herbal drug (DV), the extractive solution (SE) and the spray dried extract (ES). The plant was collected on the beach of the Esplanade (Jaguaruna-SC). The drug represented by leaves (60%) and stems (40%) was analyzed as the botanical characteristics, loss on drying, microbiological purity, chromatographic profile and content by HPLC, total ash and acid insoluble ash. The SE was prepared at 12.5% (w/v) of ethanol DV 70 °GL and dynamic maceration for 18 h. To obtain ES, SE was subjected to vacuum evaporation to 70% of reduction of the initial volume and added with colloidal silicon dioxide (20% on dry weight basis) followed by spray drying. The ES was analyzed for process yield, pH, morphology of dust, moisture, microbiological purity, profile layer chromatography (TLC) and HPLC and ISO content. The DV and ES were subjected to accelerated stability study (40 °C, 75% RH for 6 months) and long-term (30 °C, 75% RH for 6 months) and photostability (UV and visible light). For the HPLC column used is Phenomenex® (Luna) C18 (250 x 46 mm, 5 mm), 30 °C, flow 1.0 mL/min with detection at 254 nm. The mobile phase was composed of acidified water (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) pH 3.0 (A) and acetonitrile (B) in the gradient system. The HPLC method was validated according to official, including forced degradation tests. The method was linear in the range of 5-50 mg / mL of ISO. The limits of detection and quantification of ISO were 1.88 mg/mL and 0.56 mg/mL, respectively. The method showed good precision (RSD <2%, intra-day and 2.3%, inter-day) and accuracy, with an average recovery of 99.12% ISO, without interference from herbal matrix. The degradation was greater in tests marker oxidation and UV radiation, but did not affect the retention time of the ISO. The ISO content presented in DV of 3.86 (± 0.01) mg/g ES, content of 10.04 (± 0.03) mg/g. After 135 days of accelerated stability study and 6 months of long-term, the ES presented accordingly, being within the range ± 10% relative to the initial content. However, the DV failed the long-term study. The HPLC method was shown to be suitable for the quality control of the SE and ES and to monitor the stability of DV and ES. From the results obtained, it is expected to obtain stable intermediates for the future development of formulations semissólidas safe and effective for topical treatment of skin disorders based on national biodiversity.

**Keywords:** anti-inflammatory activity, HPLC, stability study, spray dried extract, *Ipomoea pes-caprae brasiliensis*, extractive solutions, analytical validation.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	<i>Ipomoea pes-caprae brasiliensis</i> (L.) R. Br.....	<b>24</b>
<b>Figura 2.</b>	Estrutura química dos flavonoides de interesse.....	<b>27</b>
<b>Figura 3.</b>	Pescapreínas XXI-XXX.....	<b>30</b>
<b>Figura 4.</b>	Fluxograma do estudo de estresse: Hidrólise sob condições ácidas e básicas.....	<b>52</b>
<b>Figura 5.</b>	Fluxograma do estudo de estresse: Oxidação.....	<b>53</b>
<b>Figura 6.</b>	Fluxograma do estudo de estresse: Fotólise.....	<b>55</b>
<b>Figura 7.</b>	A) Cromatograma do padrão de isoquercitrina a 25 µg/mL; B) Cromatograma da SA com picos de flavonoides demarcados; C) Cromatograma da SE obtido por Adriano (2009) com os picos demarcados; D) solvente; E) fase móvel em 254 nm.....	<b>84</b>
<b>Figura 8.</b>	A) Cromatograma da solução extrativa a 3,86 mg/g, em 254 nm B) estresse oxidativo, 3h; C) hidrólise alcalina, 4h com neutralização; D) hidrólise ácida, 4h; E) hidrólise ácida, 15 min com aquecimento; F) hidrólise neutra, 15 min com aquecimento.....	<b>87</b>
<b>Figura 9.</b>	A) Curva analítica do padrão de isoquercitrina a 25 µg/mL - curva A e da solução extrativa adicionada do padrão -curva B; B) Curva da solução extrativa de <i>I. pes-caprae</i> a 11,80 mg/g -curva C.....	<b>89</b>
<b>Figura 10.</b>	Gráficos dos resíduos no modelo quadrático: A) Curva da linearidade do padrão -curva A; B) Curva da linearidade da solução extrativa -curva C.....	<b>90</b>
<b>Figura 11.</b>	Face adaxial (A) e face abaxial (B) das folhas de <i>Ipomoea pes-caprae brasiliensis</i> (L.) R. Br.....	<b>96</b>
<b>Figura 12.</b>	Características microscópicas das folhas de <i>Ipomoea pes-caprae brasiliensis</i> (L.) R. Br. em vista frontal. A) Secção paradérmica da face adaxial com estômatos paracíticos. B) Detalhe da face adaxial com células epidérmicas de contorno poligonal com cutícula estriada (seta). C) Ocorrência de tricoma glandular (TG) na face adaxial. D) Secção paradérmica da face abaxial da folha com estômatos paracíticos e células epidérmicas de contorno poligonal com cutícula estriada (seta). E) Ocorrência de tricoma glandular (TG) na face abaxial.....	<b>98</b>
<b>Figura 13.</b>	Características microscópicas das folhas de <i>Ipomoea pes-caprae brasiliensis</i> (L.) R. Br. em secção transversal. A) Mesofilo isolateral em secção transversal: parênquima paliçádico, parênquima esponjoso e parênquima paliçádico; mesofilo com cristal tipo drusa, tubo laticífero e feixe vascular. B) Detalhe do mesofilo em secção transversal mostrando cutícula espessa (seta) na face adaxial. C) Detalhe do mesofilo mostrando cristal tipo drusa (CR). D) Detalhe do mesofilo mostrando tubo laticífero (canal secretor de látex) em vista transversal. E) Detalhe do tricoma glandular na face adaxial da epiderme foliar. F) Ocorrência de tubos laticíferos em vista longitudinal (setas) no mesofilo em volta do feixe vascular em vista longitudinal (FV).....	<b>99</b>
<b>Figura 14.</b>	Características microscópicas das folhas (nervura central e	

	pecíolo) de <i>Ipomoea pes-caprae</i> . A) Secção transversal da nervura central: feixe vascular central (FV), colênquima (Col) e tubo laticífero (TL). B) Secção transversal do pecíolo: colênquima (Col), feixes vasculares (setas), feixe vascular em arco (FV), cristal tipo drusa (CR) e tubo laticífero (TL). C) Detalhe do pecíolo em secção transversal com cristal do tipo drusa. D) Detalhe do tubo laticífero em secção transversal evidenciando epitélio secretor (seta). E) Detalhe do feixe vascular em arco do pecíolo destacando floema externo e interno (F) ao xilema (X). F) Secção longitudinal do pecíolo mostrando feixe vascular (FV) e tubos laticíferos (TL). F') Detalhe do tubo laticífero em secção longitudinal.....	100
<b>Figura 15.</b>	Estruturas moleculares de alguns compostos pesquisados. A) Verbascosídeo; B) Ácido Cafeico; C) Ácido Clorogênico; D) Ácido Salicílico; E) Solazodina; F) Luteolina; G) Ácido Betulínico; H) Cinarina.....	103
<b>Figura 16.</b>	Cromatogramas do ensaio de fotoestabilidade da droga vegetal. A) Amostra protegida com papel alumínio (controle UV); B) Amostra submetida à radiação UV (200 watt.hs/m <sup>2</sup> ); C) Amostra protegida com papel alumínio (controle VIS); D) Amostra submetida à radiação VIS (1,2 milhões lux. hora).....	105
<b>Figura 17.</b>	Perfil cromatográfico em CCD da solução extrativa de <i>I. pes-caprae</i> (SE), comparados ao padrão de isoquercitrina (P) e extrato seco (ES). Sistema de eluição acetato de etila: acetona: água purificada: metanol (25:8:1:3), em cromatoplaça de sílica gel (6,5 cm) revelada com solução metanólica de difenilboriloxi-etilamina a 1%, fixadas com solução hidroetanólica 77%, contendo polietilenoglicol 4000 a 4% (m/v) e observadas sob luz em 365 nm. Como substância de referência para flavonoides foi utilizada a isoquercitrina.....	107
<b>Figura 18.</b>	Extrato seco de <i>Ipomoea pes-caprae brasiliensis</i> (L.) R. Br.....	109
<b>Figura 19.</b>	Microscopia eletrônica por varredura (MEV) do extrato seco de <i>I. pes-caprae</i> .....	111
<b>Figura 20.</b>	Perfil cromatográfico do extrato seco a 2,5 mg/mL de <i>I. pes-caprae</i> .....	112
<b>Figura 21.</b>	Cromatogramas do ensaio de fotoestabilidade do extrato seco de <i>I. pes-caprae</i> . A) Amostra protegida com papel alumínio (controle UV); B) Amostra submetida à radiação UV (200 watt.hs/m <sup>2</sup> ); C) Amostra protegida com papel alumínio (controle VIS); D) Amostra submetida à radiação VIS (1,2 milhões lux. hora).....	113

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1.</b>	Parâmetros de adequação do sistema e recomendações.....	<b>37</b>
<b>Quadro 2.</b>	Classificação dos testes passíveis de validação segundo a sua finalidade.....	<b>37</b>
<b>Quadro 3.</b>	Ensaio necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade.....	<b>38</b>
<b>Quadro 4.</b>	Limites percentuais do teor do analito que devem estar contidos no intervalo de linearidade para alguns métodos analíticos.....	<b>41</b>
<b>Quadro 5.</b>	Condições de estresse para a realização do estudo de degradação forçada.....	<b>51</b>
<b>Quadro 6.</b>	Planejamento do ensaio de linearidade.....	<b>66</b>
<b>Quadro 7.</b>	Limites microbianos para o controle de qualidade de drogas vegetais que foram submetidas a processos extrativos a frio de acordo com a Farmacopéia Britânica (2008) e Farmacopéia Brasileira (2010).....	<b>71</b>
<b>Quadro 8.</b>	Limites microbianos para o controle de qualidade de extrato seco de acordo com a Farmacopéia Britânica (2008) e Farmacopéia Brasileira (2010).....	<b>77</b>
<b>Quadro 9.</b>	Limites microbianos para o controle de qualidade de matéria-prima de acordo com a Farmacopéia Britânica (2008) e Farmacopéia Brasileira (2010).....	<b>77</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b>	Sistemas gradiente e isocrático testados em CLAE.....	<b>81</b>
<b>Tabela 2.</b>	Gradiente da fase móvel do método validado por CLAE.....	<b>82</b>
<b>Tabela 3.</b>	Percentual remanescente de área de isoquercitrina na solução extrativa de <i>I. pes-caprae</i> , em relação a solução não degradada após testes de degradação forçada.....	<b>86</b>
<b>Tabela 4.</b>	Análise estatística para o cálculo de LD e LQ da isoquercitrina e coeficientes angulares e lineares, valor de P e <i>r</i> das Curvas A, B e C.....	<b>91</b>
<b>Tabela 5.</b>	Análise estatística para a determinação de exatidão, como percentual de recuperação do método para quantificação de isoquercitrina em solução extrativa e extrato seco de <i>I. pes-caprae</i> .....	<b>92</b>
<b>Tabela 6.</b>	Análise estatística para a determinação da precisão inter e intra-ensaio para a quantificação de isoquercitrina em solução extrativa e extrato seco de <i>I. pes-caprae</i> .....	<b>93</b>
<b>Tabela 7.</b>	Análise estatística para a determinação da robustez do método para a quantificação de isoquercitrina em solução extrativa de <i>I. pes-caprae</i> .....	<b>95</b>
<b>Tabela 8.</b>	Resultados (média e DPR) para as cinzas totais e ácido insolúveis, perda por dessecação e teor de isoquercitrina da mistura de folhas e caules (droga vegetal) de <i>I. pes-caprae</i> em diferentes estudos.....	<b>102</b>
<b>Tabela 9.</b>	Média das áreas obtidas e porcentagem de recuperação (%) calculada em relação à amostra controle no ensaio de fotoestabilidade da droga vegetal de <i>I. pes-caprae</i> .....	<b>104</b>
<b>Tabela 10.</b>	Média das áreas obtidas e porcentagem de recuperação (%) em relação as amostras revestidas com papel laminado no ensaio de fotoestabilidade do extrato seco de <i>I. pes-caprae</i> .....	<b>112</b>
<b>Tabela 11.</b>	Resultados obtidos durante o estudo de estabilidade acelerada (tempos zero, 45 dias, 90 dias e 135 dias) da droga vegetal e do extrato seco <i>I. pes-caprae</i> .....	<b>116</b>
<b>Tabela 12.</b>	Resultados obtidos durante o estudo de estabilidade de longa duração (tempos zero, 45 dias, 90 dias, 135 dias e 180 dias) da droga vegetal e do extrato seco <i>I. pes-caprae</i> .....	<b>116</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
BPF - Boas Práticas de Fabricação  
BTGNB - Bactérias gram-negativas bile-tolerantes  
CCD - Cromatografia em camada delgada  
CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência  
CN - Caldo nutritivo  
DPR - Desvio padrão relativo  
DV - Droga vegetal  
EA - Estudo de estabilidade acelerado  
ELD - Estudo de estabilidade de longa duração  
EMA - *European Medicines Agency*  
ES - Extrato seco  
ESE - Solução extrato seco estoque  
FDA - US Food and Drug Administration  
ICH - International Conference on Harmonization  
INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia  
ISO - Isoquercitrina  
LAC+I - Caldo lactosado  
LD - Limite de detecção  
LQ - Limite de quantificação  
NIQFAR - Núcleo de Investigações Químico Farmacêuticas  
OMS - Organização Mundial da Saúde  
PDA - Ágar dextrose batata  
PGE2 - Prostaglandina E2  
 $r$  - Coeficiente de correlação  
 $r^2$  - Coeficiente de determinação  
RDC - Resolução de Diretoria Colegiada  
RE - Resolução Específica  
RS - Resíduo seco  
Rf - Fator de retenção  
RT - Tempo de retenção  
SA - Solução amostra

SE - Solução extrativa  
SES - Solução extrato seco  
SP - Solução padrão  
SPE - Solução padrão estoque  
TAMC - Contagem de bactérias mesófilas  
TFT - Flavonoides totais  
TSA - Ágar caseína de soja  
TYMC - Contagem de fungos e leveduras  
UFC - Unidade formadora de colônias  
UNIVALI - Universidade do Vale do Itajaí  
USP - United States Pharmacopeia  
UV - Ultravioleta  
VIS - Visível

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>17</b>
2.1	Objetivo Geral	17
2.2	Objetivos Específicos	17
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>18</b>
<b>3.1</b>	<b>Plantas medicinais: do uso popular ao desenvolvimento de fitoterápicos</b>	<b>18</b>
3.1.1	Desenvolvimento tecnológico de fitoterápicos	20
<b>3.2</b>	<b>Considerações sobre <i>Ipomoea pes-caprae brasiliensis</i> (L.) R. Br.</b>	<b>22</b>
3.2.1	Flavonoides	24
3.2.2	Estudos fitoquímicos, farmacológicos e tecnológicos	28
<b>3.3</b>	<b>Controle de qualidade de fitoterápicos</b>	<b>33</b>
3.3.1	Especificidade/Seletividade	39
3.3.2	Linearidade	39
3.3.3	Intervalo ou faixa de trabalho	41
3.3.4	Exatidão	42
3.3.5	Precisão	43
3.3.6	Robustez	44
3.3.7	Limites de Detecção e Quantificação	44
<b>3.4</b>	<b>Estabilidade de medicamentos</b>	<b>45</b>
3.4.1	Estudo de estabilidade preliminar	47
3.4.2	Estudo de estabilidade acelerada (EA)	47
3.4.3	Estudo de estabilidade de longa duração (ELD) e de acompanhamento	49
3.4.4	Testes de estresse	49
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>56</b>
<b>4.1</b>	<b>Materiais</b>	<b>56</b>
4.1.1	Reagentes e solventes	56
4.1.2	Equipamentos e outros materiais	57
4.1.3	Obtenção e tratamento da droga vegetal (DV)	59
<b>4.2</b>	<b>Métodos</b>	<b>59</b>
4.2.1	Desenvolvimento e validação do método analítico para quantificação da isoquercitrina por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	59

4.2.2	Caracterização da droga vegetal (DV).....	69
4.2.3	Caracterização da solução extrativa hidroetanólica de <i>I. pes-caprae brasiliensis</i> (L.) R. Br. ....	73
4.2.4	Obtenção e caracterização do extrato seco (ES) por <i>spray dryer</i> .....	75
4.2.5	Estudos de estabilidade da droga vegetal (DV) e do extrato seco (ES) .....	78
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>80</b>
5.1	Desenvolvimento e validação do método analítico para quantificação da isoquercitrina por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) .....	80
5.2	Caracterização da droga vegetal (DV).....	96
5.3	Caracterização da solução extrativa hidroetanólica de <i>I. pes-caprae brasiliensis</i> (L.) R. Br. ....	106
5.4	Caracterização do extrato seco por <i>spray dryer</i> (ES).....	108
5.5	Estudo de Estabilidade do extrato seco e droga vegetal .....	114
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>117</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>120</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As plantas são fontes de importantes substâncias biologicamente ativas, muitas das quais constituem os modelos para síntese de um grande número de fármacos. A diversidade molecular e de função biológica são aspectos incentivadores para o estudo e desenvolvimento de novas substâncias ativas. Este fato possibilita que os compostos químicos presentes nas plantas possam se tornar potenciais fármacos para as mais diversas patologias (KLEIN et al., 2010).

O Brasil é o país que detém a maior parcela da biodiversidade do planeta e tal privilégio, associado aos conhecimentos étnicos e culturais, representa uma oportunidade relevante para o desenvolvimento econômico do país, desde o cultivo de plantas medicinais até o seu beneficiamento e obtenção de drogas vegetais, derivados de droga vegetal e fitoterápicos, além da potencial descoberta de novos fármacos (ZUANAZZI; MAYORGA, 2010).

Dos 252 fármacos considerados básicos e essenciais pela Organização Mundial da Saúde (OMS), 11% são originários de plantas e um número significativo provém da síntese a partir de precursores naturais (ZUANAZZI; MAYORGA, 2010; PERFEITO, 2012).

A Organização Mundial da Saúde (OMS), estimou que 80% da população depende da medicina tradicional, que por sua vez, faz uso de derivados de plantas medicinais, para atender as necessidades de saúde (WHO, 2002; SOUZA-MOREIRA; SALGADO; PIETRO, 2010). Em muitos países desenvolvidos, o uso complementar da medicina tradicional está se tornando cada vez mais popular sendo que a porcentagem da população que faz o seu uso pelo menos uma vez é de 48% na Austrália, 70% no Canadá, 42% nos EUA, 38% na Bélgica e 75% na França (PERFEITO, 2012).

Estima-se que o mercado mundial de medicamentos derivados de plantas faturou 26 bilhões de dólares em 2011, valor que representa apenas 3% do mercado global de medicamentos. O mercado nacional de fitoterápicos arrecadou US\$ 566 milhões nos últimos 10 anos, e seu crescimento se dá na ordem de 15% ao ano, enquanto o mercado de medicamentos sintéticos cresce em torno de 3 a 4% ao ano (ZUANAZZI; MAYORGA, 2010; MARQUES; SOUZA, 2012).

Entre as plantas medicinais com potencial para a geração de novos fitoterápicos, destaca-se a *Ipomoea pes-caprae brasiliensis* (L.) R. Br. (Convolvulaceae). Dentre os usos tradicionais como tônico e purgativo, também é empregada especialmente pelos banhistas e pescadores, sendo utilizada sob a forma de pasta no local do ferimento causado pelo contato com o veneno de água-viva (WASUWAT, 1970; MEIRA et al., 2012). Conhecida como “Salsa da Praia” é potencialmente benéfica à saúde humana e requer investimentos nas diversas áreas de pesquisa e desenvolvimento, sendo portanto, foco de esforços multidisciplinares. Devido aos relatos de suas propriedades cicatrizante, analgésica, anti-inflamatória e entre outros, a validação de suas atividades biológicas tem sido alvo de vários estudos já realizados e em fase de desenvolvimento pelo Núcleo de Investigações Químico Farmacêuticas (NIQFAR) da Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI) (BARNI; CECHINEL FILHO; COUTO, 2009; ADRIANO, 2009; VIEIRA et al., 2012). Krogh et al. (1999) e De Souza et al. (2000) validaram a propriedade analgésica *in vivo* da planta a partir de estudos pré-clínicos. Desta forma, a isoquercitrina (ISO) foi escolhida como marcador deste estudo.

Adriano (2009) desenvolveu formulações de gel para uso tópico a partir da incorporação de extrato seco de *I. pes-caprae* (0,18%), por *spray dryer*, em diferentes bases (Aristoflex<sup>®</sup>, Carbopol Ultrex<sup>®</sup> e Natrosol<sup>®</sup>). O teor de ISO por CLAE, baseado no método desenvolvido por Soares (2008) para as soluções extrativas, foi determinado nos derivados vegetais e géis. Porém, no teste de estabilidade das formulações de géis foi detectada a diminuição do teor de ISO ao final do estudo, além do método apresentar baixa recuperação e resolução entre os picos. Portanto, há a necessidade de investigar a estabilidade da droga vegetal e derivados vegetais para desenvolver futuramente um produto fitoterápico estável.

Para viabilizar o estudo de estabilidade dos derivados vegetais e futuramente dos fitoterápicos, é necessário otimizar o método por CLAE, previamente desenvolvido, comprovar se o mesmo é indicativo de estabilidade da solução extrativa, bem como obter mais informações a cerca da estabilidade intrínseca da droga vegetal, das soluções extrativas e do extrato seco de *I. pes-caprae* padronizado em relação ao marcador ISO.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

- Desenvolver e validar metodologia analítica por CLAE, indicativa de estabilidade das soluções extrativas e do extrato seco de *Ipomoea pes-caprae brasiliensis* (L.) R. Br. e analisar a estabilidade química e física do extrato seco padronizado em relação ao marcador isoquercitrina.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver e validar metodologia analítica indicativa da estabilidade das soluções extrativas das partes aéreas (caules e folhas) de *I. pes-caprae* por CLAE;
- Estudar as possíveis vias de degradação da solução extrativa de *I. pes-caprae* empregando testes de degradação forçada (hidrólise neutra, ácida e alcalina, oxidação e fotoestabilidade);
- Analisar a droga vegetal quanto às suas características macro e microscópicas, pureza microbiológica, perda por dessecação, cinzas totais, cinzas insolúveis em ácido e teor do marcador por CLAE;
- Obter as soluções extrativas hidroetanólicas de *I. pes-caprae* e analisar as características organolépticas, o grau alcoólico, o pH, o resíduo seco, o perfil por cromatografia em camada delgada (CCD) e por CLAE, o teor do marcador por CLAE e pureza microbiológica;
- Obter o extrato seco por *spray dryer* e analisar as características organolépticas, o pH, pureza microbiológica, a morfologia e tamanho de partículas por microscopia eletrônica de varredura, a perda por dessecação, o perfil por CCD e CLAE, o teor do marcador por CLAE, o rendimento do processo e a fotoestabilidade, assim como analisar os parâmetros de exatidão e precisão para a validação analítica;
- Analisar a estabilidade acelerada e de longa duração do extrato seco padronizado e da droga vegetal.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Plantas medicinais: do uso popular ao desenvolvimento de fitoterápicos

Segundo Marques e Souza (2012) o conhecimento sobre plantas medicinais simboliza, muitas vezes, o único recurso terapêutico de comunidades e grupos étnicos. A busca por alívio e cura de doenças através da ingestão de preparações a base de folhas é utilizada pela humanidade desde tempos imemoriais. Ainda hoje, nas regiões mais pobres do país e até mesmo nos grandes centros urbanos, plantas medicinais são comercializadas em feiras livres, mercados populares e encontradas em quintais residenciais (VIEGAS Jr.; BOLZANI; BARREIRO, 2006; ZUANAZZI; MAYORGA, 2010).

A OMS reconhece que grande parte da população dos países em desenvolvimento depende da medicina popular (WHO, 2002). Sendo assim, os usuários mantêm a prática do consumo de plantas medicinais, tornando válidas informações terapêuticas que foram sendo acumuladas durante séculos (SOUZA-MOREIRA; SALGADO; PIETRO, 2010).

Observando-se a crescente aceitação da fitoterapia por profissionais de saúde da atenção básica assim como o aumento de seu uso pela população, a OMS incentiva investimentos em plantas medicinais desde 1978 (SILVEIRA; BANDEIRA; ARRAIS, 2008; PERFEITO 2012).

Os medicamentos fitoterápicos são obtidos empregando-se, como princípio ativo, exclusivamente derivados de drogas vegetais (extrato, tintura, óleo, cera, exsudato, suco, e outros). Os fitoterápicos, assim como todos os medicamentos, devem oferecer garantia de qualidade, ter efeitos terapêuticos comprovados, composição padronizada e segurança de uso para a população (BRASIL, 2010a).

O aumento do uso de fitoterápicos pela população mundial também se traduz em preocupação com a qualidade desses produtos, devido aos problemas encontrados no que se referem à autenticidade, pureza e composição química das matérias-primas vegetais que contribuem para um medicamento de má qualidade (CARVALHO et al., 2008). As plantas medicinais estão sujeitas às variações de sua composição química devido aos fatores genéticos, condições de armazenamento,

tratamento pós-colheita e processo de extração (SILVA; COUTO; BRESOLIN, 2012).

No Brasil, o conhecimento destas informações é dificultado pela enorme extensão geográfica, uma vez que as plantas podem ser obtidas de localidades muito diferentes. Este fato dificulta a harmonização dos métodos de controle de qualidade de fitoterápicos, bem como a normalização de um padrão nacional (SOUZA-MOREIRA; SALGADO; PIETRO, 2010).

Parâmetros de uniformidade e reprodutibilidade utilizados na produção de medicamentos sintéticos, são utilizados para a garantia da qualidade em relação à segurança e eficácia na produção de fitoterápicos (SILVA; COUTO; BRESOLIN, 2012). Atualmente, a padronização é realizada com base no teor de uma substância marcadora presente no extrato, indicando que se a mesma estiver presente em quantidade apropriada, também os demais componentes estarão igualmente representados (DAVID; NASCIMENTO; DAVID, 2004; ZUANAZZI; MAYORGA, 2010).

Entende-se por qualidade o conjunto de critérios que caracterizam tanto a matéria-prima quanto o produto final (BRASIL, 2007). É importante ressaltar que a qualidade dos fitoterápicos não é obtida, simplesmente, por um laudo de análise da matéria-prima vegetal favorável, mas deve ser embasada na estrutura da produção, minuciosamente planejada, desde o cultivo até a fase de dispensação (SILVA; COUTO; BRESOLIN, 2012).

Os requisitos de qualidade auxiliam neste processo, aliados à aplicação das Boas Práticas de Fabricação e de Garantia de Qualidade, propiciando a obtenção de matérias-primas vegetais e fitoterápicos adequados (FISCHER, 2005). Desta forma, a eficácia e a segurança devem ser validadas através de levantamentos etnofarmacológicos, documentações tecnocientíficas em bibliografia e/ou publicações indexadas e/ou estudos farmacológicos e toxicológicos pré-clínicos e clínicos. A segurança é determinada pelos ensaios que comprovam a ausência de efeitos tóxicos, bem como pela inexistência de contaminantes nocivos à saúde. A qualidade deve ser alcançada mediante o controle das matérias-primas, do produto acabado, materiais de embalagem, formulação farmacêutica e estudos de estabilidade (BRASIL, 2007).

Conforme o levantamento da situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil (Carvalho et al., 2008), foram registrados nos últimos anos, 512 medicamentos, sendo 80 fitoterápicos associados e 432 obtidos de apenas uma

espécie vegetal. Em 2012, um recente levantamento foi divulgado a partir de fontes primárias da Anvisa. O número de fitoterápicos registrados no Brasil até julho de 2011 foi atualizado, tendo em vista a dinâmica de todo o processo de novas concessões, renovações e cancelamentos de registros. O estudo apontou o registro de apenas 382 medicamentos, sendo 25 fitoterápicos associados e 357 simples. Esta redução expressiva pode ser explicada pela não comprovação da qualidade dos produtos ou à ausência de comprovação de segurança e eficácia destes medicamentos, segundo as exigências da legislação sanitária brasileira (PERFEITO, 2012). Estes dados indicam a necessidade de investimentos na avaliação da eficácia e segurança das espécies medicinais brasileiras, assim como no desenvolvimento dos fitoterápicos que as contenham. No Brasil, o governo federal publicou uma política de incentivo ao uso da fitoterapia, entre outras terapêuticas, a saber, a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares do SUS e a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, a fim de garantir o acesso seguro e correto pela população, além de estimular projetos de produção e dispensação desses produtos (BRASIL, 2006a, 2006b; ZUANAZZI; MAYORGA, 2010; PERFEITO, 2012).

O mercado de fitoterápicos desperta o interesse de pesquisadores em estudos envolvendo diversas áreas que enriquecem o aprendizado sobre os inesgotáveis recursos naturais. Como resultados, direto ou indireto, busca-se prevenir, curar ou minimizar os sintomas das doenças, com um custo mais acessível à população e aos serviços públicos de saúde, comparativamente àqueles obtidos por síntese química que são, em geral, mais caros, devido às patentes tecnológicas envolvidas (TOLEDO et al., 2003; MARQUES; SOUZA, 2012).

### **3.1.1 Desenvolvimento tecnológico de fitoterápicos**

Ao contrário do que é observado com os medicamentos sintéticos, o controle de qualidade, a padronização e a estabilidade de medicamentos fitoterápicos, constituem uma tarefa bastante complexa, embora possível atualmente, em função dos avanços crescentes alcançados na área de tecnologia farmacêutica (SILVA; COUTO; BRESOLIN, 2012).

Dentre as vantagens dos fitoterápicos pode-se citar a possibilidade do efeito sinérgico entre os diferentes compostos que compõem o fitocomplexo. De maneira

geral, as plantas apresentam vários compostos com efeitos similares e a associação de mecanismos por compostos agindo em alvos moleculares diferentes apresenta menor risco de efeitos colaterais. Considerando que os compostos ativos apresentam-se em concentrações reduzidas nas plantas, os riscos de efeitos secundários não desejáveis são muito menores, assim como também são menores os custos de pesquisa. Enquanto a descoberta e desenvolvimento de um novo fármaco envolvem investimentos elevados, na ordem de 300 a 500 milhões de dólares, o desenvolvimento de um novo fitoterápico pode ser obtido a custos muito menores (MUSCHIETTI; MARTINO, 2007; KLEIN et al., 2010).

O desenvolvimento de fitoterápicos inclui várias etapas e envolve um processo interdisciplinar. As áreas de conhecimento envolvidas abrangem desde a antropologia botânica, agronomia, ecologia, química, fitoquímica, farmacologia, toxicologia, biotecnologia e tecnologia farmacêutica (SOUZA-MOREIRA; SALGADO; PIETRO, 2010).

A primeira etapa refere-se à pesquisa etnobotânica da planta e sua descrição em literatura científica e compêndios internacionais, seguida da etapa de colheita e registro botânico em herbário. Dentre as etapas sequenciais, citam-se a etapa botânica e agrônômica relativa à identificação da planta e a parte empregada para obtenção do farmacógeno. No encaminhamento agrônômico, objetiva-se a produção abundante e uniforme da matéria-prima vegetal. Na etapa fitoquímica são realizados o isolamento, a elucidação estrutural, a identificação dos constituintes mais importantes, a verificação da ausência de contaminantes e a padronização dos marcadores químicos. A etapa de desenvolvimento de metodologia analítica é necessária para avaliação da qualidade do produto fitoterápico, o que garante a constância na ação terapêutica e a segurança na utilização. A etapa farmacêutica relaciona-se ao preparo da forma farmacêutica para administração, com a garantia da qualidade e uniformidade da amostra, assim como sua estabilidade durante os testes clínicos e pré-clínicos. Por fim, a etapa de ensaios biológicos inclui a investigação farmacológica e toxicológica das substâncias isoladas, de frações obtidas ou extratos totais. Esta etapa é essencial para a transformação da planta medicinal em produto fitoterápico, juntamente com os estudos de desenvolvimento de metodologia analítica para o controle de qualidade (SIANI, 2003; TOLEDO et al., 2003).

Estes conhecimentos devem estar atrelados às Boas Práticas de Fabricação, conforme a Resolução RDC nº 17, de 16 de abril de 2010 (BRASIL, 2010b). De acordo com Niero et al. (2003) os fitoterápicos são tratados com o mesmo rigor que os medicamentos sintéticos em relação às exigências de qualidade, segurança e eficácia, apesar da composição complexa dos primeiros, enquanto os últimos possuem em sua maioria, substâncias únicas isoladas que facilitam sua obtenção, padronização e estabilidade.

No Brasil, é de responsabilidade do Ministério da Saúde, especificamente da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), legislar, fiscalizar e aprovar a utilização de plantas nos diferentes setores relacionados à saúde, como os medicamentos (ANVISA, 2004).

A legislação brasileira exige que os medicamentos fitoterápicos devem passar pelos crivos de eficácia, segurança e qualidade assim como qualquer medicamento (BRASIL, 2010a; KLEIN et al., 2010). Portanto, há necessidade de serem desenvolvidas metodologias analíticas específicas para tais produtos, desde a matéria-prima até a forma farmacêutica a fim de preservar a integridade química e farmacológica da planta, garantir a constância de sua ação biológica e a segurança de sua utilização, além de valorizar seu potencial terapêutico (BORELLA et al., 2010; SOUZA-MOREIRA; SALGADO; PIETRO, 2010).

### **3.2 Considerações sobre *Ipomoea pes-caprae brasiliensis* (L.) R. Br.**

Convolvulaceae é uma família formada principalmente por ervas trepadeiras e arbustos. Compreende aproximadamente 85 gêneros e 2800 espécies que são caracterizadas por quase sempre possuírem flores solitárias e folhas simples (SCHULTZ, 1990). O gênero *Ipomoea*, com aproximadamente 500-600 espécies, compreende o maior número de espécies dentro da família (AUSTIN; HUAMAN, 1996) e ocorre em todos os trópicos do mundo (CAO et al., 2005; MEIRA et al., 2012).

De acordo com Devall (1992) são registradas duas subespécies: *I. pes-caprae littoralis*, com distribuição limitada ao Oceano Índico e *I. pes-caprae brasiliensis* com distribuição pantropical, exceto no Oceano Índico. Na costa atlântica, seu limite norte é registrado para o Golfo do México até a Louisiana (DEVALL, 1987).

Em praias tropicais litorâneas, cita-se a ampla ocorrência da *Ipomoea pes-caprae brasiliensis* (L.) R. Br., uma planta de vida longa que coloniza as dunas frontais desta região (HUECK, 1955; DEVALL, 1992).

Por estar sujeita à ação mais rigorosa dos fatores ambientais da duna frontal, suas folhas ficam em posição vertical, apresentando parênquima paliçádico em ambas as faces. Como este tecido é rico em cloroplastos, consegue aproveitar melhor a luminosidade e evitar um contato direto com a areia e a água do mar (GASPER; HOLETZ; QUADROS, 2006).

A *I. pes-caprae* é uma espécie perene e estolonífera, que desenvolve um sistema de ramos longos ou curtos, podendo atingir até 40 m de comprimento (HUECK, 1955). No sul do Brasil, a floração e a frutificação ocorrem nos meses de verão e outono, em períodos com temperatura e pluviosidade altas (SANTOS; ARRUDA, 1995). Neste período, também ocorre a expansão de estolões e a produção de ramos curtos e folhas (CASTELLANI, 2003). É citada como um dos melhores exemplos conhecidos de dispersão oceânica, com sementes flutuantes que não são danificadas pela ação da água do mar, caracterizando-se por ser uma planta halófito comum e amplamente distribuída (GASPER; HOLETZ; QUADROS, 2006). Apesar de perturbações por invasão das marés, tempestades, soterramentos e predação por insetos, a espécie é encontrada logo após a linha de maré alta, onde a numerosa produção de sementes de *I. pes-caprae* permite a sua conservação nas regiões onde se fixou (HUECK, 1955; WILSON, 1977; DEVALL, 1987). Castellani e Santos (2006) demonstraram que a *I. pes-caprae* tem a capacidade de se regenerar sob diferentes situações, face a desde que não haja erosão no hábitat onde a planta germinou.

Possui flores arroxeadas em forma de sino, com até 10 cm de comprimento, que nascem nos ramos rasteiramente. Suas folhas de coloração verde-escura e nervuras bem evidentes dispõem-se alternadamente ao longo do caule, com os frutos semelhantes a cápsulas arredondadas (Figura 1) (FOOTT, 2013).



**Figura 1.** *Ipomoea pes-caprae brasiliensis* (L.) R. Br. (FOOTT, 2013).

Uma das características anatômicas mais notáveis das Convolvulaceae é a existência de células que secretam glicosídeos resinados nos tecidos foliares e nas raízes das plantas. Estes constituem um importante marcador quimiotaxonômico desta família e são responsáveis pelas propriedades purgativas de algumas espécies (MEIRA et al., 2012). As resinas glicosídicas são metabólitos anfipáticos, ou seja, sua estrutura contém porções lipofílicas (agliconas) e hidrofílicas (açúcares) (SOUZA FILHO; TREZZI; IOUE, 2011).

### 3.2.1 Flavonoides

Os flavonoides são encontrados em diversas formas estruturais e em diferentes concentrações, dependendo do órgão vegetal em que se encontram (SIMÕES et al., 2004). São compostos de baixo peso molecular, formados pela união de três anéis, onde dois deles são aromáticos e derivados de fenilbenzopironas. Sua estrutura básica consiste em um núcleo flavano constituído de quinze átomos de carbono arranjados em três anéis (C6-C3-C6) (DI CARLO et al., 1999; MUSCHIETTI; MARTINO, 2007), sendo dois anéis fenólicos substituídos e um pirano (cadeia heterocíclica) acoplado ao anel A (Figura 2). Os anéis A e C são hidroxilados e podem conter substituintes metoxílicos (Figura 2) (HERRMANN;

WILLEMS; JANKE, 2001). Além disso, apresentam estruturas básicas de diversos compostos que se diferenciam no grau de oxidação e substituição da cadeia heterocíclica B (MUSCHIETTI; MARTINO, 2007; CORRADINI et al., 2011). As modificações no anel central dessas substâncias levam à diferenciação em subclasses como as flavonas, flavonóis, bioflavonoides, flavanonas, isoflavonas, dihidroflavonol, flavan-3-ol, antocianidinas, proantocianinas e flavanolol (PIETTA, 2000; BEHLING et al., 2004; CORRADINI et al., 2011).

Estruturalmente, os flavonoides pertencem à classe dos heterosídeos. Estes são substâncias que por hidrólise, originam um açúcar e um núcleo fundamental, denominado aglicona, que classifica o glicosídeo como antraquinônico, saponínico, cianogenético, cardioativo, cumarínico ou flavonoide. A porção aglicônica é a determinante da ação farmacológica enquanto o grupamento osídico a modula em relação à intensidade. Podem existir na forma de C-glicosídeo ou O-glicosídeo, na dependência do grupamento na qual a “ose” esteja ligada (CORRADINI, et al., 2011).

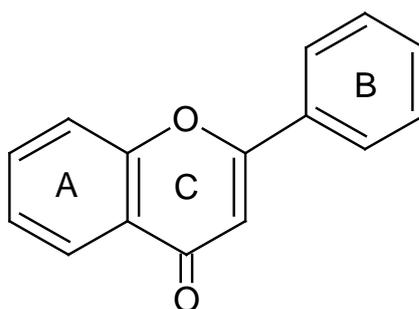
Tal como a maioria dos constituintes das plantas, os flavonoides podem existir tanto como agliconas livres ou como glicosídeos conjugados (CORRADINI et al., 2011). Os flavonoides C-glicosídeos apresentam açúcares com pouca diversificação e estão diretamente ligados ao núcleo aromático por uma ligação carbono-carbono resistente à hidrólise, apenas nas posições 6 e 8 do núcleo. São menos solúveis em acetato de etila do que as agliconas de flavonas e podem permanecer na fase aquosa após hidrólise. Durante a hidrólise ácida, podem sofrer isomerização formando misturas de 8-C-glicosídeos e 6-C-glicosídeos (ZERAİK, 2010).

É fato que os flavonoides, amplamente distribuídos no reino vegetal, têm recebido muita atenção nos últimos anos devido aos vários efeitos benéficos observados. São responsáveis por uma ação antitumoral considerável, podendo agir ainda como antivirais, anti-hemorragicos, anti-inflamatórios, antimicrobianos e antioxidantes. Por causa do efeito antioxidante, eles tornaram-se importantes compostos dietéticos com potencial terapêutico devido à suas propriedades sequestrantes de radicais livres e quelantes de íons metálicos, que por sua vez, protegem os tecidos dos radicais livres e da peroxidação lipídica (NIJVELDT et al., 2001; SIMÕES et al., 2004; CORRADINI et al., 2011).

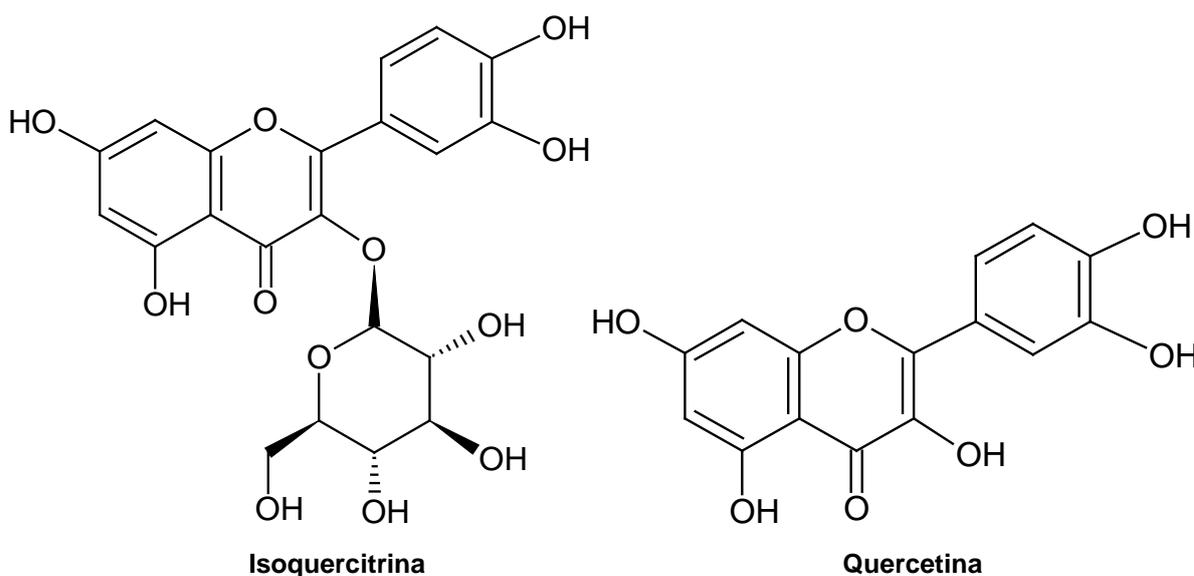
Formica e Regelson (1995) constataram que os flavonoides promovem vasodilatação, inibem a oxidação da LDL, a agregação plaquetária e a atividade da proteína quinase C, influenciando beneficemente na saúde cardiovascular.

Dentre os componentes químicos já isolados das partes aéreas da *I. pes-caprae*, destacam-se os flavonoides quercetina e isoquercitrina (Figura 2) (MEIRA et al., 2012). A isoquercitrina é um flavonoide O-glicosídeo que por hidrólise, origina um açúcar e um núcleo fundamental, denominado aglicona.

Sabe-se que a planta também conhecida como batateira-da-praia no Brasil (SOUZA et al., 2000) antagoniza os efeitos da histamina e inibe a liberação das prostaglandinas, o que sugere a propriedade anti-inflamatória (PONGPRAYOON et al., 1991, 1992). Já Krogh et al. (1999) e De Souza et al. (2000) validaram, a partir de estudos pré-clínicos, a propriedade analgésica *in vivo* da planta.



**Estrutura básica dos flavonoides**



**Figura 2.** Estrutura química dos flavonoides de interesse (HERRMANN; WILLEMS; JANKE, 2001).

Plantas, frutas, grãos e vinhos são exemplos de fontes destes compostos. Geralmente são encontrados nas plantas como derivados glicosilados, contribuindo para o brilho azul, vermelho e laranja nas folhas, flores e frutos (NIJVELDT et al., 2001). Os flavonóis como a quercetina, isoquercitrina, rutina e camferol, por exemplo, são encontrados em frutas cítricas, assim como as flavanonas. As flavonas são encontradas em ervas aromáticas e grãos de cereais como a vitexina, enquanto as isoflavonas ocorrem em legumes e sementes oleaginosas. Antocianidinas e suas formas glicosiladas (antocianinas) são pigmentos naturais encontrados em uvas (PIETTA, 2000).

Relatos e evidências epidemiológicas sugerem que dietas ricas em flavonoides, como a quercetina (3,5,7,3'-4'-pentahidroxi flavona), têm efeitos na prevenção e no tratamento de doenças cardiovasculares, câncer e insuficiências renal e hepática. A quercetina geralmente é encontrada nos alimentos na forma glicosilada. A natureza da glicosilação é conhecida por influenciar a eficiência de sua absorção, pois a conversão da quercetina rutinosídeo em glicosídeo tende a aumentar a sua biodisponibilidade nos alimentos. Estudos revelaram que a mesma pode tornar-se um potente composto antitumoral, por efeitos de regulação do ciclo celular, interação com os locais de ligação do estrogênio tipo II, diminuição da resistência aos medicamentos e consequente indução a apoptose das células tumorais (BEHLING et al., 2004).

Considerados importantes mediadores patogênicos das complicações diabéticas, os produtos finais de glicação avançada (AGEs) são capazes de modificar, irreversivelmente, as propriedades químicas e funcionais das mais diversas estruturas biológicas. Alguns compostos fenólicos como a isoquercitrina e a quercetina demonstraram uma forte atividade inibidora contra a formação de AGEs, a partir de sistemas de modelo *in vitro*. Estes resultados sugerem que isoquercitrina e a quercetina podem ser agentes promissores para o tratamento de doenças associadas a glicação (KIM et al., 2011).

A isoquercitrina mostrou atividade anti-inflamatória significativa frente à bactéria *Porphyromonas gingivalis* através da inibição da produção de prostaglandina E2 (PGE2). Células epiteliais de gengiva humana foram estimuladas com um patógeno que gera inflamação e destruição do tecido periodontal, desencadeando uma série de respostas celulares inflamatórias, incluindo a produção de PGE2 (INABA et al., 2008).

Em um recente estudo, pesquisadores evidenciaram que a isoquercitrina pode ser um potente agente terapêutico para a obesidade e suas doenças associadas. Foi demonstrado que a via Wnt/ $\beta$ -catenina está intimamente associada com a obesidade e que as moléculas pequenas que regulam esta via podem, potencialmente, controlar a adipogênese relacionada com a obesidade. Foi verificado que a isoquercitrina suprimiu a diferenciação de células 3T3-L1 que regulam a via Wnt/ $\beta$ -catenina (LEE et al., 2011).

### 3.2.2 Estudos fitoquímicos, farmacológicos e tecnológicos

Segundo a RDC nº 14 de 31 de março de 2010 (BRASIL, 2010a), o marcador químico é o componente ou a classe de compostos químicos (alcaloides, flavonoides, ácidos graxos, etc.) presente na matéria-prima vegetal, idealmente o próprio princípio ativo e preferencialmente que tenha correlação com o efeito terapêutico, o qual é utilizado como referência no controle de qualidade da matéria-prima vegetal e dos medicamentos fitoterápicos.

A *I. pes-caprae* mostrou ser clinicamente eficaz (creme com 1% de extrato da planta, utilizando-se éter de petróleo como solvente) para tratar dermatites causadas por águas-vivas, neutralizando as atividades tóxicas de venenos de medusa que consistem principalmente de polipeptídeos e enzimas (colagenases, proteases, elastases e nucleases), que exercem diversas ações tóxicas, incluindo dermatonecroses, hemólise e lise mitocondrial (PONGPRAYOON; BOHLIN; WASUWAT, 1991).

Foi descrita a ação antinociceptiva do extrato metanólico e das frações de acetato de etila e aquosa obtidas a partir das partes aéreas de *I. pes caprae* em diferentes modelos experimentais de dor em camundongos. Os resultados indicaram que os extratos testados apresentaram efeito antinociceptivo contra as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético (33,8 mg/kg, i.p.) e também no modelo de formalina (37,7 e 12,5 mg/kg, i.p.). Tal efeito parece estar relacionado com a presença de flavonoides, os quais demonstraram pronunciada ação antinociceptiva (DE SOUZA et al., 2000).

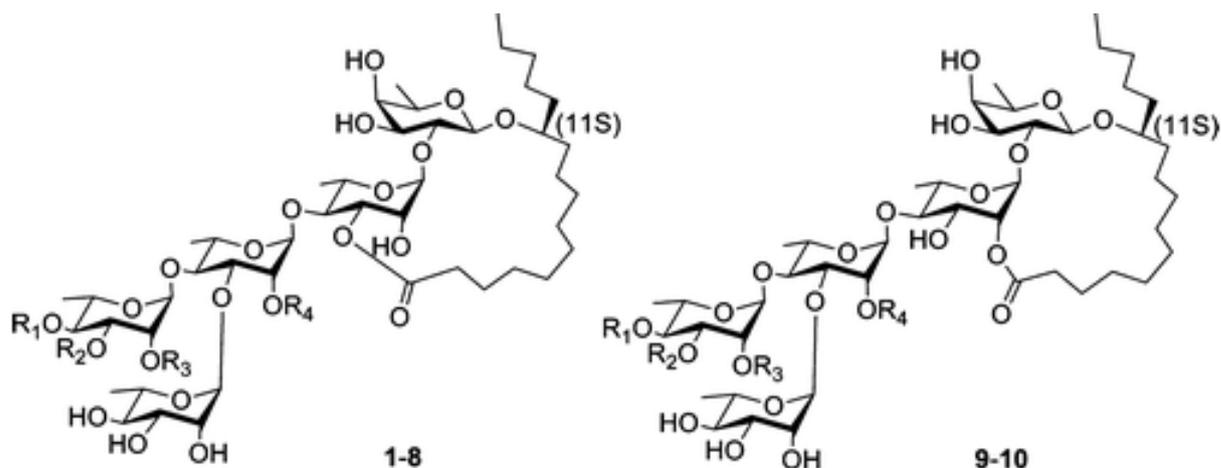
Estudos com o extrato bruto metanólico da planta apresentaram atividade farmacológica, com aumento significativo no total de células da medula óssea demonstrando efeitos estimulantes sobre a hematopoiese (BREMER, 2005). Outras

propriedades incluem a atividade inibidora da agregação plaquetária e a atividade estimulante para a liberação de serotonina (ROGERS; GRICE; GRIFFITHS, 2000).

Krogh et al. (1999) identificaram várias classes de compostos com propriedades bioativas da espécie *I. pes-caprae*. Das partes aéreas frescas, extraídas inicialmente com metanol, foram isolados os terpenos estigmasteno, sitosterol, glochidona, acetato de  $\alpha$ -amirina, acetato de  $\beta$ -amirina,  $\alpha$ -amirina,  $\beta$ -amirina, 2-hidroxi-4,6-dimetoxi acetofenona, 2,4-dihidroxi-6-metoxi acetofenona e ácido betunílico. Da fração acetato de etila, que apresentou maior rendimento, foram isolados os compostos fenólicos, isoquercitrina, quercetina e ácido salicílico.

Na mesma linha de pesquisa, foi demonstrado que o extrato metanólico da planta exibe efeito espasmolítico em preparações de músculo liso (EMENDORFER et al., 2005). Já no extrato hexano das partes aéreas analisado por CLAE foram evidenciados seis glicosídeos lipofílicos caracterizados como fracamente citotóxicos para uma pequena parcela de linhagem de células cancerosas. Dentre eles, novos pentassacarídeos do ácido jalapινόico, pescaprósideo A, pescapreínas I-IV e a estoloniferina III. A saponificação da mistura glicosídica da resina bruta resultou na identificação do ácido simônico B assim como o correspondente ácido glicosídico, enquanto os resíduos esterificados dos oligossacarídeos foram identificados como cinco ácidos graxos: 2-metilpropanóico, (2S)-metilbutírico, *n*-hexanóico, *n*-dodecanóico e *n*-dodecanóico (PEREDA-MIRANDA; ESCALANTE-SÁNCHEZ; ESCOBEDO-MARTÍNEZ, 2005).

Investigações prévias revelaram uma série de glicosídeos resinados chamados de pescapreínas I-IX, estoloniferinas III e pescapreínas X-XX, a partir desta espécie (PEREDA-MIRANDA; ESCALANTE-SÁNCHEZ; ESCOBEDO-MARTÍNEZ, 2005; ESCOBEDO-MARTÍNEZ; PEREDA-MIRANDA, 2007; TAO et al., 2008; ESCOBEDO-MARTÍNEZ et al., 2010). A partir das partes aéreas da *I. pes-caprae* foram isolados mais 10 glicosídeos resinados conhecidos como pescapreínas XXI-XXX (Figura 3). Estes novos compostos apresentam um núcleo pentassacárido, esterificado com diferentes ácidos orgânicos e lactonizado pelo ácido jalapινόico, formando uma macrociclolactona (Yu et al., 2011).



**Figura 3.** Pescapreínas XXI-XXX (Yu et al., 2011).

Teramachi et al. (2005) isolaram outros dois novos ésteres do ácido quínico e taninos derivados do ácido cafeico, a partir do extrato metanólico obtido de suas folhas. O extrato foi submetido a partições com vários solventes e a fração acetato de etila apresentou maior atividade inibitória da colagenase. A fração foi purificada e dois novos ésteres do ácido quínico foram identificados, além de outros taninos já conhecidos derivados do ácido cafeico. Os compostos ativos demonstraram quase nenhuma citotoxicidade (índice de citotoxicidade,  $IC_{50}$ ,  $>35 \mu\text{m/mL}$ ).

Garrec et al. (2005) comprovaram que as substâncias presentes na raiz da *I. pes-caprae* são capazes de prevenir e/ou neutralizar a toxicidade *in vitro* produzido por toxinas ativadoras de canal de sódio como a ciguatoxina, brevetoxina e a veratridina.

Escobedo-Martinez e Pereda-Miranda (2007) demonstraram que a resina glicosídica presente nas raízes das Convolvulaceae é responsável pela propriedade purgativa, assim como o extrato bruto (utilizando-se hexano como solvente) é eficaz na neutralização de dermatites causadas por veneno de águas-vivas.

Tao et al. (2008) identificaram oito novos glicosídeos lipofílicos, as pescapreínas X-XVII, que foram isoladas a partir do extrato etanólico da planta. Os compostos foram analisados quanto a sua citotoxicidade, atividade bactericida e fungicida e os efeitos sobre o receptor  $\mu$ -opióide. Os resultados não evidenciaram atividade citotóxica e antimicrobiana.

A partir de diversas técnicas por espectroscopia de massas e CLAE, Escobedo-Martinez et al. (2010) caracterizaram a xilose, proveniente da resina

glicosídica da *I. pes-caprae*, como um inibidor da resistência de *Staphylococcus aureus*.

Meira e colaboradores (2012) relata um grande número de compostos isolados desta planta tais como: nortropano, alcaloides, compostos fenólicos, triterpenos, glicolipídeos, lignanas, norisoprenoides, diterpenos, isocumarinas e benzenóides.

A família Convolvulaceae continuou sendo o foco na pesquisa de produtos naturais principalmente devido a presença dos glicosídeos lipofílicos. Yu et al. (2011) também afirmaram que o gênero *Ipomoea* é uma rica fonte de tetra e pentassacarídeos lipofílicos, alguns dos quais com características antifúngicas, antibacterianas e citotóxicas. Desta forma, as pescapreínas I-IV e XXI-XXX, juntamente com as estoliferinas III foram isoladas a partir das partes aéreas da *I. pes-caprae*. As pescapreínas XXI-XXX foram avaliadas quanto ao seu potencial para modular a resistência de múltiplos fármacos utilizados no tratamento do câncer de mama e concluíram que o uso combinado destes compostos a uma concentração de 5 µg/mL aumentam a citotoxicidade da doxorubicina de 1,5 a 3,7 vezes.

Com o propósito de caracterizar a planta como matéria-prima farmacêutica, foram desenvolvidos protocolos para o seu tratamento prévio e controle de qualidade (BARNI; CECHINEL FILHO; COUTO, 2009). Os autores incluíram nos protocolos, os ensaios de perda por dessecação, teor de extrativos, cinzas totais, cinzas ácidas insolúveis, cinzas sulfatadas, teor de flavonoides totais (TFT) e cromatografia em camada delgada (CCD). Foi constatado que o teor de extrativos e flavonoides totais foi maior nas folhas do que nos caules e a isoquercitrina foi evidenciada em todas as soluções hidroetanólicas a 5% obtidas com aquecimento sob refluxo.

Com o intuito de aperfeiçoar as condições do processo de extração por maceração, Vieira et al. (2012) avaliaram a influência do tempo de extração e da proporção planta/solvente sobre as características físico-químicas das soluções extrativas. Concluiu-se que a relação planta/solvente foi o fator que mais exerceu influência sobre o teor de flavonoides totais (TFT) e o resíduo seco (RS). Foi avaliada a atividade antinociceptiva e anti-inflamatória deste extrato na dose 5-20 mg/kg, i.p., em camundongos, sendo capaz de inibir 50% das contorções abdominais a 20 mg/kg com 55,8% ± 2,4 de inibição máxima. Estes resultados definiram a melhor condição de extração por maceração.

Soares et al. (2008) desenvolveram um método para avaliação do perfil cromatográfico por CLAE dos compostos fenólicos para analisar as soluções extrativas e o extrato seco obtido por *spray dryer*. Foi empregada coluna de fase reversa tipo C18 (5 µm, 25 cm x 4,60 mm), com detecção em 254 nm e 338 nm e obtida a separação de 22 picos de vários componentes, incluindo a isoquercitrina, como potencial marcador para o extrato. Entretanto, uma das principais dificuldades de análise era relativa à pressão que se elevava, no decorrer das corridas, indicando saturação da coluna, causando frequentes interrupções na rotina, para limpeza do sistema.

Com o propósito de garantir a qualidade das partes aéreas da *I. pes-caprae* e a influência dos processos extrativos de decocção, infusão, maceração e turboextração, bem como a secagem por *spray dryer* sobre a carga microbiana das preparações extrativas, propôs-se a realização do controle de qualidade microbiológico das preparações de origem vegetal (BAHR; COUTO; VITORINO, 2008). Todos os produtos foram aprovados de acordo com os critérios estabelecidos pela OMS (WHO, 2005b), verificando-se a redução significativa da carga microbiana ao final de todos os processos extrativos. Deve-se ressaltar que a carga microbiana elevada pode comprometer a estabilidade do produto e conseqüentemente, haver perda da eficácia terapêutica, por degradação do princípio ativo ou por alteração do parâmetro físico fundamental para a sua atividade, como o pH (PINTO; KANEKO; OHARA, 2000; ANDRADE et al., 2005).

Adriano (2009) empregou o extrato seco por *spray dryer* (ES) das partes aéreas da *I. pes-caprae* no desenvolvimento de géis contendo diferentes tipos de polímeros em duas concentrações (Cellosize QP 100<sup>®</sup>, Carbopol ultrex<sup>®</sup> ou Amigel<sup>®</sup> a 1 e 2% ou Aristoflex AVC<sup>®</sup> a 2,5 e 5%) e duas concentrações de ESD (0,11 e 0,18%). Os géis foram submetidos ao estudo de estabilidade preliminar e estudo de estabilidade acelerado em temperatura ambiente (25 °C ± 2 °C), geladeira (5 °C ± 2 °C) e estufa (40 °C ± 2 °C). Os resultados apontaram para a necessidade de conhecer melhor a estabilidade dos produtos intermediários, definir melhor a dose do extrato no fitoterápico e selecionar uma base mais apropriada para veicular o extrato.

Quanto à metodologia analítica por CLAE desenvolvida por Soares (2008) e posteriormente adaptada por Adriano (2009), o método foi aplicado na análise da SE e do ES, para a quantificação da isoquercitrina e análise do perfil cromatográfico. A

metodologia de quantificação da isoquercitrina foi validada pelos parâmetros de linearidade, precisão e exatidão para a isoquercitrina a partir do produto seco. O perfil cromatográfico da SE foi semelhante ao do ES quanto ao número de picos, mas diferiu na relação entre as áreas. O teor de isoquercitrina foi inferior no ES em relação à SE, além do que, o gel de Cellosize QP 100<sup>®</sup>, mantido em geladeira, foi o que propiciou maior facilidade de extração (empregado extração líquido-líquido com metanol e cloreto de sódio), porém foi detectada apenas 75% da quantidade esperada de isoquercitrina.

### **3.3 Controle de qualidade de fitoterápicos**

Com o intuito de diminuir a resistência da prescrição de fitoterápicos e de aumentar a possibilidade de adesão da população ao tratamento, é de extrema importância, não só o controle de qualidade desde o cultivo da droga vegetal até o produto final, mas também o estudo fitoquímico, farmacológico e toxicológico das plantas (SOUZA-MOREIRA; SALGADO; PIETRO, 2010). O controle de qualidade refere-se à execução das análises especificadas para cada produto, sendo parte fundamental para a garantia das boas práticas de fabricação (SILVA; COUTO; BRESOLIN, 2012).

Métodos de controle de qualidade de drogas vegetais já validados estão presentes em monografias da OMS assim como nas farmacopéias, como a Farmacopéia dos Estados Unidos, a Farmacopéia Chinesa, a Japonesa e a Farmacopéia Brasileira. Esta última inclui desenhos macro e microscópicos, dados botânicos, entre outras especificações de mais de 44 plantas medicinais utilizadas no país (SOUZA-MOREIRA; SALGADO; PIETRO, 2010).

No Brasil, em 2010, foi aprovada a Resolução nº 14, que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e, entre outros pontos, abrange as etapas de controle de qualidade da droga vegetal, do produto acabado e da importação de produtos fitoterápicos (BRASIL, 2010a). Em 1998, a Organização Mundial da Saúde reuniu procedimentos no documento “*Quality control methods for medicinal plant materials*”, que podem ser tomados como base para que auxiliem as nações, a partir de sua legislação, a formar padrões de controle de qualidade de drogas vegetais e produtos (WHO, 1998). Em 2005, houve uma revisão do guia com adequação para a detecção e quantificação de alguns contaminantes e resíduos em plantas medicinais

(WHO, 2005a). A quinta edição da Farmacopéia Brasileira (2010), junto com outras literaturas não oficiais, como o livro organizado por Simões et al. (2004), contêm parâmetros semelhantes aos da OMS para verificação da identidade e controle de qualidade de drogas vegetais. O Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006, sobre a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, tem como algumas de suas diretrizes garantir e promover a segurança, a eficácia e a qualidade no acesso a plantas medicinais e fitoterápicos; promover e reconhecer as práticas populares de uso de plantas medicinais e remédios caseiros e promover a adoção de boas práticas de cultivo, manipulação de plantas medicinais e produção de fitoterápicos, a partir de uma legislação específica.

Quando as monografias não estão disponíveis nas farmacopéias, o desenvolvimento e validação de métodos analíticos devem ser realizados e envolve desde a caracterização do produto até a determinação das especificações (SILVA; COUTO; BRESOLIN, 2012).

O desenvolvimento de um método analítico, a ser utilizado no estudo de materiais vegetais, inclui alguns desafios como a extração dos constituintes, principalmente compostos ativos a partir de uma matriz complexa; a estabilidade térmica e sob luz; a falta de substâncias de referência; variações da composição química entre lotes coletados, localidade e época do ano (BLANK et al., 2007).

Muitas contribuições relacionadas com a atividade, eficácia e toxicidade de plantas medicinais são, ano após ano, publicadas, mas a identidade e qualidade das drogas vegetais e seus derivados não têm sido demonstradas. Portanto, a significância desses estudos e sua reprodutibilidade ainda são limitadas, se for considerada a quantidade de plantas existentes no planeta, sendo a maioria desconhecida sob o ponto de vista científico. Dentre aproximadamente 500 mil espécies, somente 5% são estudadas fitoquimicamente e uma porcentagem menor ainda, avaliada sob os aspectos biológicos (VILEGAS; CARDOSO; QUEVEDO, 2009).

A validação de metodologias analíticas é uma etapa crucial para qualquer método desenvolvido ou em aplicação e tem recebido considerável destaque na literatura. No que diz respeito à validação de metodologias, a legislação tem algumas nuances e diferentes interpretações. Parte desta característica é intencional, pois permite adaptação a cada tipo de problema. A legislação brasileira tem se aprimorado nos últimos anos e define o processo de validação como um ato

documentado que atesta que qualquer procedimento, processo, equipamento, material, operação ou sistema realmente conduza aos resultados esperados. Desta forma, a validação assegura credibilidade para que um processo específico resulte em um produto com as especificações pré-determinadas e mantenha os atributos de qualidade definidos. Este conceito está baseado nas resoluções e recomendações do INMETRO e ANVISA e inspiradas em diretrizes da ICH (INTERNATIONAL..., 1996a; 2005).

A validação é necessária quando a metodologia analítica empregada não é oficial (não normalizada), quando os métodos oficiais são utilizados fora do escopo ou são ampliações e modificações de tais métodos, ou ainda se os métodos são desenvolvidos no próprio laboratório (BRASIL, 2003; INMETRO 2010; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2012).

Para o registro de novos produtos, todos os órgãos reguladores do Brasil e de outros países exigem a validação de metodologia analítica e, para isso, a maioria deles têm estabelecido documentos oficiais que são diretrizes a serem adotadas neste processo. Tem-se como exemplos destes guias descritos por *US Food and Drug Administration (FDA)*, *United States Pharmacopeia (USP)*, *European Medicines Agency (EMA)*, *World Health Organization (WHO)*, *International Conference on Harmonization (ICH)* e pela ANVISA, no Brasil. A confiabilidade dos resultados, obtido através de um processo de validação bem definido e documentado oferece às exigências reguladoras evidências de que o procedimento conduz efetivamente ao uso pretendido (VILEGAS; CARDOSO; QUEVEDO, 2009).

Em 1996, a ICH em seus documentos Q2A e Q2B, estabeleceram os critérios para validação de métodos analíticos. Em 2005, a ICH revisou e atualizou suas normas publicando a Q2 (R1) (INTERNATIONAL..., 2005). Ainda no que se refere à validação analítica, em 2005 foi publicada a segunda revisão do *Working Document QAS/03.055*, que traz em seu anexo 4 os critérios para validação de métodos analíticos (WHO, 2005a).

No Brasil, o crescente aumento do interesse neste assunto culminou com a publicação da Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003, pela ANVISA, baseada nos documentos publicados pelo ICH, que descreve os parâmetros a serem avaliados para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos para a determinação de fármacos e suas impurezas, podendo ser aplicado a métodos imunológicos e microbiológicos (BRASIL, 2003). Em 2010, o INMETRO publicou a

terceira revisão de um documento de caráter orientativo, também sobre validação de métodos analíticos com o propósito de auxiliar os laboratórios a demonstrar que um método analítico, nas condições em que é praticado, tenha as características necessárias para a obtenção de resultados com a qualidade exigida (INMETRO, 2010). Em 2012, a RDC nº 27, de 17 de maio de 2012 que dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos revogou a seção “Métodos Bioanalíticos” do anexo da RE nº 899, de 29 de maio de 2003.

Em métodos cromatográficos, que propiciam uma separação entre os diferentes componentes de uma amostra, deve-se tomar as precauções necessárias para garantir a separação adequada entre os picos, bem como analisar a pureza do pico com o auxílio de detector de arranjo de fotodiodos ou o uso de espectrometria de massa, assim como analisar o uso de colunas e composição de fase móvel diferentes (SINGH; BAKSHI, 2000; VILEGAS; CARDOSO, QUEVEDO, 2009; INMETRO, 2010).

Primeiramente, no planejamento e execução da validação, é interessante que sejam definidas a aplicação, o objetivo e o escopo do método, além dos parâmetros de validação e critérios de aceitação. Antes de ser realizada a validação propriamente dita, é necessário avaliar alguns itens com elevado potencial em afetar os ensaios na validação (SHABIR, 2003; INMETRO, 2010).

A qualificação do equipamento analítico deve ser realizada rotineiramente para garantir que o sistema cromatográfico esteja apto a realizar a validação da metodologia. A estabilidade das soluções analíticas (soluções da amostra, padrões, reagentes e fase móvel) deve ser determinada antes de iniciar a validação, pois gera resultados confiáveis e reproduzíveis. A adequação do sistema garante que tanto o equipamento quanto o método validado estão de acordo com os seus requisitos (INMETRO, 2010). Os parâmetros e os limites recomendáveis para a adequação do sistema estão apresentados no Quadro 1.

**Quadro 1.** Parâmetros de adequação do sistema e recomendações.

<b>Parâmetro</b>	<b>Recomendações</b>
Fator de Retenção ( $k'$ )	O pico deve ser bem resolvido com relação a outros picos, geralmente $k' > 2$
Repetibilidade	DPR $\leq 1\%$ para número de amostras $\geq 5$ DPR $\leq 2\%$ para número de amostras $\geq 6^*$
Resolução ( $R_s$ )	$R_s > 2$ entre os picos de interesse
Fator de Cauda (T)	$T \leq 2$
Pratos Teóricos (N)	Em geral, deve ser maior que 2000

Fonte: FDA, 1994; \*UNITED STATES PHARMACOPEIA (2012).

As análises e resultados devem ser documentados e registrados, planejando-se a validação através da definição do tipo de categoria do teste a ser realizado e em seguida, os ensaios necessários segundo a finalidade de cada método. Os testes são classificados em 4 categorias (Quadro 2) e para cada categoria é exigida a comprovação de um conjunto de parâmetros de validação (Quadro 3) (BRASIL, 2003). No caso de drogas vegetais, derivados vegetais e fitoterápicos, os testes de doseamento de marcadores podem ser enquadrados na categoria I, embora, devido à pequena quantidade dos mesmos no material vegetal, poderiam estar enquadrados na categoria II, em testes quantitativos.

**Quadro 2.** Classificação dos testes passíveis de validação segundo a sua finalidade.

<b>Categoria</b>	<b>Finalidade do teste</b>
<b>I</b>	Testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas
<b>II</b>	Testes quantitativos ou ensaio limite para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias-primas. Incluem ensaios quantitativos e ensaios-limite
<b>III</b>	Testes de performance (por exemplo: dissolução, liberação do ativo)
<b>IV</b>	Testes de identificação

Fonte: BRASIL, 2003; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2012.

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

Parâmetro	Categoria I	Categoria II		Categoria III	Categoria IV
<b>Especificidade</b>	Sim	<b>Quantitativo</b>	<b>Ensaio limite</b>	*	Sim
		Sim	Sim		
<b>Linearidade</b>	Sim	Sim	Não	*	Não
<b>Intervalo</b>	Sim	Sim	*	*	Não
<b>Precisão Repetibilidade</b>	Sim	Sim	Não	Sim	Não
<b>Intermediária</b>	**	**	Não	**	Não
<b>Limite de detecção</b>	Não	Não	Sim	*	Não
<b>Limite de quantificação</b>	Não	Sim	Não	*	Não
<b>Exatidão</b>	Sim	Sim	*	*	Não
<b>Robustez</b>	Sim	Sim	Sim	Não	Não

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

\*\* se houver comprovação da reprodutibilidade não é necessária a comprovação da Precisão Intermediária.

Fonte: BRASIL, 2003; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2012.

### 3.3.1 Especificidade/Seletividade

É importante ressaltar que os termos especificidade e seletividade são frequentemente utilizados indistintamente ou com diferentes interpretações. Como exemplo, a RE nº 899, de 29 de maio de 2003 cita que a seletividade e especificidade do método referem-se à capacidade de distinguir o analito de interesse na presença de outros componentes ou interferentes como outro ingrediente ativo, excipientes, impurezas e produtos de degradação, bem como compostos de propriedades similares que possam estar presentes na matriz da amostra. A distinção dos parâmetros em questão se dá através da quali ou quantificação das amostras. Em análises quantitativas e de impurezas, a comparação dos resultados obtidos de amostras contaminadas com quantidades apropriadas de impurezas ou excipientes e amostras não contaminadas, especifica o método, pois demonstra que o resultado do teste não é afetado por esses materiais. Em análises qualitativas, a seletividade do método é determinada através da comparação entre compostos com estruturas relacionadas que podem estar presentes (SINGH; BAKSHI, 2000; BRASIL, 2003; INMETRO, 2010).

Na indisponibilidade de padrões de impurezas, este teste pode incluir amostras armazenadas sob condições de estresse (radiação, calor, fotólise, umidade, condições que favoreçam a hidrólise ácida/básica/neutra ou oxidação do(s) analito(s) de interesse) e, se o método for capaz de separar o analito das impurezas e produtos de degradação, este é chamado de método indicador de estabilidade (INTERNATIONAL..., 2000; TONHI, 2011).

A seletividade de um método relaciona-se com sua capacidade indicativa da estabilidade do produto ou fármaco e seu emprego é fundamental na indústria farmacêutica. Desta forma, no Brasil, a RE nº 1, de 29 de julho de 2005 publicou o Guia para a Realização de Estudos de Estabilidade, pressupondo o emprego de metodologias analíticas indicativas de estabilidade.

Em diversas técnicas cromatográficas, além das comparações visuais de cromatogramas, diferentes parâmetros como resolução, número de pratos teóricos e os fatores de separação, capacidade e simetria, devem ser calculados a fim de determinar a seletividade do método (INMETRO, 2003). Esta última, remete-se ao evento da detecção. Um método que produz resposta apenas para um analito é chamado específico. Um método seletivo produz respostas para vários analitos, no entanto, distingue as diferentes respostas provenientes de cada analito (INMETRO, 2003). A determinação destes parâmetros é o primeiro passo no desenvolvimento e validação de um método instrumental de separação e deve ser reavaliada continuamente (HARRIS, 2008).

### **3.3.2 Linearidade**

A linearidade compreende a correlação entre a resposta do método e a concentração ou quantidade de analito, cujo comportamento deve ser descrito por uma equação linear. É citada como a habilidade do método analítico de produzir resultados que são diretamente, ou por uma transformação matemática bem definida, proporcionais à concentração do analito dentro de uma faixa especificada (HUBER, 2001; BRASIL, 2003; INTERNATIONAL..., 2005; INMETRO, 2010). Recomenda-se que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, cinco concentrações diferentes (HUBER, 2001; BRASIL, 2003, INTERNATIONAL..., 2005) em replicatas ( $n > 2$ ), de 0,5 a 1,5 vezes a concentração esperada do analito (HARRIS, 2008). Já a RE nº 899 (BRASIL, 2003) estabelece limites percentuais do

teor do analito que devem estar contidos no intervalo de linearidade para alguns métodos analíticos de acordo com o Quadro 4.

A linearidade possui como resultado uma curva analítica em função da concentração do analito. Seus coeficientes são calculados a partir da equação da regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados (INMETRO, 2010). A partir da regressão linear obtêm-se os coeficientes angular ( $a$ ) e linear ( $b$ ), e também é possível calcular, a partir dos pontos experimentais, o coeficiente de correlação ( $r$ ) ou de determinação ( $r^2$ ). Estes últimos permitem uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e a incerteza dos coeficientes de regressão estimados (HUBER, 2001; BRASIL, 2003, INTERNATIONAL..., 2005). Segundo a norma da ANVISA o  $r^2$  deve ser no mínimo igual a 0,99 para métodos analíticos e 0,90 para métodos bioanalíticos (BRASIL, 2003), 0,90 (INMETRO, 2003); ou ainda 0,999 (GREEN, 1996; SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997; HARRIS, 2008). Tais valores correspondem a um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão na maioria dos casos (HARRIS, 2008). Outro critério para testar a linearidade do método, é que o valor de  $b$  deve estar próximo de zero (HUBER, 2001; HARRIS, 2008) e, caso haja um valor significativamente diferente de zero, deve ser demonstrado que não há nenhum efeito sobre a precisão do método (HUBER, 2001).

O coeficiente de correlação linear ( $r$ ) é frequentemente utilizado para indicar o quanto a reta pode ser considerada adequada para fazer estimativas. Uma alternativa para avaliar a linearidade é a realização da análise de variância (ANOVA) na regressão. Alguns procedimentos analíticos não demonstram linearidade mesmo após qualquer transformação. Nesses casos, a resposta analítica pode ser descrita por uma função que modela a concentração do analito na amostra (INMETRO, 2010).

Outro fator importante é o cálculo do teste F de significância da regressão linear, sendo que, o valor do  $F_{\text{crítico}}$  deve ser menor que o de  $F_{\text{calculado}}$ , o que indica a significância da regressão. Já a análise do gráfico dos resíduos permite detectar problemas no ajuste da curva como, por exemplo, desvios de linearidade, sendo utilizada para investigar a adequabilidade de um modelo de regressão linear, onde as suposições do modelo ajustado precisam ser validadas para que os resultados sejam confiáveis (RIBEIRO et al., 2008).

### 3.3.3 Intervalo ou faixa de trabalho

A concentração mais esperada da amostra (concentração teste ou alvo) deve, sempre que possível, se situar no centro da faixa de trabalho (INMETRO, 2010). O intervalo é a faixa entre os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico. Deriva-se do estudo da linearidade e depende da aplicação pretendida do método (BRASIL, 2003; INTERNATIONAL..., 2005) (Quadro 4). A faixa é o intervalo de concentrações no qual a linearidade, a exatidão e a precisão são aceitáveis (HUBER, 2001; BRASIL, 2003; INTERNATIONAL..., 2005; HARRIS, 2008). Um exemplo é o intervalo de concentração de um componente principal de uma mistura onde o  $r^2 \geq 0,995$  (medida de linearidade), a identificação da contaminação proposital seja  $100 \pm 2\%$  (medida de exatidão), e a precisão interlaboratorial é de  $\pm 3\%$  (HARRIS, 2008).

**Quadro 4.** Limites percentuais do teor do analito que devem estar contidos no intervalo de linearidade para alguns métodos analíticos.

Ensaio	Alcance
Determinação quantitativa do analito em matérias-primas ou em formas farmacêuticas	De 80% a 120% da concentração teórica do teste
Determinação de impurezas	Do nível de impureza esperado até 120% do limite máximo especificado. Quando apresentarem importância toxicológica ou efeitos farmacológicos inesperados, os limites de quantificação e detecção devem ser adequados às quantidades de impurezas a serem controladas
Uniformidade de conteúdo	De 70 %GL a 130% da concentração teórica do teste
Ensaio de dissolução	De $\pm 20\%$ sobre o valor especificado para o intervalo. Caso a especificação para a dissolução envolva mais que um tempo, o alcance do método deve incluir - 20% sobre o menor valor e + 20% sobre o maior valor

Fonte: BRASIL, 2003; INTERNATIONAL..., 2005.

Os valores obtidos têm que estar linearmente correlacionados às concentrações. Isto requer que os valores medidos próximos ao limite inferior da faixa de concentração possam ser distinguidos dos brancos dos métodos. Esse limite inferior deve ser igual ou maior do que o limite de detecção do método. As

etapas de diluição e concentração devem ser praticadas sem o risco de introduzir erros sistemáticos. A variância dos valores informados deve ser independente da concentração. Esta independência deve ser verificada por um teste estatístico para a linearidade e, em geral, serão necessários vários pontos de calibração, de preferência mais que seis, para determinar a faixa de trabalho. No limite superior, os fatores limitantes dependem do sistema de resposta do equipamento de medição (INMETRO, 2010).

### **3.3.4 Exatidão**

Refere-se ao grau de concordância entre o valor médio obtido de uma série de resultados e o valor de referência aceito (BRASIL, 2003; INMETRO, 2003).

Huber (2001) e Harris (2008) definem a exatidão como a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. É expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente. Existem várias metodologias para a sua determinação, dependendo do que o método se propõe a analisar, como para o fármaco ou para a forma farmacêutica e/ou impurezas (BRASIL, 2003, INTERNATIONAL..., 2005).

Os processos normalmente utilizados para avaliar a exatidão de um método são, entre outros, o uso de materiais de referência, participação em comparações interlaboratoriais e a realização de ensaios de recuperação (INMETRO, 2010).

A exatidão do método deve ser realizada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da especificidade do mesmo, sendo verificada a partir de, no mínimo, nove determinações contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja, três concentrações (baixa, média e alta) com três réplicas cada (BRASIL, 2003; INTERNATIONAL..., 2005).

De acordo com Huber (2001), os resultados devem estar dentro da faixa de recuperação de 97-103% estabelecida como aceitável para os níveis de concentrações da amostra. Já Green, 1996 e Harris, 2008 citam que um exemplo de especificação para a exatidão é que a análise identificará  $100 \pm 2\%$  do valor da contaminação proposital do constituinte principal.

### 3.3.5 Precisão

É a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Pode ser demonstrada através do desvio padrão (s), desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%), conforme a Equação 1 (INMETRO, 2010), onde DP = desvio-padrão e CMD = concentração média determinada.

$$CV \% = DPR = \frac{s}{CMD} \times 100 \quad \text{Eq. 1}$$

O valor do DPR não deve ser superior a 5% para metodologias analíticas e 15% para bioanalíticas (BRASIL, 2003). É considerada em três níveis:

- Repetibilidade ou precisão intrínseca do ensaio: concordância entre os resultados de um curto período de tempo com o mesmo analista e a mesma instrumentação. Cada análise é independente, de modo que a precisão intrínseca do ensaio revela o quão reprodutível o método pode ser. A repetibilidade do método é verificada por, no mínimo, nove determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, três concentrações (baixa, média e alta) com três réplicas cada uma ou um mínimo de seis determinações a 100% da concentração teste ou alvo (BRASIL, 2003; INTERNATIONAL..., 2005; HARRIS, 2008).
- Precisão Intermediária: concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias, com analistas e/ou equipamentos diferentes (INMETRO, 2010). Para a determinação da precisão intermediária é recomendado um mínimo de dois dias diferentes, com analistas diferentes (BRASIL, 2003; HARRIS, 2008).
- Reprodutibilidade ou precisão interlaboratorial: concordância entre os resultados obtidos em laboratórios e por analistas diferentes como em estudos colaborativos, geralmente aplicados à padronização de metodologia analítica, por exemplo, para inclusão de metodologia em farmacopéias (BRASIL, 2003; INTERNATIONAL..., 2005; HARRIS, 2008). Embora a reprodutibilidade não seja um componente de validação de método executado por um único laboratório, é considerada importante quando

busca-se a verificação do desempenho dos seus métodos em relação aos dados de validação obtidos através de comparação interlaboratorial. Estes dados não precisam ser apresentados para a concessão de registro (INMETRO, 2010).

### **3.3.6 Robustez**

É a capacidade de um método analítico não ser afetado por pequenas variações, deliberadamente feitas, nos parâmetros de operação (BRASIL, 2003; INTERNATIONAL..., 2005; HARRIS, 2008; INMETRO, 2010). A robustez indica confiabilidade do método durante seu uso normal e deve ser investigada na etapa de desenvolvimento. Para tanto, avalia-se os parâmetros, simultaneamente, aplicando técnica estatística de planejamento de experimento. Com os dados obtidos dos efeitos destes parâmetros nos resultados, pode-se delimitar a faixa aceitável de valores a ser incluída no método final (HUBER, 2001; BRASIL, 2003).

Constatando-se a susceptibilidade do método às variações nas condições analíticas, estas deverão ser controladas e precauções devem ser incluídas no procedimento (BRASIL, 2003). No caso de análises realizadas por CLAE, alguns dos itens avaliados são a variação do pH da fase móvel, variação da composição da fase móvel, variação da temperatura, do fluxo, temperatura da coluna, volume de injeção, variação dos fabricantes de equipamentos e colunas cromatográficas (HUBER, 2001; BRASIL, 2003; HARRIS, 2008). A obtenção de dados sobre esses efeitos permitirá julgar se um método precisa ser revalidado quando um ou mais parâmetros são alterados (HUBER, 2001).

Convém salientar que quanto maior for a robustez de um método, maior será a confiança desse relacionamento à sua precisão (INMETRO, 2010).

### **3.3.7 Limites de Detecção e Quantificação**

O limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. É um parâmetro determinado, principalmente, para ensaios quantitativos de impurezas, produtos de degradação em fármacos e em formas farmacêuticas e é expresso como concentração do analito

na amostra. É estabelecido por meio da análise de soluções contendo concentrações decrescentes do fármaco até o menor nível determinável com precisão e exatidão aceitáveis (BRASIL, 2003). Em métodos que apresentam ruído em sua linha base (por exemplo, a CLAE), o LQ pode ser calculado como a concentração que proporciona um sinal dez vezes maior que a variação do ruído (proporção 10:1) (BRASIL, 2003; INTERNATIONAL..., 2005). Pode ser estimado através da Equação 2 (BRASIL, 2003), onde ( $s$ ) é a estimativa do desvio padrão do intercepto e ( $a$ ) é o coeficiente angular da curva analítica.

$$\text{LQ} = 10 s / a \qquad \text{Eq. 2}$$

O LD refere-se à menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais especificadas. É estabelecido por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até o menor nível detectável (BRASIL, 2003). É fundamental assegurar-se de que todas as etapas de processamento do método analítico sejam incluídas na determinação desse limite de detecção (INMETRO, 2010).

Para a validação de um método analítico, é normalmente suficiente fornecer uma indicação do nível em que a detecção do analito pode ser distinguida do sinal do branco/ruído (INMETRO 2010). Existem diversas formas de se calcular o LD e no caso de métodos instrumentais que apresentam linha base (CLAE e/ou Cromatografia Gasosa (CG)), a estimativa do LD pode ser feita com base na relação de três vezes o ruído da linha de base (proporção 3:1), pela Equação 3 ou ainda por outras equações estatísticas (BRASIL, 2003; INTERNATIONAL..., 2005):

$$\text{LD} = 3 s / a \qquad \text{Eq. 3}$$

### **3.4 Estabilidade de medicamentos**

O monitoramento da estabilidade dos medicamentos e da formação de produtos de degradação são os métodos mais eficazes para avaliação, previsão e prevenção de problemas relacionados à qualidade do produto durante a validade. Do ponto de vista farmacêutico, uma formulação deve ser compatível com os

princípios ativos e adjuvantes, não ser irritante, nem se degradar (CASTELI et al., 2008). Além disso, deve apresentar estabilidade, que é a capacidade que o produto tem de manter, numa embalagem determinada, as mesmas propriedades e características desde a fabricação até o término de sua validade (BRASIL, 2005; ZAGUE, 2006; GIL, 2007). Através do perfil de estabilidade de um produto cosmético ou farmacêutico é possível avaliar seu desempenho, segurança e eficácia, além de sua aceitação pelo consumidor (ANVISA, 2004; BRASIL, 2005).

Produtos expostos ao consumo e que apresentem problemas de estabilidade organoléptica, físico-química e/ou microbiológica, além de descumprirem os requisitos técnicos de qualidade, podem colocar em risco a saúde do consumidor configurando infração sanitária. A instabilidade pode ser definida como uma situação de ocorrência imediata ou de longo prazo que altera significativamente a forma de utilização, a durabilidade, a eficácia e a segurança do produto (ZAGUE, 2006).

Conforme a origem, as alterações podem ser classificadas como extrínsecas, quando determinadas por fatores externos; ou intrínsecas, quando determinadas por fatores inerentes à formulação (ANVISA, 2004). Geram, principalmente, incompatibilidades físico-químicas que podem resultar em alterações nas características organolépticas da formulação, separação de fases e redução do teor da substância ativa (QUEIROZ, 2008).

O estudo de estabilidade deve expor o produto a condições que acelerem mudanças passíveis de ocorrer durante o prazo de validade. Entretanto, tais condições não devem ser tão extremas que, ao invés de acelerarem o envelhecimento, provoquem alterações que não ocorreriam no mercado (BRASIL, 2005). Os aspectos físicos considerados enquadram a cor, odor, uniformidade, dentre outras. Estes parâmetros são estudados comparativamente, considerando as características iniciais do produto e suas alterações ao longo do tempo (BABY, 2005). Já os aspectos químicos como a integridade da estrutura química e o teor de ingredientes devem ser mantidos dentro dos limites especificados. O cumprimento das Boas Práticas de Fabricação (BPF) e os sistemas conservantes utilizados na formulação podem garantir as características microbiológicas do produto em teste (ANVISA, 2004). É importante ressaltar que, antes de avaliar a estabilidade do produto farmacêutico, é fundamental avaliar a estabilidade dos produtos intermediários, no caso deste trabalho, as soluções extrativas e o extrato seco obtido.

De acordo com a legislação (BRASIL, 2005) para fins de prazo de validade provisório de 24 meses deve ser providenciado e aprovado o relatório de estabilidade acelerado ou de longa duração de 12 meses, apresentando variação menor ou igual a 5,0% do valor de análise da liberação do lote. Caso as variações de doseamento estejam entre 5,1% e 10,0% no estudo de estabilidade acelerado, o prazo de validade provisório deve ser reduzido para 12 meses.

#### **3.4.1 Estudo de estabilidade preliminar**

A avaliação preliminar da estabilidade permite que o pesquisador escolha, dentre as várias fórmulas da etapa de desenvolvimento do produto e em concordância com os critérios estabelecidos para aceitação e rejeição, qual ou quais estão aparentemente estáveis e posteriormente serão submetidas aos testes seguintes (QUEIROZ, 2008; ADRIANO, 2009).

Devido às condições em que é conduzido, este estudo não tem a finalidade de estimar a vida útil do produto, porém de auxiliar na triagem das formulações com duração de aproximadamente quinze dias. Geralmente as amostras são submetidas a aquecimento em estufas, resfriamento em refrigeradores e a ciclos alternados de resfriamento e aquecimento (ANVISA, 2004).

#### **3.4.2 Estudo de estabilidade acelerada (EA)**

É orientativo na previsão da estabilidade do produto em condições drásticas de armazenamento e de duração reduzida de tempo, para acelerar a degradação química e/ou mudanças físicas do produto em teste (SILVA et al., 2009). Pode ser feito em lotes de bancada e até lotes piloto de fábrica e fornece dados para prever a estabilidade do produto e o tempo de vida útil (BRASIL, 2005; QUEIROZ, 2008). Os dados obtidos, juntamente com aqueles derivados dos estudos de longa duração, podem ser usados para avaliar efeitos químicos e físicos prolongados em condições não aceleradas e para avaliar o impacto de curtas exposições a condições fora daquelas estabelecidas no rótulo do produto, que podem ocorrer durante o transporte (ANVISA, 2004; BRASIL, 2005).

A EA tem duração de seis meses e as formulações em teste são submetidas a condições menos extremas que no teste de estabilidade preliminar. A frequência

dos testes deve ser realizada nos tempos 0, 3 e 6 meses para doseamento, quantificação de produtos de degradação, dissolução (quando aplicável) e pH (quando aplicável) (ANVISA, 2004; BRASIL, 2005).

A ANVISA estabelece que para temperaturas entre 15 °C a 30 °C, durante o teste acelerado, as amostras semissólidas devem ser armazenadas à temperatura de 40 °C  $\pm$  2 °C a 75%  $\pm$  5% UR, durante seis meses em embalagens semipermeáveis. Já para embalagens impermeáveis, as amostras semissólidas devem ser armazenadas à temperatura de 40 °C  $\pm$  2 °C, durante seis meses (BRASIL, 2005).

A EMA (*European Medicines Agency*, 2003) estabelece que para temperaturas entre 25 °C ou 30 °C, durante o teste acelerado, as amostras devem ser armazenadas à temperatura de 40 °C  $\pm$  2 °C a 75%  $\pm$  5% UR durante seis meses. Já no refrigerador, as amostras devem ser submetidas à temperatura de 25 °C  $\pm$  2 °C a 60%  $\pm$  5% UR durante seis meses. As amostras também devem ser estocadas no freezer a uma temperatura de - 20 °C  $\pm$  5 °C, durante 12 meses para avaliação da estabilidade.

### **3.4.3 Estudo de estabilidade de longa duração (ELD) e de acompanhamento**

Tem a finalidade de verificar as características físicas, químicas, biológicas e microbiológicas de um produto farmacêutico durante e opcionalmente, depois do prazo de validade esperado, sob condições habituais de armazenamento e utilização (BRASIL, 2005; SILVA et al., 2009). Os resultados são usados para estabelecer ou confirmar o prazo de validade e recomendar as condições de armazenamento (BRASIL, 2005; GIL, 2007).

Deve ser realizado nos tempos 0, 3, 6, 9, 12, 18 e 24 meses para doseamento, quantificação de produtos de degradação, dissolução (quando aplicável) e pH (quando aplicável). Os estudos de acompanhamento devem ser realizados a cada 12 meses e após, emitir um relatório com os resultados e testes (BRASIL, 2005).

A ANVISA estabelece que para temperaturas entre 15 °C a 30 °C, durante o teste de longa duração, as amostras semissólidas devem ser armazenadas à temperatura de 30 °C  $\pm$  2 °C a 75%  $\pm$  5% UR, durante vinte e quatro meses em embalagens semipermeáveis. Já para embalagens permeáveis, as amostras

semissólidas devem ser armazenadas à temperatura de  $30\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ , durante vinte e quatro meses (BRASIL, 2005).

Em comparação, a EMA (2003) estabelece que para temperaturas de  $25\text{ °C}$  ou  $30\text{ °C}$ , durante o teste de longa duração, as amostras devem ser estocadas a uma temperatura de  $25\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$  a  $60\% \pm 5\%$  de umidade relativa (UR) ou a  $30\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$  a  $65\% \pm 5\%$  UR durante 12 meses. Durante o teste em longo prazo no refrigerador, as amostras devem ser submetidas à temperatura de  $5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$  durante 12 meses. As amostras também devem ser estocadas em freezer a uma temperatura de  $-20\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$ , durante 12 meses, para avaliar sua estabilidade.

#### **3.4.4 Testes de estresse**

A condução dos estudos de degradação forçada ou “teste de estresse” gera dados valiosos para a segurança e avaliação da potência de um produto, pois desafia a estabilidade de fármacos e medicamentos sob condições extremas. Durante os testes de estresse, podem ocorrer alterações químicas que levam à redução da atividade terapêutica, bem como gerar efeitos indesejados, devido à possibilidade de vários tipos de reações de decomposição (TONHI, 2011).

Após a publicação do estudo de estabilidade de fármacos e medicamentos, descrito pela Resolução RE nº 1, de 29 de julho de 2005, houve a publicação do Informe Técnico nº 1, de 15 de julho de 2008 com o objetivo de esclarecer procedimentos a serem realizados, nos casos em que a impureza ou padrões dos produtos de degradação não estejam disponíveis (BRASIL, 2008; SILVA et al., 2009). Estes procedimentos envolvem a realização de testes de estresse sob condições variadas (BRASIL, 2008). A realização de tal teste é de extrema importância para as indústrias farmacêuticas, pois no momento do registro, pós-registro e renovação, o estudo de estresse, acompanhado de sua análise crítica deverá ser contemplada (BRASIL, 2008; SILVA et al., 2009). Atualmente, estes testes tornaram-se uma tendência dentro do planejamento para o desenvolvimento de uma forma farmacêutica, pois a investigação da estabilidade intrínseca do fármaco fornece abordagens de formulação e indica tipos de adjuvantes, aditivos de proteção específicos e de acondicionamento, que provavelmente aperfeiçoarão a integridade do produto (SILVA et al., 2009).

A natureza do teste de estresse utilizado para o fármaco depende de suas características intrínsecas e da forma farmacêutica a ser desenvolvida. Desta maneira, são utilizadas condições mais severas do que as condições do estudo de estabilidade acelerado, como estratégia para a fase de desenvolvimento da forma farmacêutica (KLICK et al., 2005; TONHI 2011). Caso seja demonstrado que os produtos de degradação não são formados sob condições de estudo de estabilidade acelerado ou de longa duração, este estudo pode ser desprezado (INTERNATIONAL..., 2003).

O teste de degradação forçada é delineado por fatores como a variação da temperatura, umidade (quando aplicável), oxidação, fotólise e suscetibilidade à hidrólise por extensa variação dos valores de pH, que, por sua vez, são condições típicas de degradação de fármacos (KAPOOR; KHANDEVILLI; PANCHAGNULA, 2006; BEDSE; KUMAR; SINGH, 2009).

A ICH (*International Conference on Harmonisation*, 2003) propôs através do documento ICH Q1A (R2), um direcionamento sobre a conduta a ser tomada nos estudos de degradação forçada de ingredientes ativos e produto final, a partir de um esquema sistemático que seleciona condições para tais estudos. Contudo, o procedimento para sua realização não foi claramente definido pelo guia de estabilidade da ICH, assim como por outros órgãos regulatórios como o documento da FDA (1998). Desta maneira, os maiores interessados aplicam procedimentos internos diversificados e não há consenso entre as abordagens aplicadas (KLICK et al., 2005). A EMA (*European Medicines Agency*, 2010) publicou um documento que sugere a padronização dos estudos de estabilidade através da definição de parâmetros quali e quantitativos, para cada possível situação no que se refere à estabilidade de produtos farmacêuticos, porém não as propõe. Devido à falta dessas informações detalhadas, os pesquisadores enfrentam dificuldades ao decidir sobre as condições a serem empregadas nesta situação. Alguns estudos, como o realizado por Singh e Bakshi (2000), sugerem fluxogramas para a degradação de fármacos em diferentes condições.

O Quadro 5 inclui a realização de testes sob condições de estresse especificadas pela ANVISA (BRASIL, 2008) que cita ainda, a necessidade de realizar uma degradação de 10-30% do analito. Sendo observada a ausência total de degradação do composto após 10 dias, o fármaco deve ser considerado estável. Se esta for inferior a 10%, deve-se aumentar as condições de estresse (BRASIL,

2008). Outros autores sugerem que os testes de degradação devem induzir de 5-15% de degradação do componente principal (KLICK et al., 2005). Estes autores afirmam que os testes de degradação devem ser interrompidos ao atingir estas percentagens a fim de evitar gerar excessiva degradação, de relevância limitada e com produtos de degradação secundários, o que pode levar a um padrão complexo de degradação.

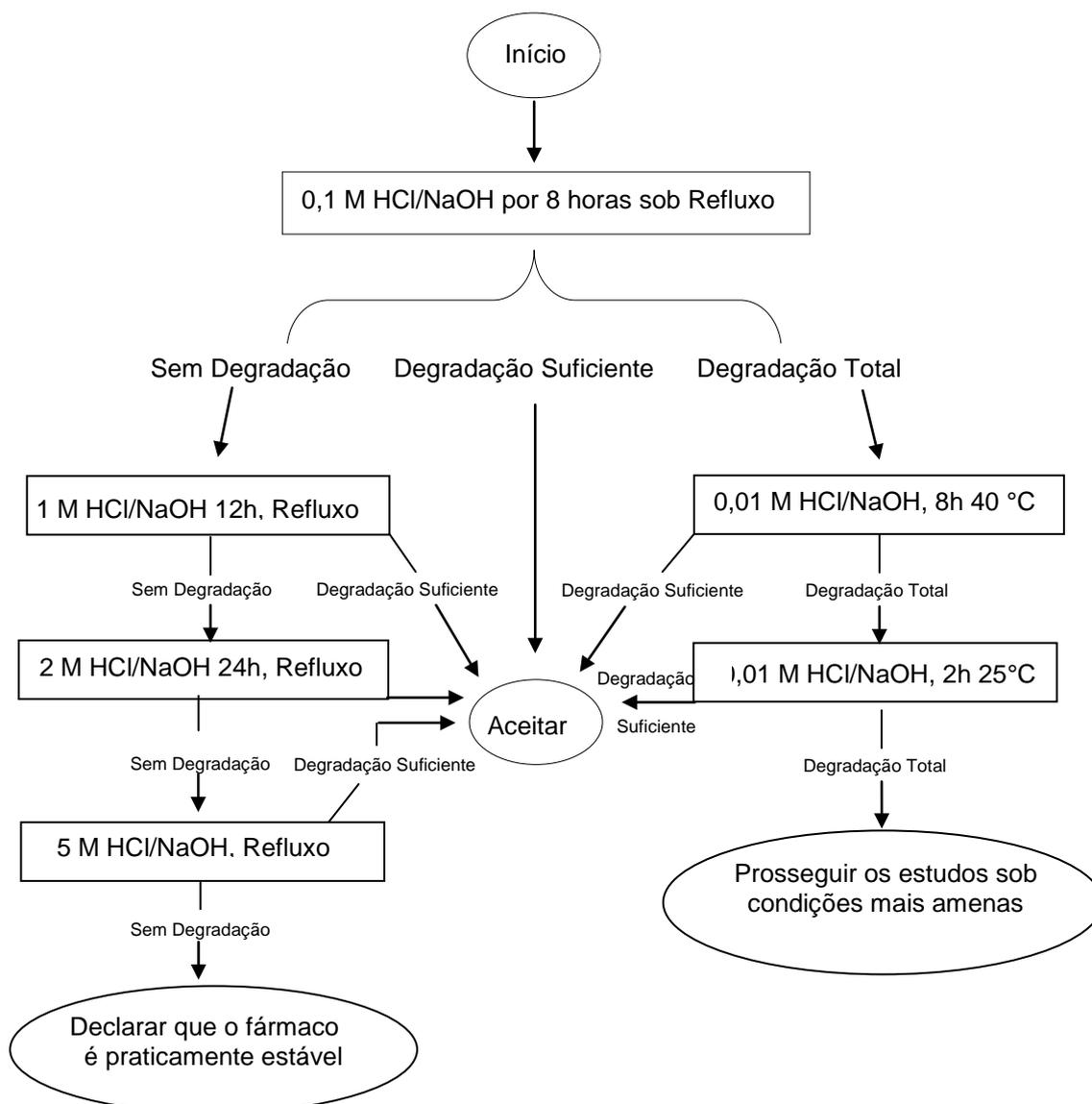
**Quadro 5.** Condições de estresse para a realização do estudo de degradação forçada.

<b>Parâmetros</b>	<b>Condições</b>
Aquecimento	60 °C
Umidade	75% UR ou mais
Solução ácida	HCl 0,1 M
Solução básica	NaOH 0,1 M
Solução oxidativa	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3%
Fotólise	UV-B fluorescente
Íons metálicos (opcional)	Fe <sup>2+</sup> ou Cu <sup>2+</sup> 0,05 M

Fonte: BRASIL, 2008; SILVA et al., 2009.

#### 3.4.4.1 Hidrólise

Para realizar o estudo de estresse em condição de hidrólise ácida, utiliza-se principalmente ácido clorídrico e para a hidrólise básica utiliza-se hidróxido de sódio, sendo que, muitas variações são observadas no tempo e na temperatura de exposição de fármacos para essa condição. Em relação à hidrólise realizada em pH neutro, geralmente se utiliza a água. Muitos fármacos são considerados instáveis em água e necessitam de intervenções durante a formulação e armazenamento, para que a eficácia e a estabilidade da forma farmacêutica final não sejam comprometidas (SINGH; BAKSHI, 2000). Dependendo dos resultados obtidos, aumenta-se ou diminui-se a concentração das condições de reação utilizadas (SINGH; BAKSHI, 2000; KLICK et al., 2005; BRASIL, 2008). Para a avaliação da instabilidade sob a condição de hidrólise, deve ser considerado o pH do meio, pois íons hidrogênio e hidroxila podem acelerar ou retardar o processo de degradação (ALLEN Jr.; POPOVICH; ANSEL, 2007).

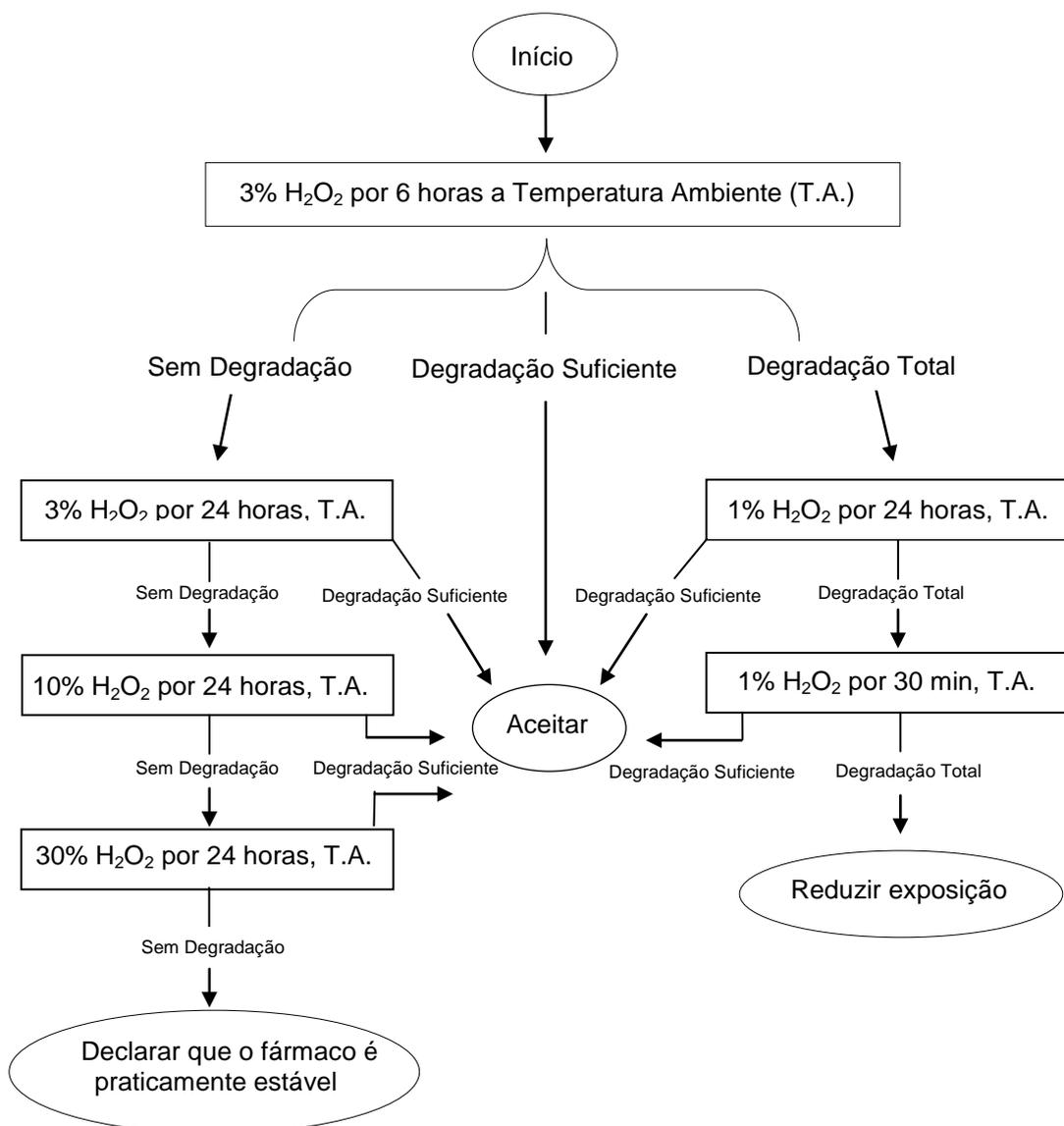


**Figura 4.** Fluxograma do estudo de estresse: Hidrólise sob condições ácidas e básicas (SINGH; BAKSHI, 2000).

#### 3.4.4.2 Oxidação

A degradação oxidativa é uma das principais causas de instabilidade de fármacos, dentre os mais conhecidos e estudados têm-se os esteróides, antibióticos, vitaminas, óleos e gorduras. É importante salientar que a estabilização de fármacos frente à condições oxidativas envolve a consideração de um número de precauções durante a manufatura e estocagem. Desta forma, o oxigênio em recipientes farmacêuticos deve ser substituído por nitrogênio ou dióxido de carbono; assim como o contato com íons de metais pesados, que catalisam a oxidação, deve ser evitado e a estocagem deve ser realizada sob temperaturas reduzidas (FLORENCE; ATTWOOD, 2003).

O peróxido de hidrogênio nas concentrações entre 1% e 30% é utilizado para criar as condições de estresse empregadas para o estudo de oxidação, sendo muito mais popular para o propósito que qualquer outro agente oxidante (Figura 5) (SILVA et al., 2009).



**Figura 5.** Fluxograma do estudo de estresse: Oxidação (SINGH; BAKSHI, 2000).

#### 3.4.4.3 Fotólise

Estudos adicionais como a fotoestabilidade, que se façam pertinentes de acordo com as propriedades do produto em questão, podem ser necessários para a comprovação da estabilidade de produtos farmacêuticos, pois sabe-se que a radiação luminosa pode alterar significativamente a cor e o odor do produto e levar à degradação de componentes da formulação (INTERNATIONAL..., 1996b; ANVISA,

2004). Portanto, para demonstrar que a exposição à luz não resulta em alterações significativas no produto, para estudos da fotoestabilidade são recomendados testes em produto exposto e em sua embalagem primária (ANVISA, 2011).

Para a realização deste estudo a fonte de iluminação pode ser a luz solar, captada através de vitrines especiais para este fim, ou lâmpadas que apresentem espectro de emissão semelhante à do sol, como as lâmpadas de xenônio. Também são utilizadas fontes de luz ultravioleta. Os produtos devem ser armazenados em mais de uma condição de temperatura, para que se possa avaliar o comportamento nos diversos ambientes a que são submetidos (INTERNATIONAL..., 1996b; ANVISA, 2011). Os fármacos podem sofrer exposição a comprimentos de onda dentro da faixa de UV, ou luz fluorescente de iluminação que varia na faixa de 400-1580 *foot candles*, sob temperatura ambiente. O período de exposição varia de algumas horas a vários meses, dependendo da intensidade da fonte luminosa (SINGH; BAKSHI, 2000).

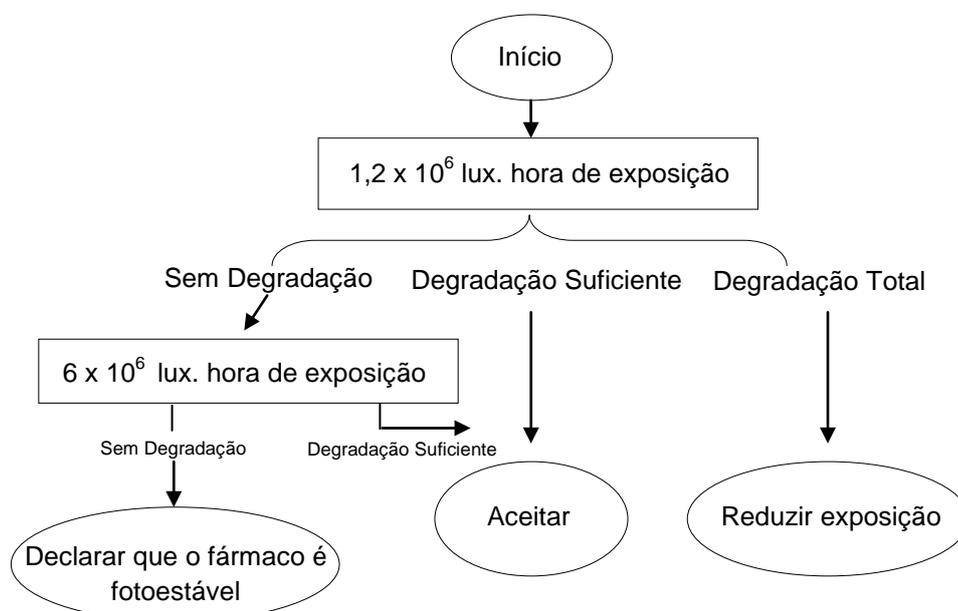
De acordo com a ICH (1996) e a ANVISA (2011) são descritas duas opções para fontes de luz e câmara de testes. A primeira utiliza uma fonte de luz similar ao padrão de emissão D65/ID65, como uma lâmpada fluorescente artificial combinando emissão visível e UV. A segunda opção propõe que a amostra seja exposta à combinação de uma lâmpada branca fluorescente fria e uma lâmpada fluorescente UV com espectro distribuído entre 320 nm e 400 nm. As amostras devem ser expostas em uma câmara oticamente isolada do ambiente externo, em uma sala com temperatura controlada e ventilação apropriada.

As amostras devem ser expostas a não menos que 1,2 milhões de lux. hora, integrados a uma energia de ultravioleta próxima de não menos que 200 watt horas/m<sup>2</sup>. Devem ainda, ser expostas lado a lado utilizando o sistema químico validado actinométrico, assegurando que a exposição foi garantida; ou a uma duração apropriada quando as condições são monitoradas por radiômetros ou luxímetros calibrados (INTERNATIONAL..., 1996; ANVISA, 2011).

A periodicidade das avaliações pode variar conforme experiência técnica, especificações do produto, características especiais de algum componente da formulação ou sistema conservante utilizado, porém o mais usual é que sejam avaliadas inicialmente nos tempos 0, 24 horas e aos 7, 15, 30, 60 e 90 dias. Se o estudo se prolongar por mais tempo, recomenda-se avaliações mensais até seu término (INTERNATIONAL..., 1996; ANVISA, 2011).

De acordo com a ICH (1996) e a ANVISA (2011) os parâmetros a serem avaliados e definidos pelo formulador, dependem das características da formulação em estudo e dos componentes utilizados nesta formulação. De modo geral, são avaliados as características organolépticas (aspecto, cor, odor e sabor, quando aplicável), as características físico-químicas (pH, viscosidade, densidade, materiais voláteis, teor de água, tamanho de partícula, centrifugação, granulometria, condutividade elétrica, umidade e teor de ativo, quando for o caso), e as características microbiológicas através do estudo do sistema conservante do produto por meio do teste de desafio efetuado antes e/ou após o período de estudo acelerado. Deve-se ainda, tomar uma amostra de referência, denominada padrão, que em geral, pode ser mantida em geladeira ou temperatura ambiente, ao abrigo da luz.

Frente a todas essas recomendações propostas, primeiramente pela ICH (1996) e em seguida por outras diretrizes como a ANVISA (2011), várias questões importantes no estudo de fotoestabilidade apontam para a necessidade de uma revisão fidedigna de tais normas para que não seja objeto de má aplicação (BAERTSCHI et al., 2010).



**Figura 6.** Fluxograma do estudo de estresse: Fotólise (SINGH; BAKSHI, 2000).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Materiais

#### 4.1.1 Reagentes e solventes

Todos os reagentes são de grau de pureza pró-análise, ou grau CLAE, exceto os diferentemente especificados.

Acetato de etila (J.T.Baker);

Acetonitrila (Tedia);

Ácido clorídrico (Quimex);

Ácido sulfúrico (Merck);

Agar caseína de soja (TSA) (Merck);

Ágar dextrose batata (PDA) (Oxoid);

Ágar MAC (Merck);

Ágar violeta (Merck);

Ágar XLD (Merck);

Água purificada obtida por sistema de purificação de osmose reversa;

Água ultrapurificada (Barnstead – Easy pure LF);

Álcool etílico (Dinâmica);

Azul de metileno;

Caldo nutritivo CN (Merck);

Caldo lactosado (LAC+I) (Merck);

Caldo mac conkey (MC) (Merck);

Caldo tetrionato base (Merck);

Caldo verde bile brilhante (VBB) (Merck);

Dióxido de silício coloidal (Ativos Magistrals, lote AE01-098F3, validade 06/2011);

Hidróxido de sódio (Lafan);

Isoquercitrina (Sigma-Aldrich, lotes BCBB2943, validade 06/2012 e BCBH0569V, validade 06/2013);

Metanol (Tedia);

Peróxido de hidrogênio 3%;

Solução de hipoclorito 1%;

Solução hidroetanólica de polietilenoglicol 4000 4%;  
Solução metanólica do Reagente Natural A (difenilboril-oxietilamina 1%);  
Tampão fosfato pH 7,2 estéril.

#### 4.1.2 Equipamentos e outros materiais

Balança analítica (Mettler Toledo<sup>®</sup> AG 204);  
Balança infravermelho (Mettler Toledo<sup>®</sup> LJ16);  
Banho de ultrassom (Unique<sup>®</sup> USC 5000);  
Bomba de vácuo;  
Câmara de fotoestabilidade (Mecacor<sup>®</sup>, EC/0,2/R-F)  
Coluna cromatográfica C18 (Luna Phenomenex<sup>®</sup>, (5 µm, 250 x 4,60 mm), lote 00G-4252-E0, associada a uma pré coluna Phenomenex de 4.0 mm de comprimento x 3.0 mm de diâmetro interno (lotes 525556-3 e 42849-27);  
Cromatofolhas de sílica GF<sub>254</sub>, 20 x 20 cm (Merck);  
Filtro Sartorius Stedim Biotech GmbH, celulose regenerada, 0,45 µm;  
Funil de Buchner;  
Membrana filtrante com membrana PTFE modificada para filtração de solventes orgânicos e aquosos (Millex TM) com porosidade 0,45 µm, 13 mm, não estéril;  
Micropipetas (10 a 1000 µL) (Brand);  
Microscópio óptico binocular (Leica<sup>®</sup> 1349522X);  
Moinho de martelos (Marconi<sup>®</sup> 600);  
pHmetro (Digimed<sup>®</sup> DM 20);  
Rotaevaporador (Fisatom<sup>®</sup> 558);  
Cromatógrafo Líquido de Alta Performance (CLAE) SHIMADZU, bomba (LC-10ADvp), acoplado a detector de arranjo de diodos (SHIMADZU DAD SPD-M10Avp);  
Auto injetor (SHIMADZU SIL-10AF), comunicador (SHIMADZU SCL-10Avp) e forno de coluna (SHIMADZU CTO-10Avp);  
Pipetas volumétricas classe A (Laborglás);  
Seringas de vidro;  
*Spray Dryer* (Büchi<sup>®</sup> B-290);  
Tecidos Sontara<sup>®</sup> (Dupont);  
Ultrassom (ULTRASONIC CLEANER, UNIQUE).

### **4.1.3 Obtenção e tratamento da droga vegetal (DV)**

O material vegetal para o preparo das soluções extrativas foi coletado na praia de Esplanada, município de Jaguaruna-SC em diferentes períodos, totalizando duas colheitas. Uma exsicata do vegetal foi depositada no

Após o recebimento do material vegetal fresco, foi realizada a triagem manualmente, através da seleção das folhas e caules e eliminação do material estranho, seguindo-se da limpeza à seco, com auxílio de gaze para remoção da areia e outras sujidades. A seguir, cada parte selecionada foi levada à estufa com ar circulante a 35 °C e moída separadamente em moinho Herbário da Universidade Estadual de Maringá-HUEM (Maringá-PR) sob o registro HUEM 23566. de martelos.

O primeiro lote da droga vegetal, coletado em abril de 2010, foi inteiramente utilizado para os testes iniciais de desenvolvimento do método analítico (lote 0410).

Uma segunda colheita realizada em setembro de 2011 (lote 0911) foi utilizada para a caracterização da droga vegetal, validação da metodologia analítica e estudo de estabilidade da droga vegetal e extrato seco. O rendimento fresco desta colheita foi de 2,31 kg, representado por 68,71% de folhas e 27,13% de caules, além de 4,16% de botões, flores e frutos.

Para a caracterização da droga vegetal foram realizadas as análises macro e microscópicas, a perda por dessecação, a pureza microbiológica, cinzas totais, cinzas insolúveis em ácido (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010) e teor do marcador por CLAE empregando o método desenvolvido no presente trabalho.

As análises químicas e físico-químicas foram realizadas com proporção fixa de caules (40%) e folhas (60%), pesadas separadamente a cada ensaio.

## **4.2 Métodos**

### **4.2.1 Desenvolvimento e validação do método analítico para quantificação da isoquercitrina por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)**

A partir da metodologia previamente desenvolvida por Soares (2008) e posteriormente adaptada por Adriano (2009), as modificações na fase móvel (água acidificada com ácido sulfúrico pH 3,0 (A) e acetonitrila (B)), no gradiente (90:10 (0 min, A:B); 85:15 (7 min, A:B); 80:20 (18-25 min, A:B); 75:25 (40 min, A:B); 40:60 (43-

47 min, A:B); 90:10 (50-60 min, A:B)), pH (3,0), lote da coluna (525556-3), temperatura do forno (30 °C) e fluxo (1 mL/min) foram realizadas com a finalidade de obter uma melhor condição para a análise qualitativa das soluções amostras (SA) (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997).

A fase móvel do método inicialmente desenvolvido por Adriano (2009) consistiu de um gradiente composto por água acidificada pH 3,2 com ácido fórmico como solvente A, e acetonitrila:metanol (50:50, V/V) como solvente B, em sistema gradiente de 75:25 durante 30 min e 60:40 durante 20 min, a 35 °C, fluxo de 0,8 mL, coluna de fase reversa tipo C18 (5 µm, 250 x 4,60 mm), detecção em 254 nm, sistema de injeção automático e volume de injeção de 20 µL da amostra.

Foi utilizado o cromatógrafo da marca Shimadzu, modelo LC VP, gerenciado pelo software Class VP VPS UM, detector por arranjo de fotodiodo (SPDM 10A), comprimento de onda de 254 nm e volume de injeção de 20 µL.

#### 4.2.1.1 Preparo da fase móvel e solução diluente

Para o preparo da água acidificada, foram adicionados 30 µL de ácido sulfúrico R em 1 L de água ultrapura a fim de atingir o pH 3,0.

A solução diluente foi composta por uma mistura de metanol e água acidificada pH 3,0 (em ácido sulfúrico R) na proporção 1:1.

Após o preparo, as soluções foram filtradas através de filtro com porosidade de 0,45 µm.

Os solventes da fase móvel, água acidificada e acetonitrila, foram degaseificados por 15 min com gás Hélio.

#### 4.2.1.2 Adequabilidade do sistema

Antes de qualquer análise no cromatógrafo foi realizada a adequabilidade do sistema para garantir que o método utilizado estivesse de acordo com o esperado. Para isso, foram injetados 20 µL da *solução padrão* conforme item 4.2.1.3 em quintuplicata. Para o cálculo da resolução, foram injetados 20 µL da *solução amostra* conforme item 4.2.1.4 em triplicata. Após, os cromatogramas foram registrados e a área referente ao pico do marcador, integrada.

Para aceitação da adequabilidade, o desvio padrão relativo do pico do marcador entre as replicatas da *solução padrão* não poderia ser maior que 1% e a

resolução entre o pico do marcador e o pico vizinho não poderia ser inferior a 1,5 (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2012).

#### 4.2.1.3 Solução padrão

O marcador isoquercitrina (ISO) (quercetina 3- $\beta$ -D-glicosídeo, Sigma-Aldrich, pureza  $\geq 90\%$ ), mantido em freezer (  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), foi pesado em balança ultramicroanalítica (5 mg) e dissolvido em 10 mL de solução diluente (item 4.2.1.1) em balão volumétrico de 25 mL, sonificado por 20 min e o volume completado com o mesmo solvente, de modo a obter uma concentração de 200  $\mu\text{g/mL}$ , denominada *solução padrão estoque* (SPE).

A solução resultante foi novamente diluída para obter uma concentração de 25  $\mu\text{g/mL}$ , denominada *solução padrão* (SP). Antes da injeção no cromatógrafo, a solução foi filtrada com filtro de celulose regenerada de porosidade 0,45  $\mu\text{m}$  diretamente para um vial. A SPE foi estocada em freezer ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

#### 4.2.1.4 Solução amostra

Foram utilizadas folhas e caules moídos de *I. pes-caprae*, na proporção de 60% e 40%, respectivamente. A solução extrativa (12,5%, m/V) foi preparada empregando-se etanol 70  $^{\circ}\text{GL}$  e maceração dinâmica durante 18 h a 560 rpm. Em seguida, a solução foi filtrada e prensada manualmente através de tecido Sontara<sup>®</sup>, sendo novamente filtrada sobre papel filtro qualitativo, em sistema à vácuo. A solução resultante foi denominada *solução extrativa* (SE).

A *solução amostra* foi preparada a partir da SE transferindo-se 5,0 mL para um balão volumétrico de 10 mL, sendo o volume completado com a solução diluente (item 4.2.1.1) (*solução 1*). O volume de 1,25 mL da *solução 1* foi transferido para um balão volumétrico de 10 mL, completando-se o volume com a solução diluente (*solução amostra*). Antes da injeção no cromatógrafo, a *solução amostra* (SA) foi filtrada com filtro de celulose regenerada de porosidade 0,45  $\mu\text{m}$  diretamente para um vial.

##### 4.2.1.4.1 Teor de ISO na droga vegetal

Após integrar a área da ISO na *solução amostra* foi calculado o teor de ISO na droga vegetal (DV) empregando a Equação 4, onde: Ca é a concentração de ISO na *solução amostra* calculado pela equação da reta da linearidade da *solução*

*padrão*;  $M_{DV}$  = massa da droga vegetal (g) para fazer a *solução amostra*; PD é a perda por dessecação da droga vegetal (%); 160 é o fator de correção da droga vegetal.

$$\text{Cálculo do teor de ISO na droga vegetal (mg/g)} = \frac{\text{Ca} \times 160}{M_{DV} \times (100 - \text{PD})} \quad \text{Eq. 4}$$

#### 4.2.1.4.2 Teor de ISO na solução extrativa

Após integrar a área da ISO na *solução amostra* e na *solução padrão* foi calculado o teor de ISO na *solução extrativa* com base no resíduo seco (RS) empregando a Equação 5, onde: Ca é a concentração de ISO na *solução amostra* calculado pela equação da reta da linearidade da *solução padrão*; 1,6 é o fator de correção da *solução extrativa* e RS é o resíduo seco obtido na *solução extrativa* (%).

$$\text{Cálculo do teor de ISO no RS da } \textit{solução extrativa} \text{ (mg/g)} = \frac{\text{Ca} \times 1,6}{\text{RS}} \quad \text{Eq. 5}$$

#### 4.2.1.5 Solução extrato seco

Foram pesados exatamente cerca de 0,8 g de extrato seco (contendo 20% de Aerosil<sup>®</sup>) e transferidos quantitativamente para balão volumétrico de 20 mL. Foram adicionados 10 mL da solução diluente (item 4.2.1.1), sonicando-se por 20 min e o volume completado com o mesmo solvente. A solução resultante foi denominada *solução extrato seco estoque* (ESE).

A *solução extrato seco* foi preparada a partir da ESE transferindo-se 5,0 mL para um balão volumétrico de 10 mL e o volume completado com a solução diluente (item 4.2.1.1) (*solução 2*). O volume de 1,25 mL da *solução 2* foi transferido para um balão volumétrico de 10 mL, completando-se o volume com a solução diluente (*solução extrato seco*). Antes da injeção no cromatógrafo, a *solução extrato seco* (SES) foi filtrada com filtro de celulose regenerada de porosidade 0,45  $\mu\text{m}$  diretamente para um vial.

##### 4.2.1.5.1 Determinação do teor de ISO no extrato seco

Após integrar a área do marcador na *solução extrato seco* foi calculado o teor de ISO no extrato seco (ES) empregando a Equação 6, onde: Ca é a concentração

de ISO na *solução extrato seco* calculado pela equação da reta da linearidade da *solução padrão*;  $M_{ES}$  = massa do ES (g) pesada para fazer a *solução extrato seco* estoque; PD é a perda por dessecação do ES (%); 32 é o fator de correção do extrato seco.

$$\text{Cálculo do teor de ISO no ES (mg/g)} = \frac{\text{Ca} \times 32}{M_{ES} \times (100 - \text{PD})} \quad \text{Eq. 6}$$

#### 4.2.1.6 Validação analítica

A validação do método foi realizada com a droga vegetal coletada em setembro de 2011 (lote 0911), determinando-se a especificidade/seletividade, linearidade, exatidão, precisão, limites de detecção e quantificação e robustez, de acordo com os parâmetros da RE nº 899 (BRASIL, 2003) e internacionais (INTERNATIONAL..., 2005).

##### 4.2.1.6.1 Seletividade e estudo de degradação forçada da solução extrativa de *I. pes-caprae brasiliensis* (L.) R. Br.

Para a determinação da seletividade, inicialmente foi analisada a interferência da solução diluente e da própria fase móvel no método. Foram comparados o perfil cromatográfico da *solução amostra* (item 4.2.1.4), da *solução padrão* (item 4.2.1.3), da solução diluente (item 4.2.1.1) e da fase móvel (item 4.2.1.1).

Adicionalmente, a seletividade do método foi analisada através da interferência de produtos de degradação na quantificação do marcador na *solução amostra* (SA), avaliando se a metodologia é indicativa da estabilidade do extrato. Para estudar as possíveis vias de degradação da *solução extrativa* de *I. pes-caprae*, a mesma foi submetida às condições de estresse por fotólise, hidrólise ácida (com e sem aquecimento), neutra (com aquecimento), alcalina (com e sem neutralizante) e por oxidação, seguidos pela análise por CLAE no método desenvolvido.

De acordo com Klick et al. (2005) foram testadas várias concentrações dos agentes de estresse e/ou tempos de exposição até que fosse alcançado 5 a 15% de degradação do principal marcador (ISO). Neste estudo, foram evitadas as condições excessivamente degradantes com o intuito de observar se o método é indicativo de estabilidade.

O solvente utilizado para a diluição final das amostras degradadas consistiu da solução diluente, já descrito no item 4.2.1.1, resultando em uma concentração final de 25 µg/mL de ISO, em todas as condições de estresse testadas. Todas as soluções foram previamente filtradas em filtro de porosidade 0,45 µm diretamente para um vial, antes de serem injetadas em triplicata, no cromatógrafo.

A extensão da degradação do extrato em cada condição de estresse foi avaliada comparando-se os perfis cromatográficos e a área dos picos principais das amostras submetidas à degradação, com as *soluções amostras* (SA) não degradadas, na mesma concentração inicial, calculando-se o percentual de degradação de cada um dos picos principais.

As condições de estresse selecionadas e o preparo das amostras estão descritas a seguir:

a) Estresse por hidrólise neutra

Foram medidos 10 mL da SE e transferido para um balão de 20 mL. A alíquota foi dissolvida em 4 mL de água purificada, sonicando-se por 20 min e o balão completado com o mesmo solvente. O balão foi pesado e o valor anotado. Após, a solução resultante foi refluxada com aquecimento durante 5 min. O mesmo procedimento foi realizado para um tempo de 15 min. A solução resultante foi transferida novamente para o balão de 20 mL, pesado e anotado o valor após o refluxo e o resfriamento. Quando necessário, a massa inicial foi recomposta para evitar problema de concentração por evaporação. No final de cada tempo, foram transferidos 1,25 mL da solução para um segundo balão volumétrico de 10 mL e o volume completado com a solução diluente (item 4.2.1.1), homogeneizado, filtrado e injetado no cromatógrafo.

b) Estresse por hidrólise ácida

A partir da SE, foram transferidos 10 mL para um balão de 20 mL. Foram adicionados 4 mL de ácido clorídrico 0,1 M, sonicando-se por 20 min e o balão completado com o mesmo solvente, com agitação magnética na temperatura ambiente, durante 4 h. O mesmo procedimento foi realizado para um tempo de 8 h. No final de cada tempo, foram transferidos 1,25 mL da solução para um segundo

balão volumétrico de 10 mL e o volume completado com a solução diluente, homogeneizado, filtrado, injetado no cromatógrafo.

Além da análise em temperatura ambiente, foi testada uma segunda condição utilizando ácido clorídrico 0,1 M, com aquecimento. Foram medidos 10 mL da SE e transferidos para um balão de 20 mL. A alíquota foi dissolvida em 4 mL de ácido clorídrico 0,1 M, sonicando-se por 20 min e o balão completado com o mesmo solvente. Após, a solução resultante foi refluxada com aquecimento durante 5 min. O mesmo procedimento foi realizado para um tempo de 15 min. A solução resultante foi transferida novamente para o balão de 20 mL, pesado e anotado o valor após o refluxo e o resfriamento. Quando necessário, a massa inicial foi recomposta para evitar problema de concentração por evaporação. No final de cada tempo, foi transferido 1,25 mL da solução para um segundo balão volumétrico de 10 mL e o volume completado com a solução diluente (item 4.2.1.1), homogeneizado, filtrado e injetado no cromatógrafo.

c) Estresse por hidrólise alcalina

Foram medidos 10 mL da SE e transferidos para um balão de 20 mL. A alíquota foi dissolvida em 4 mL de hidróxido de sódio 0,01 M, sonicando-se por 20 min e o balão completado com o mesmo solvente, com agitação magnética na temperatura ambiente, durante 4 h. O mesmo procedimento foi realizado, neutralizando a solução com hidróxido de sódio 0,1 M. No final de cada procedimento, foram transferidos 1,25 mL da solução para um segundo balão volumétrico de 10 mL e o volume completado com a solução diluente (item 4.2.1.1). Após, a solução foi homogeneizada, filtrada e injetada no cromatógrafo.

d) Estresse oxidativo

Foram medidos 10 mL da SE e transferidos para um balão de 20 mL. A alíquota foi dissolvida em 4 mL de peróxido de hidrogênio 30%, sonicando-se por 20 min e o balão completado com o mesmo solvente, com agitação magnética na temperatura ambiente, durante 3 h. Após, foram transferidos 1,25 mL da solução para um segundo balão volumétrico de 10 mL e o volume completado com a solução

diluyente (item 4.2.1.1). Após, a solução foi homogeneizada, filtrada e injetada no cromatógrafo.

#### 4.2.1.6.2 Linearidade

O ensaio de linearidade foi realizado através da elaboração de três curvas analíticas. Na curva A, foi utilizado somente SPE, na curva B foi utilizado SPE contendo *solução 1* (item 4.2.1.4) e na curva C foi utilizada somente *solução 1* (item 4.2.1.4).

Primeiramente, foi preparada uma curva analítica com seis níveis de concentração do padrão de ISO que partiu de uma concentração teórica de 200 µg/mL (item 4.2.1.3), em triplicata, sendo cada um deles injetados em duplicata.

Curva Analítica A: a partir da SPE, alíquotas de 0,25, 0,40, 0,50, 1,25, 1,50, 2,5 mL foram transferidos para balões de 10 mL e completados com a solução diluyente. Assim, foram obtidas as concentrações de 5, 8, 10, 25, 40, 50 µg/mL de isoquercitrina, filtradas com filtro de celulose regenerada de porosidade 0,45 µm e injetadas em duplicata, lendo-se as absorvâncias em 254 nm, conforme demonstrado no Quadro 6.

A fim de verificar se a matriz influencia na linearidade do método foram preparadas duas curvas analíticas denominadas Curvas Analíticas B. Ambas foram elaboradas com seis níveis de concentração do padrão de ISO contendo *solução 1*, em triplicata, sendo cada um deles injetados em duplicata.

Curva Analítica B: a partir da *solução 1*, alíquotas 0,25 mL foram transferidas para balões de 10 mL. Em seguida, foram transferidas alíquotas de SPE de 0,25, 0,40, 0,50, 1,25, 1,50 e 2,0 mL para os mesmos balões onde foram previamente adicionadas as *soluções 1*, completando o volume com a solução diluyente. Assim, foram obtidas as concentrações de isoquercitrina conforme demonstrado no Quadro 6, filtradas com filtro de celulose regenerada de porosidade 0,45 µm e injetadas em duplicata, lendo-se as absorvâncias em 254 nm.

A curva analítica C foi preparada a partir da solução extrativa com sete níveis de concentração, em triplicata, sendo cada um deles injetados em duplicata.

Curva Analítica C: a partir da *solução 1*, foram transferidas alíquotas de 0,25, 0,75, 1,0, 1,25, 1,50, 1,75, 2,0 mL para balões de 10 mL completando o volume com a solução diluyente. Assim, foram obtidas as concentrações de isoquercitrina expostas no Quadro 6, filtradas com filtro de celulose regenerada de porosidade 0,45 µm e

injetadas em duplicata, lendo-se as absorvâncias em 254 nm.

É importante ressaltar que para as curvas B e C foi utilizada uma SE com resíduo seco de 3,39%. O desvio padrão relativo (DPR) do intercepto, o coeficiente angular, o coeficiente de correlação ( $r$ ), a análise dos resíduos e a análise da regressão linear foram calculados utilizando o software Excel 5.0.

**Quadro 6.** Planejamento do ensaio de linearidade.

Volume (mL)*	[ ] Ext final mg/mL (balão 2)	[ ] ISO Ext µg/mL	[ ] ISO adic. µg/mL	[ ] ISO final µg/mL	% conc. alvo
<b>SPE</b>	<b>Curva A</b>				
0,25	-	-	5,0	5,0	20,0
0,40	-	-	8,0	8,0	32,0
0,50	-	-	10,0	10,0	40,0
1,25	-	-	25,0	25,0	100,0
1,50	-	-	30,0	30,0	120,0
2,50	-	-	50,0	50,0	200,0
<b>A partir da SA 1</b>	<b>Curva B</b>				
0,25	0,42	4,95	5,0	9,95	39,80
0,25	0,42	4,95	8,0	12,95	51,80
0,25	0,42	4,95	10,0	14,95	59,80
0,25	0,42	4,95	25,0	29,95	119,80
0,25	0,42	4,95	30,0	34,95	139,80
0,25	0,42	4,95	40,0	44,95	179,80
<b>Curva C</b>					
0,25	0,42	4,95	-	4,95	19,80
0,75	1,27	14,98	-	14,98	59,92
1,0	1,70	20,05	-	20,05	80,20
1,25	2,12	25,00	-	25,00	100,00
1,50	2,54	29,95	-	29,95	119,80
1,75	2,97	35,02	-	35,02	140,08
2,0	3,39	39,97	-	39,97	159,88

\*Balão 10 mL; ISO= isoquercitrina; [ ]= concentração; Curva a= somente isoquercitrina; Curva b= isoquercitrina adicionada de extrato; Curva c= somente extrato; SPE= Solução padrão estoque; SA 1 = Solução 1.

#### 4.2.1.6.3 Limite de Detecção e Quantificação

Os limites de quantificação e detecção foram determinados mediante os resultados obtidos na curva analítica do padrão isoquercitrina, após a análise da regressão linear utilizando as equações 2 e 3 (item 3.3.7).

#### 4.2.1.6.4 Exatidão

Para a SE, a exatidão do método foi realizada através do ensaio de adição do padrão e expressa por meio do percentual de recuperação do marcador ISO, onde uma concentração do padrão de ISO em três níveis crescentes (10 µg/mL, 25 µg/mL e 40 µg/mL) foi adicionada em uma solução contendo a amostra (*solução 1*, concentração fixa = 4,95 µg/mL), completando-se o volume com a solução diluente, injetadas em duplicata. A área proveniente da *solução 1*, sem adição de padrão, foi descontada das demais soluções e a área restante foi utilizada para o cálculo da recuperação, considerando a concentração teórica e a experimental, com base na equação da reta.

Para o ES, a exatidão do método foi realizada através do ensaio de adição do padrão e expressa por meio do percentual de recuperação do marcador ISO, onde uma concentração do padrão de ISO em três níveis crescentes (10 µg/mL, 20 µg/mL e 30 µg/mL) foi adicionada em uma solução contendo a amostra (*solução extrato seco (SES)*, concentração fixa = 2,5 mg/mL), completando-se o volume com a solução diluente, injetadas em duplicata. A área proveniente da SES a 2,5 mg/mL, sem adição de padrão, foi descontada das demais soluções e a área restante foi utilizada para o cálculo da recuperação, considerando a concentração teórica e a experimental, calculada com base nos valores obtidos pelo padrão injetado no mesmo dia, em quintuplicata.

A especificação para a exatidão utilizada neste estudo foi uma faixa de recuperação de  $100 \pm 2\%$  estabelecida como aceitável para os níveis de concentrações da amostra, conforme Green (1996) e Harris (2008).

#### 4.2.1.6.5 Precisão

A precisão do método foi analisada em dois níveis, a repetibilidade (intra-dia) e a precisão intermediária (inter-dia) tanto para a SE quanto para o ES.

Para o ensaio da repetibilidade, o mesmo analista, no mesmo dia, executou a análise da *solução amostra* (SA) e *solução extrato seco* (SES) em sextuplicata a 100% da concentração teste, o que corresponde a uma concentração de 25 µg/mL de SA (item 4.2.1.4) e SES (item 4.2.1.5), injetadas em duplicata (BRASIL, 2003; INTERNATIONAL..., 2005; HARRIS, 2008).

Para a determinação da precisão intermediária, o experimento da repetibilidade foi repetido em um segundo dia, com intervalo de dois dias.

O cálculo da repetibilidade e da precisão intermediária foi realizado estimando-se a média, o desvio padrão e o desvio padrão relativo dos seis valores de teor obtidos (para a SE e ES) a partir da fórmula descrita no item 4.2.1.4.2 e 4.2.1.5.1, respectivamente. O critério de aceitação é um DPR de no máximo 5% para ensaios analíticos e 15% para ensaios bioanalíticos (BRASIL, 2003). Tratando-se de uma matriz vegetal, o método em processo de validação neste trabalho poderia ser classificado como bioanalítico.

#### 4.2.1.6.6 Robustez

Para o ensaio da robustez alguns parâmetros foram levemente alterados utilizando-se como critério as pequenas variações que podem acontecer durante as análises cromatográficas, sejam elas causadas pelo manipulador ou pelo equipamento, avaliando se são capazes de manter a reprodutibilidade das análises. Não existem limites descritos que especifiquem a robustez do método. Neste estudo foi considerado os valores de DPR% encontrados entre as variações de cada parâmetro analisado.

Foram alterados parâmetros como o fluxo da fase móvel (0,9; 1,0 e 1,1 mL/min), temperatura do forno (29, 30 e 31 °C), pH da fase móvel (2,88; 3,0 e 3,1), variação na solução diluente da amostra (metanol:água purificada 50:50 (V/V); metanol:água acidificada pH 3,0 com ácido sulfúrico R 50:50 (V/V); metanol:água purificada 80:20 (V/V)), variação no lote da coluna cromatográfica (lotes 42849-27 e 525556-3) e por fim, a estabilidade das soluções nos tempos zero, 26, 48 e 168 horas. Os ensaios de variação de fluxo, coluna, pH, estabilidade das soluções e temperatura do forno foram realizados em unicata, com injeção no mínimo em triplicata. O ensaio de variação da solução diluente foi realizado em triplicata, com injeção em triplicata. A SP foi injetada em quintuplicata para verificar a adequabilidade do sistema para cada uma das condições testadas. É importante

ressaltar que para os ensaios da robustez foi utilizada uma SE com resíduo seco de 3,30%. Para determinar se o método é robusto foram avaliados parâmetros como tempo de retenção, área, resolução e teor de ISO na droga vegetal (mg/g).

#### **4.2.2 Caracterização da droga vegetal (DV)**

A caracterização da droga vegetal de *I. pes-caprae brasiliensis* (L.) R. Br. foi realizada a partir das análises botânicas, físicas, físico-químicas e microbiológicas descritas do lote 0911. Estes estudos foram realizados sob a supervisão do Professor Renê A. Ferreira (UNIVALI).

##### *4.2.2.1 Análise macroscópica*

A identificação macroscópica baseia-se na forma, tamanho, cor, superfície, textura, fratura e aparência da superfície de fratura. A planta coletada (ambos os lotes) foi comparada a partir de suas características macroscópicas com a exsicata da planta depositada no Herbário da UEM.

##### *4.2.2.2 Análise microscópica*

A análise microscópica foi realizada a partir da hidratação das folhas secas. Para tanto, as folhas foram rasuradas e transferidas para uma placa de Petri, onde foi adicionada água purificada suficiente para cobrir a amostra vegetal. Após 30 min, foram feitos cortes histológicos com auxílio de uma lâmina de barbear. Os cortes foram clareados com solução de hipoclorito a 1%, lavados com água purificada e corados com azul de metileno. Em seguida, foram dispostos em lâminas e protegidos pela lamínula para a microscopia. As estruturas presentes nas folhas foram observadas utilizando microscópio óptico binocular.

##### *4.2.2.3 Perda por dessecação*

O teor de umidade foi determinado através da balança de secagem por infravermelho, a partir de 3,0 g da DV, em triplicata, sendo que o limite máximo estipulado é de 8 a 14% (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010).

#### 4.2.2.4 Pureza microbiológica

A avaliação da pureza microbiológica foi realizada no setor microbiológico do Laboratório de Controle de Qualidade Controller (São José-SC), segundo metodologia padronizada pela Farmacopéia Brasileira (2010). As análises foram realizadas em cabine de segurança biológica classe II A1.

Para a contagem de bactérias mesófilas, foi pesado exatamente cerca de 1,0 g da DV utilizando-se balança semianalítica, e 99 mL de tampão fosfato pH 7,2 estéril. Desta solução (diluição  $10^{-2}$ ) foi transferido 1 mL da solução previamente preparada, em placas de Petri estéreis em duplicata. Foram adicionados 20 mL do meio de cultura ágar caseína de soja (TSA) de maneira asséptica e resfriado a aproximadamente 45 a 50 °C. Após, as placas foram homogeneizadas com movimentos leves e giratórios e o meio solidificado à temperatura ambiente. Foi realizado o controle negativo do meio de cultura. As placas foram invertidas e incubadas em estufa a  $35 \pm 2$  °C por 72 horas.

Para a contagem de fungos e leveduras procedeu-se a técnica da mesma forma acima descrita, porém o meio utilizado foi o ágar dextrose batata (PDA) e após preparação das placas, estas foram incubadas em estufa a  $25 \pm 2$  °C por 7 dias. Após o período de incubação, foi realizada a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) por mL ou g da amostra, segundo a Equação 7, onde  $n$  corresponde ao número de colônias e  $d$  significa diluição da amostra.

$$UFC = n \times d \qquad \text{Eq. 7}$$

Para a pesquisa de *Salmonella ssp* foram pesados 10 g da DV utilizando-se balança semianalítica e 90 mL de caldo lactosado (LAC+I). Desta solução foram transferidos 10 mL para 100 mL do caldo nutritivo (CN) previamente preparado em sacos estéreis, em duplicata. As replicatas foram incubadas a  $33 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$  no banho-maria por 18-24 h. Após, foram transferidos 10 mL do homogenato para 10 mL de caldo tetrionato base em tubo de ensaio e incubado a  $41 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$  no banho-maria por 18-24 h. Foi realizada a subcultura em placa ágar XLD e incubada em estufa a  $33 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$  por 18-72 h. Foi realizado o controle negativo da análise.

Para a pesquisa de *Escherichia coli* foram pesados 10 g da DV utilizando-se balança semianalítica e 90 mL de caldo LAC+I. Desta solução foram transferidos 10 mL para 100 mL do caldo CN previamente preparado em sacos estéreis, em

duplicata. As replicatas foram incubadas a  $33\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  no banho-maria por 18-24 h. Após, foi transferido 1 mL do homogenato para 100 mL de caldo mac conkey (MC) previamente vertido nos sacos estéreis e incubado a  $43\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  no banho-maria por 24-48 h. Foi realizada a subcultura em placa ágar MAC e incubada em estufa a  $33\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 18-72 h. Foi realizado o controle negativo da análise.

Para a pesquisa de bactérias gram-negativas bile-tolerantes foram pesados 10 g DV utilizando-se balança semianalítica e 90 mL do caldo LAC+I. O homogenato foi colocado em banho-maria a  $33\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 2-5 h. Desta solução foram transferidos 10 mL para 100 mL do caldo VBB previamente preparado em sacos estéreis, em duplicata. Após, a amostra resultante foi incubada a  $33\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  em banho-maria por 24-48 h. Foram realizadas subculturas em ágar violeta e incubada em estufa a  $33\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 18-24 h.

Os limites microbianos devem estar dentro dos parâmetros estabelecidos pela Farmacopéia Britânica (2008) e/ou Farmacopéia Brasileira (2010) (Quadro 7).

**Quadro 7.** Limites microbianos para o controle de qualidade de drogas vegetais que foram submetidas a processos extrativos a frio de acordo com a Farmacopéia Britânica (2008) e Farmacopéia Brasileira (2010).

Referências	TAMC (UFC/g)	TYMC (UFC/g)	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella spp.</i>	BTGNB
<b>F. Britânica (Categoria C)</b>	$10^5$ (Máx: $5 \times 10^5$ )	$10^4$ (Máx: $5 \times 10^4$ )	Ausência	Ausência	$10^4$
<b>F. Brasileira (Categoria B)</b>	$10^5$	$10^3$	$10^1$	Ausência	$10^3$

TAMC = Contagem de bactérias mesófilas; TYMC = Contagem de fungos e leveduras; BTGNB = Bactérias gram-negativas bile-tolerantes; UFC = unidade formadora de colônias.

#### 4.2.2.5 Cinzas totais

Uma amostra de cerca de 3,0 g da DV, exatamente pesada em cadinhos de porcelana previamente tarados, foi incinerada em mufla a  $450\text{ }^{\circ}\text{C}$  por aproximadamente 2 horas, resfriada em dessecador por 30 min e pesada. O ciclo de incineração, resfriamento e pesagem foi repetido até peso constante. Os resultados foram expressos em percentual de cinzas totais (CT%) (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010).

#### 4.2.2.6 Cinzas insolúveis em ácido

Para a determinação das cinzas insolúveis em ácido da DV foram utilizados os cadinhos contendo as cinzas da determinação de cinzas totais.

A cada amostra de cinzas totais foram adicionados 25 mL de ácido clorídrico 7% (m/V). Os cadinhos foram tampados com vidros relógio e aquecidos em chapa de aquecimento até fervura, durante cerca de 5 min. Em seguida, os vidros relógio foram lavados com 5 mL de água purificada quente, recolhendo-se a água de lavagem nos cadinhos. Cada amostra foi filtrada através de papel filtro, lavando-se com água purificada quente até pH neutro do filtrado. A amostra retida no papel filtro foi levada à secura, sob aquecimento. Para tanto, o papel filtro contendo o resíduo da amostra foi colocado no cadinho dessecado e levado à chapa de aquecimento. Após a secagem, os cadinhos contendo o papel filtro com a amostra retida, foram incinerados na mufla a 450 °C, por aproximadamente 4 horas, e após foram resfriados em dessecador por 30 min, e pesados. O ciclo de incineração, resfriamento e pesagem foi repetido até peso constante. Os resultados foram expressos em percentual de cinzas insolúveis em ácido (CI%) (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010).

#### 4.2.2.7 Fotoestabilidade da droga vegetal

Foram preparadas 3 placas de Petri contendo cerca de 3 g da DV e expostas à 1,2 milhões de lux. hora, sendo uma delas revestida com papel laminado para controle. Outras 3 placas de Petri contendo 3 g da DV foram expostas à uma energia de ultravioleta próxima de 200 watt horas/m<sup>2</sup>, sendo uma delas revestida com papel laminado para controle. As placas foram alocadas em uma Câmara de Fotoestabilidade (Mecalor<sup>®</sup>, EC/0,2/R-F). Após a exposição, as SE foram preparadas conforme descrito no item 4.2.1.4. A solução foi homogeneizada, filtrada e injetada em duplicata no cromatógrafo, calculando-se o teor de ISO na DV (item 4.2.1.4.1) e analisando o perfil cromatográfico em relação à amostra não degradada.

### 4.2.3 Caracterização da solução extrativa hidroetanólica de *I. pes-caprae brasiliensis* (L.) R. Br.

As *soluções extrativas* (SE) foram obtidas a partir do lote 0911 da DV (item 4.1.3), preparadas conforme detalhado no item 4.2.1.4 e analisadas quanto às características físicas, físico-químicas e microbiológicas descritas.

#### 4.2.3.1 Características organolépticas

As características organolépticas da SE (item 4.2.1.4) foram analisadas quanto ao aspecto, cor e odor através de visualização e percepção direta (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010).

#### 4.2.3.2 Determinação do resíduo seco (RS)

Cerca de 5,0 g de SE (item 4.2.1.4) foram exatamente pesados em cadinhos de porcelana previamente tarados, sendo submetidos ao aquecimento, em chapa quente a 250 °C, até evaporação completa do solvente. Após, os pesa-filtros contendo o resíduo seco por evaporação, foram dessecados em estufa a 105 °C, durante cerca de 4 horas, resfriados em dessecador por 30 min, e pesados. O ciclo de dessecação, resfriamento e pesagem foi repetido até peso constante (FARMACOPÉIA PORTUGUESA, 2002). O resíduo seco (RS), expresso em percentual (RS% = massa de RS para cada 100 g de SE), foi determinado a cada *solução extrativa*, pela média de três repetições, através da Equação 8, onde  $m_1$  = massa do pesa-filtro dessecado;  $m_2$  = massa do pesa-filtro contendo a amostra;  $m_3$  = massa do pesa-filtro contendo o resíduo dessecado, após peso constante.

$$RS\% = \frac{(m_3 - m_1)}{(m_2 - m_1)} \times 100 \quad \text{Eq. 8}$$

#### 4.2.3.3 pH

A determinação do pH foi realizada em pHmetro calibrado com soluções tampão de fosfato e acetato, pH 7,0 e 4,0, respectivamente. Foram medidos 100 mL da SE (item 4.2.1.4) e transferidos para um béquer de 150 mL, com agitação constante. O resultado foi calculado pela média de três determinações (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010).

#### 4.2.3.4 Pureza microbiológica

Foi realizada conforme descrito no item 4.2.2.4, utilizando-se 10 mL da SE e 90 mL de Tampão fosfato pH 7,2 estéril. Desta solução (diluição  $10^{-1}$ ) foi realizada a contagem de bactérias aeróbias totais, fungos e leveduras.

As análises de *Salmonella ssp*, *Escherichia coli* e bactérias gram-negativas bile-tolerantes foram realizadas conforme descrito no item 4.2.2.4, utilizando 10 mL da SE para cada análise.

#### 4.2.3.5 Cromatografia em camada delgada (CCD)

A análise química qualitativa da SE foi realizada por CCD, empregando-se como sistema de eluição, a mistura acetato de etila: acetona: água purificada: metanol (25:8:1:3) (WAGNER; BLADT, 2001), em cromatoplaça de sílica, 6,5 cm. Como substância de referência para flavonoides foi utilizada a isoquercitrina (1 mg/mL), dissolvida em metanol. Foram aplicadas alíquotas de 5  $\mu$ L.

O cromatograma foi desenvolvido de forma ascendente, em cuba saturada, até a altura de 10 cm. Após a secagem, à temperatura ambiente, a placa foi revelada com solução metanólica de difenilborilóxi-etilamina a 1% (Reagente Natural A) e fixada com solução hidroetanólica 77%, contendo polietilenoglicol 4000 (PEG 4000) a 4% (m/V). Após, a placa foi observada sob luz UV em 365 nm (WAGNER; BLADT, 2001).

#### 4.2.3.6 Determinação do grau alcoólico

Cerca de 500 mL da SAE foram transferidos para uma proveta de 500 mL. O alcoômetro previamente limpo foi imerso na solução extrativa e submetido à rotação manual. Após a situação de equilíbrio, foi verificado o ponto de afloramento da haste, tangencialmente ao nível do líquido, realizando-se a leitura na parte inferior do menisco (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010). Após a leitura, foi verificada a temperatura da solução extrativa, realizando a conversão do grau alcoólico segundo a Equação 9, onde  $g$  = grau alcoólico real;  $g_0$  = grau alcoólico aparente;  $T$  = temperatura aparente;  $T'$  = temperatura de calibração; 0,4 = constante; se  $T > T'$ , usar sinal positivo e se  $T < T'$ , usar sinal negativo.

$$g = g_0 \pm 0,4 \times (T - T')$$

Eq. 9

#### 4.2.3.7 Análise do perfil das soluções extrativas e teor de isoquercitrina por Cromatografia Líquida de alta eficiência

Empregando o método por CLAE desenvolvido e validado para a solução extrativa foi determinado o perfil e o teor de isoquercitrina na *solução amostra* (item 4.2.1.4).

Além de analisar o perfil da DV, foram injetados alguns padrões na tentativa de identificar os picos cromatográficos além da isoquercitrina. Os padrões foram diluídos em metanol. Foram testados a luteolina 50 µg/mL, ácido cafeico 40 µg/mL, coregosina 20 µg/mL, verbascosídeo 10 µg/mL, ácido clorogênico 10 µg/mL, cinarina 50 µg/mL, glochidona 50 µg/mL, ácido salicílico 50 µg/mL, ácido betulínico 50 µg/mL, acetato alfa e beta amirina 50 µg/mL; solazodina 50 µg/mL e quercetina 50 µg/mL.

#### 4.2.4 Obtenção e caracterização do extrato seco (ES) obtido por *spray dryer*

A SE caracterizada conforme item 4.2.3 foi concentrada em rotavaporador na temperatura de 60 °C, visando eliminar 70% do volume, visto que o *Spray Dryer* tolera até 20% de etanol. Para facilitar a remoção do extrato concentrado, foi adicionado ao balão cerca de 10 mL de etanol.

A secagem da solução concentrada foi realizada com sistema aberto de secagem, modo pneumático. O fluido de alimentação foi constituído da SE reduzida adicionada de dióxido de silício coloidal como adjuvante de secagem, na proporção de 20%, calculada em relação ao extrato seco final. Após a concentração e a adição do adjuvante obteve-se um teor de sólidos totais de 10,46% (m/V).

A dispersão foi realizada sob agitação durante 40 min, e mantida constante durante todo o processo de atomização. Foram fixadas a temperatura de entrada (170 °C), o fluxo de alimentação (4 mL/min), pressão do ar (5 bar), bem como o fluxo do ar comprimido (400 NL/h) e a aspiração (90%). A temperatura de saída foi controlada (81 °C). A secagem intermitente foi realizada até que a diferença de pressão do ar de exaustão fosse de -20 mbar, indicativa da saturação do filtro. O lote obtido foi analisado quanto às análises físico-químicas e microbiológicas.

#### 4.2.4.1 *Rendimento*

O rendimento do processo de secagem do ES foi determinado e expresso em percentual, considerando a massa total obtida, em relação ao esperado (resíduo seco da *solução extrativa* + quantidade adicionada de adjuvante).

#### 4.2.4.2 *Microscopia eletrônica de varredura*

O ES foi analisado em microscópio eletrônico de varredura Philips XL30. Para tanto, as partículas secas foram recobertas com uma fina camada de ouro, e submetidas à visualização com aumentos de 1000 e 2000 vezes.

#### 4.2.4.3 *Características organolépticas*

As características organolépticas do ES foram analisadas quanto ao aspecto, cor e odor através de visualização e percepção direta (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010).

#### 4.2.4.4 *Perda por dessecação*

A determinação da perda por dessecação foi realizada em triplicata, a partir de cerca de 500 mg de ES, em balança de secagem por infravermelho (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010). O limite máximo aceitável seria de 5% (LIST; SCHMIDT, 1989).

#### 4.2.4.5 *Cromatografia em camada delgada (CCD)*

Para aplicação na cromatoplaça, foi utilizada a SES (item 4.2.1.5), obedecendo a proporção de resíduo seco da SE de origem. O volume reconstituído foi tratado e aplicado nas mesmas condições descritas no item 4.2.3.5.

#### 4.2.4.6 *Avaliação da pureza microbiológica*

Foi realizada conforme descrito no item 4.2.2.4, pesando-se 1 g de ES em balança semianalítica e 99 mL de Tampão fosfato pH 7,2 estéril. Desta solução (diluição  $10^{-2}$ ) foi realizada a contagem de bactérias aeróbias totais, fungos e leveduras. As análises de *Salmonella ssp*, *Escherichia coli* e bactérias gram-negativas bile-tolerantes foram realizadas conforme descrito no item 4.2.2.4, utilizando 10 g do ES para cada análise.

Os limites microbianos utilizados estão descritos no Quadro 8.

**Quadro 8.** Limites microbianos para o controle de qualidade de extrato seco de acordo com a Farmacopéia Britânica (2008) e Farmacopéia Brasileira (2010).

Referências	TAMC (UFC/g)	TYMC (UFC/g)	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella spp.</i>	BTGNB
<b>F. Britânica (Categoria C)</b>	10 <sup>5</sup> (Máx: 5 x 10 <sup>5</sup> )	10 <sup>4</sup> (Máx: 5 x 10 <sup>4</sup> )	Ausência	Ausência	10 <sup>4</sup>
<b>F. Brasileira (extrato seco)</b>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	Ausência	Ausência	-

TAMC= Contagem de bactérias mesófilas; TYMC= Contagem de fungos e leveduras; BTGNB= Bactérias gram-negativas bile-tolerantes; UFC= unidade formadora de colônias.

Todas as análises microbiológicas citadas foram realizadas com o dióxido de silício coloidal, utilizada para compor o ES.

Neste estudo, os limites microbianos para o ES foram baseados nos parâmetros estabelecidos pela Farmacopéia Britânica (2008) e Farmacopéia Brasileira (2010) (Quadro 9).

**Quadro 9.** Limites microbianos para o controle de qualidade de matéria-prima de acordo com a Farmacopéia Britânica (2008) e Farmacopéia Brasileira (2010).

Referências	TAMC (UFC/g)	TYMC (UFC/g)	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella spp.</i>	<i>S. aureus</i>
<b>F. Britânica (Categoria 3A*)</b>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	Ausência	-	-
<b>F. Brasileira (**)</b>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	Ausência	Ausência	Ausência

TAMC= Contagem de bactérias mesófilas; TYMC= Contagem de fungos e leveduras; \*=preparações orais; \*\*=substâncias para uso farmacêutico; UFC = unidade formadora de colônias.

#### 4.2.4.7 Determinação do pH

A determinação do pH foi realizada em pHmetro calibrado com soluções tampão de fosfato e acetato, pH 7,0 e 4,0, respectivamente. Foi medido 100 mL da *solução extrato seco estoque* (ESE) e transferido para um béquer de 150 mL, com agitação constante. O resultado foi calculado pela média de três determinações (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010).

#### 4.2.4.8 *Análise do perfil do extrato seco e teor de isoquercitrina por Cromatografia líquida de alta eficiência*

Empregando o método por CLAE desenvolvido e validado para a SE foi determinado o perfil do ES e o teor do marcador na SES preparado conforme descrito no item 4.2.1.5.

#### 4.2.4.9 *Fotoestabilidade do extrato seco*

Foram preparadas 3 placas de Petri contendo 0,80 g do ES e expostas à 1,2 milhões de lux. hora, sendo uma delas revestida com um papel laminado para controle. Outras 3 placas de Petri contendo 0,8 g de ES foram expostos à uma energia de ultravioleta próxima de 200 watt horas/m<sup>2</sup>, sendo uma delas revestida com papel laminado para controle. As placas foram alocadas em uma Câmara de Fotoestabilidade (Mecalor<sup>®</sup>, EC/0,2/R-F). Após a exposição, foram preparadas as *soluções extrato seco estoque* (ESE) e em seguida, as *soluções extrato seco* (SES) conforme diluições descritas no item 4.2.1.5. Antes da injeção no cromatógrafo, a SES foi filtrada com filtro de celulose regenerada de porosidade 0,45 µm diretamente para um vial e injetadas em duplicata no cromatógrafo.

### **4.2.5 Estudos de estabilidade da droga vegetal (DV) e do extrato seco (ES)**

A DV foi submetida aos estudos de estabilidade acelerada e longa duração (BRASIL, 2005). Para cada uma das condições, foram utilizadas amostras (5 g) da DV, em unicata. As amostras foram embaladas em sacos de polietileno revestidos por papel pardo. O ES também foi submetido aos mesmos estudos de estabilidade. Foi utilizada alíquota de 4,0 g, em unicata.

No estudo de estabilidade acelerada (40 °C ± 2 °C, 75% ± 5% UR), a DV e o ES foram submetidos ao tempo zero, 45 dias, 90 dias e 135 dias. No tempo zero a DV foi analisada quanto aos itens 4.2.2.1, 4.2.2.3 a 4.2.2.7 e o ES quanto aos itens descritos em 4.2.4.3 a 4.2.4.8. Nos tempos 45 dias, 90 dias e 135 dias, a avaliação foi realizada através das características físico-químicas (perda por dessecação, pH, teor por CLAE). A análise do tempo de 180 dias não foi contemplada neste estudo devido à problemas na câmara climática.

Para o estudo de longa duração (30 °C ± 2 °C, 75% ± 5% UR), a DV e o ES foram submetidos ao tempo zero, 45 dias, 90 dias, 135 dias e 180 dias. No tempo

zero foi realizada análise dos itens descritos em 4.2.2.1, 4.2.2.3 a 4.2.2.7 (droga vegetal) e 4.2.4.3 a 4.2.4.8 (extrato seco). Nos tempos 45 dias, 90 dias, 135 dias e 180 dias, a avaliação foi realizada através das características físico-químicas (perda por dessecação, pH, teor por CLAE). As análises nos tempos de 270 dias, 360 dias, 540 dias e 720 dias serão realizadas futuramente.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Desenvolvimento e validação do método analítico para quantificação da isoquercitrina por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

No desenvolvimento de um método de análise por CLAE, assim como qualquer técnica analítica, é necessário planejar e executar a sua validação para garantir que o mesmo seja exato, específico, reprodutível e resistente dentro da variação especificada na qual a substância em exame será analisada (HARRIS, 2008).

Buscou-se desenvolver um método analítico por CLAE que demonstrasse o perfil cromatográfico da SE de *I. pes-caprae brasiliensis* (L.) R. Br., além de quantificar o marcador selecionado, a isoquercitrina, bem como demonstrar se o método é indicativo de estabilidade da amostra em análise, visando o seu emprego no estudo de estabilidade dos derivados vegetais e fitoterápicos. Foram realizados vários testes (cerca de 90 sistemas gradientes foram testados) usando colunas diferentes, composição e pH das fases móveis, além de alterações no fluxo e temperatura da análise (Tabela 1), porém o método que resultou em melhor separação dos compostos e estabilização do sistema cromatográfico foi o gradiente 47 (Tabela 2).

**Tabela 1.** Sistemas gradiente e isocrático testados em CLAE.

Gradiente*	A (%)	B (%)	C (%)	Tempo (min)	Fluxo (mL/min)	Temperatura (°C)
1**	75	12,5	12,5	30	0,8	35
	60	20	20	20		
2	95	5	-	0	0,8	35
	0	100		30		
3 ***	95	5	-	0	0,8	35
	0	100		30		
	95	5		32-35		
	95	5		0-2		
4 ***	70	30	-	6	0,8	35
	50	50		12-15		
	0	100		25		
	95	5		27-30		
5 ***	90	4	6	0	0,8	35
	10	40	60	20		
	10	90	0	25		
	90	4	6	30		
6****	50	50	-	40	1,0	35
	60	40		40		
7 ***	60	40	-	40	1,0	35
	60	40		40		
8 ***	60	40	-	40	2,0	35
	95	5		0		
9 *****	65	35	-	10	1,0	30
	60	40		13		
	55	45		15		
	15	85		17		
	0	100		25		
	95	5		27-30		
	95	5		0		
10 ****	65	35	-	10	1,0	30
	55	45		15		
	0	100		25		
	95	5		27-30		

\*Comprimento de onda=254 nm, volume de injeção de 20 µL; A: água acidificada pH 3,0 (com ácido acético), B: Acetonitrila (ACN), C: Metanol (MeOH); \*\*A: água acidificada pH 3,2 (com ácido fórmico), B: ACN, C: MeOH; \*\*\*Solução extrativa preparada com ACN:H<sub>2</sub>O acidificada com ácido acético (50:50%); \*\*\*\*Solução extrativa preparada com ACN:H<sub>2</sub>O acidificada com ácido acético (40:60%), coluna C8 X-Bridge® (5 µm, 250 x 4,60 mm); \*\*\*\*\*Solução extrativa preparada com MeOH:H<sub>2</sub>O acidificada com ácido acético (50:50%).

**Tabela 2.** Gradiente da fase móvel do método validado por CLAE.

Gradiente	A (%)	B (%)	Tempo (min)	Fluxo (mL/min)	Temperatura (°C)
	90	10	0		
	85	15	7		
47*	80	20	18-25	1,0	30
	75	25	40		
	40	60	43-47		
	90	10	50-60		

\*Coluna C18 Luna<sup>®</sup> (5 µm, 250 x 4,60 mm); A = Água acidificada com ácido sulfúrico R pH 3,0; B = Acetonitrila; comprimento de onda = 254 nm; volume de injeção de 20 µL.

O método de análise por CLAE, utilizando gradiente, desenvolvido por Soares (2008) para o doseamento de ISO na SE de *I. pes-caprae* não apresentou reprodutibilidade dos cromatogramas entre as injeções devido a instabilidade da pressão. Sendo assim, Adriano (2009) optou por aumentar o tempo de corrida para que a pressão mantivesse estável no início de cada injeção realizada. No entanto, a autora encontrou problemas em relação à saturação de coluna e resolução, entre outros.

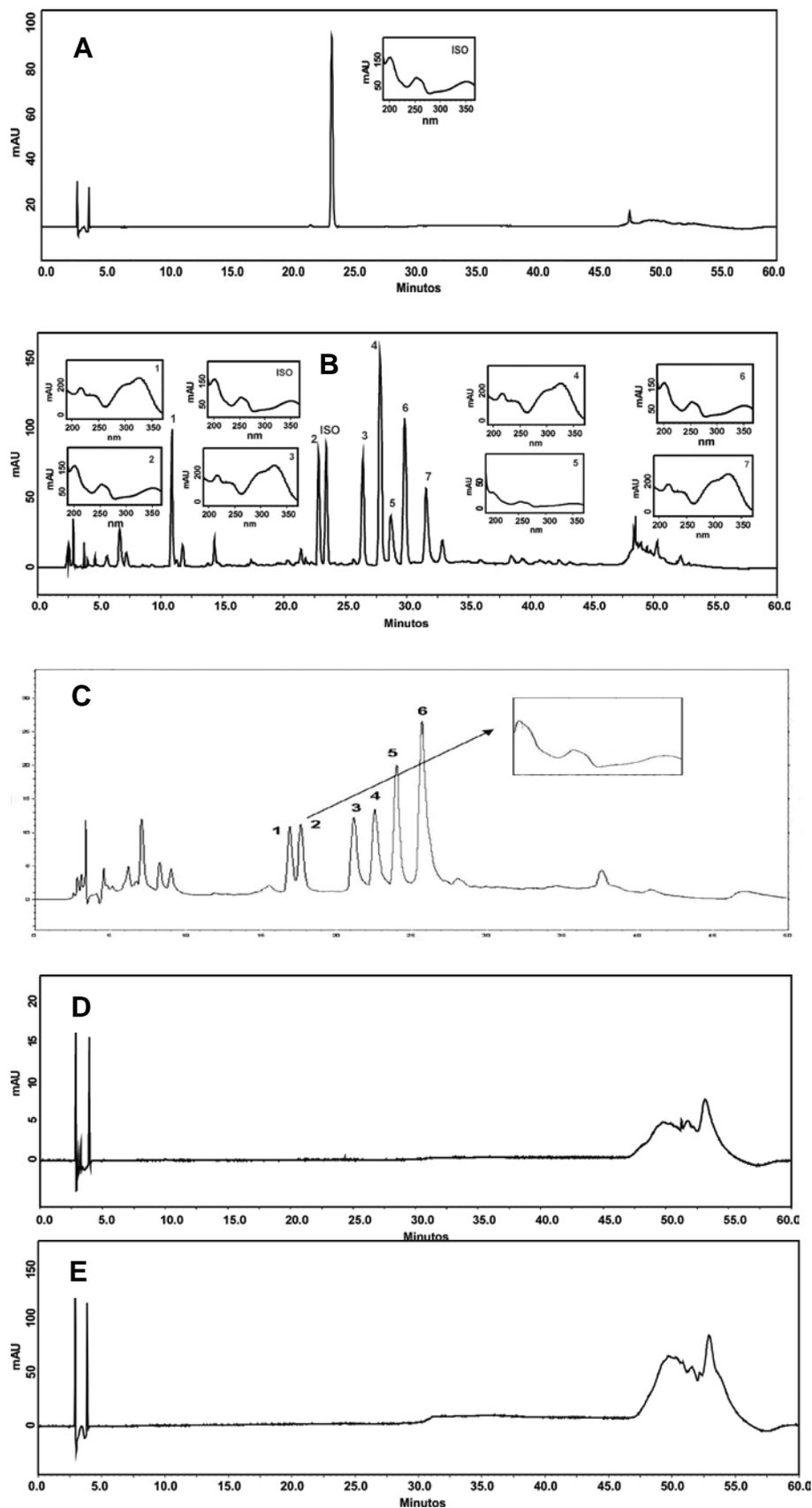
Desta forma, o método proposto por Soares (2008) e adaptado por Adriano (2009) foi otimizado no presente estudo, com o intuito de melhorar sua reprodutibilidade e resolução entre os picos e validado conforme as normas oficiais (BRASIL, 2003). Foi empregado o comprimento de onda de 254 nm para monitorar outros compostos fenólicos, além dos flavonoides, embora o detector (arranjo de fotodiodos) permitisse a análise do perfil completo de absorção no UV. O emprego de uma substância padrão como referencial da eficiência do método permite a separação e quantificação com seletividade de substâncias numa mistura complexa, como no caso de extratos vegetais (PAVEI, 2004). Desta forma, neste estudo foi utilizado o padrão de ISO como substância de referência (*solução padrão*) que eluiu em aproximadamente 24 min (Figura 7A). A *solução amostra* (Figura 7B), apresentou após os 20 min, além do pico correspondente ao marcador mais 2 picos com perfil de absorção característicos de flavonoides, ou seja, com três máximas (picos 2 e 6). Foi verificado em alguns cromatogramas da SE e ES, a ausência ou deslocamento do pico 5, posicionando-se entre o 4° e o 6° pico ou entre o 6° e o 7° pico. Esta variabilidade pode indicar tratar-se de uma substância com pKa muito próximo ao pH da fase móvel, que dependendo do pH exato da fase móvel, encontra-se em diferentes estados de ionização, afetando sua interação com a fase

estacionária. Tal fato indica a necessidade de otimizar o método analítico futuramente a fim de melhorar sua reprodutibilidade.

O método apresentou resolução maior que 2,0 entre o marcador e o pico adjacente e boa resolução entre os demais picos no cromatograma, evidenciando uma melhoria no método, em relação ao demonstrado anteriormente (Figura 7C) (ADRIANO, 2009). A Figura 7C mostra o perfil cromatográfico da SE obtido no estudo realizado por Adriano (2009). O cromatograma apresentou 6 picos majoritários. Apenas 2 deles (picos 1 e 2) apresentaram perfil característico de flavonoides. O pico 2 corresponde ao padrão de ISO eluindo em aproximadamente 17 min com resolução inferior ao obtido no presente trabalho. O teor de ISO na SE correspondeu a 3,1 mg/g, considerando um resíduo seco de 2,30%. Portanto a metodologia desenvolvida apresentou número maior de picos no cromatograma com melhor resolução entre eles.

Foi observada uma boa reprodutibilidade no perfil cromatográfico em injeções repetidas, sem problemas de alteração de pressão ou entupimento do sistema conforme relatado em trabalhos anteriores. O índice de pureza do pico do marcador, medido pelo detector de arranjo de diodos foi igual a 1,0, evidenciando a seletividade do método. Tentativas de diminuir o tempo de análise foram realizadas, porém ocasionaram co-eluição de alguns picos. A força da fase móvel no início da corrida também foi aumentada em alguns testes, no sentido de abreviar a análise, porém ocasionaram a co-eluição dos picos iniciais, sendo necessários 60 min de corrida para uma boa estabilização do sistema.

A seletividade do método é um importante parâmetro a ser avaliado para garantir que a quantificação do analito de interesse não seja afetada pela presença dos demais metabólitos secundários, produtos de degradação e demais compostos presentes na amostra. Desta maneira, a seletividade foi demonstrada pela resolução adequada dos picos, pela ausência de interferência do solvente (Figura 7D) e do próprio gradiente de fase móvel (Figura 7E).



**Figura 7.** A) Cromatograma do padrão de isoquercitrina a 25 µg/mL; B) Cromatograma da SA; C) Cromatograma da SE obtido por Adriano (2009); D) solvente; E) fase móvel em 254 nm.

Adicionalmente, a seletividade foi investigada realizando testes de degradação forçada na amostra, para verificar se os produtos de degradação poderiam interferir na quantificação do marcador e com os demais picos detectados na amostra original (não degradada). Estes testes foram realizados para investigar a estabilidade intrínseca da amostra, sua labilidade frente aos diferentes agentes estressantes e direcionar os cuidados a serem tomados na elaboração dos fitoterápicos e escolha das embalagens. Como mostra a Tabela 3, nos testes realizados em temperatura ambiente, o HCl 0,1 M, 4h e o NaOH 0,01 M com posterior neutralização degradaram aproximadamente menos que 5% o marcador.

Observou-se que o aumento do tempo de exposição ao HCl ou o aquecimento mesmo em períodos curtos, intensificaram a degradação da maioria dos compostos e proporcionaram um aumento na área do pico de ISO (Tabela 3), possivelmente devido a co-eluição de produtos de degradação. Na condição de hidrólise ácida não foi possível observar a degradação dentro da faixa preconizada entre 5 e 15% devido ao problema da co-eluição.

Na exposição da amostra ao álcali, foi verificado que a neutralização afeta a análise, provavelmente por interferir no grau de dissociação das moléculas. Após neutralizar, o marcador apresentou cerca de 10% de degradação (Tabela 3). Na degradação alcalina, os produtos de degradação, embora não tenham sido visualizados no cromatograma, parecem não co-eluir com a ISO denotando uma estrutura química diferenciada em relação à degradação ácida. O pico 4 corresponde à substância que sofreu maior degradação nesta condição (Tabela 3).

No caso da hidrólise neutra, embora o pico 6 tenha sofrido novamente a maior degradação (entre 10 e 15%), observou-se co-eluição e aumento de área em todos os demais picos do cromatograma (Tabela 3). O aumento do tempo da hidrólise intensificou a degradação do pico 6 e a co-eluição dos demais picos. O perfil de degradação na hidrólise neutra foi diferente das demais condições de estresse por apresentar aumento da área de quase todos os picos.

No estresse oxidativo, foi utilizada uma concentração de 30% de peróxido de hidrogênio por 3h, para proporcionar cerca de 5% de degradação no pico do marcador, sendo que o pico 6 novamente sofreu maior degradação. Nesta condição não foi observada aparente co-eluição (Tabela 3).

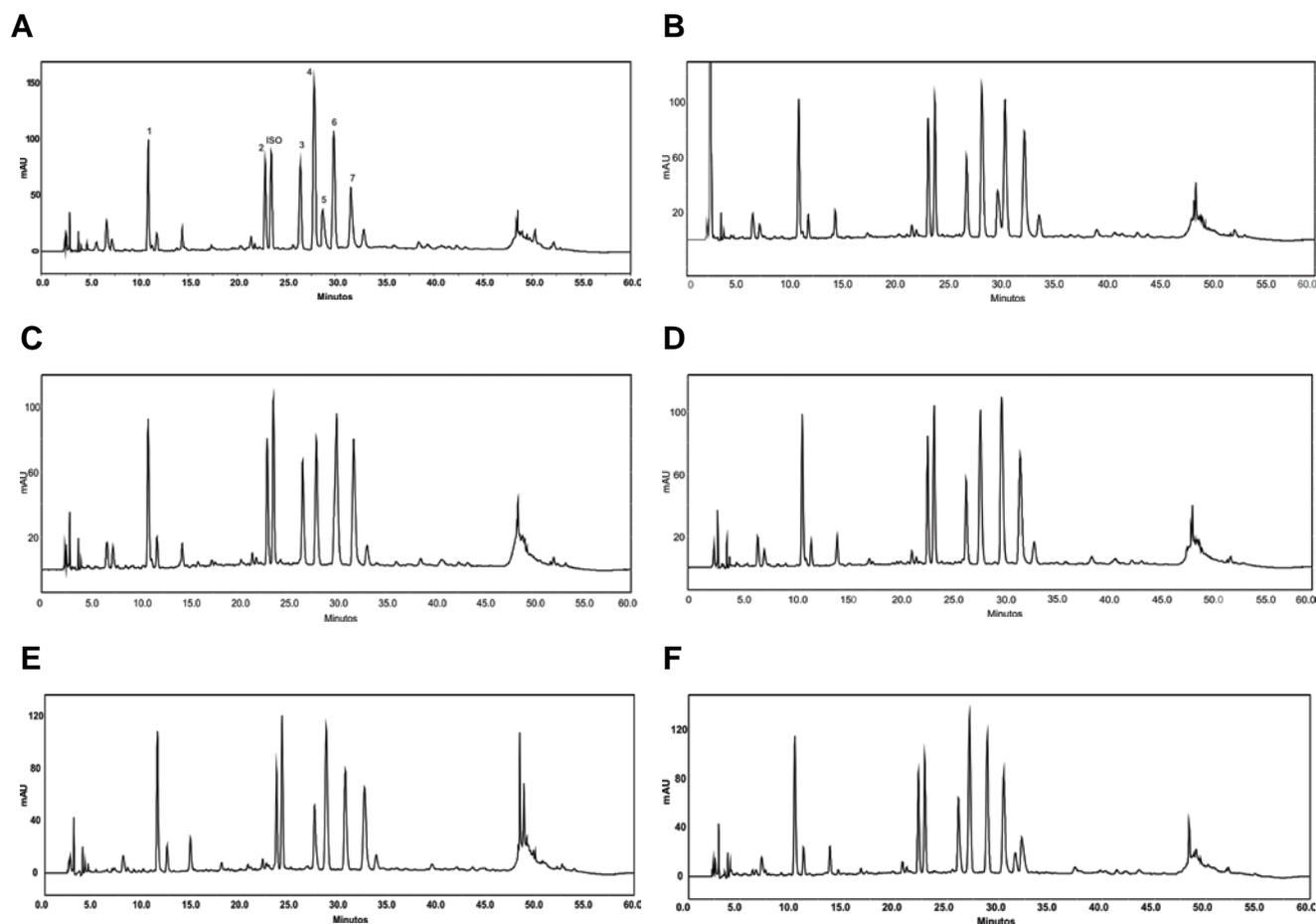
De modo geral, o pico 6 foi o que sofreu maior degradação em todas as condições testadas, porém sua estrutura química ainda não foi elucidada.

**Tabela 3.** Percentual remanescente de área de isoquercitrina na solução extrativa de *I. pes-caprae*, em relação a solução não degradada após testes de degradação forçada.

Condição de degradação	Áreas dos picos de interesse							
	pico 1 (DPR)	pico 2 (DPR)	pico Iso (DPR)	pico 3 (DPR)	pico 4 (DPR)	pico 5 (DPR)	pico 6 (DPR)	pico 7 (DPR)
HCl 0,1 M 4 h	94,90 (0,16)	91,15 (0,01)	96,21 (0,08)	84,96 (4,37)	86,05 (0,18)	N	<b>74,92</b> (0,02)	83,68 (1,04)
HCl 0,1 M 8 h	96,98 (0,12)	97,83 (0,18)	107,58 (0,39)	86,79 (0,14)	83,07 (0,10)	N	76,82 (0,58)	<b>72,52</b> (0,28)
HCl 0,1 M 5 min***	98,77 (0,10)	97,73 (0,16)	115,23 (0,17)	94,90 (0,22)	94,45 (0,40)	N	<b>77,30</b> (0,21)	93,11 (0,17)
HCl 0,1 M 15 min***	98,34 (0,11)	90,76 (0,24)	117,35 (0,11)	92,89 (0,15)	92,80 (0,32)	N	<b>71,15</b> (0,28)	92,42 (0,11)
H <sub>2</sub> O 5 min***	105,29 (0,20)	103,60 (0,16)	105,15 (0,25)	104,34 (0,36)	102,68 (0,11)	116,93 (0,10)	<b>89,46</b> (0,17)	105,21 (0,26)
H <sub>2</sub> O 15 min***	103,88 (0,13)	101,49 (0,12)	101,01 (0,26)	102,40 (0,22)	98,64 (0,36)	108,83 (0,10)	<b>86,90</b> (0,20)	106,58 (0,19)
NaOH 0,01M 4 h*	92,10 (0,10)	85,86 (0,06)	97,19 (0,35)	100,75 (3,99)	<b>67,23</b> (0,53)	N	75,95 (0,14)	92,55 (0,18)
NaOH 0,01M 4h**	90,70 (0,20)	89,15 (0,48)	89,55 (0,48)	95,26 (0,59)	<b>86,40</b> (0,62)	N	88,09 (1,34)	93,64 (0,48)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30% 3 h	95,90 (0,21)	94,88 (0,02)	94,57 (0,03)	98,77 (0,05)	95,18 (0,11)	N	<b>84,05</b> (2,94)	95,38 (0,04)

\*solução neutralizada com NaOH 0,1 M; \*\*sem neutralização; Iso= isoquercitrina; \*\*\*com aquecimento; N= não detectado.

Na figura 8, foram demonstrados os perfis cromatográficos obtidos antes e após os testes de estresse. A Figura 8A corresponde ao perfil cromatográfico da SA não degradada. Nas condições de degradação selecionadas, em temperatura ambiente, não foi observada alteração significativa no perfil cromatográfico ou picos suplementares após os testes, mesmo em 338 nm (dados não mostrados). Foi verificada a ausência do pico 5 nas amostras degradadas o qual pode ter co-eluído com outros picos, exceto na hidrólise neutra na qual este pico eluiu entre os picos 6 e 7 (Tabela 3 e Figura 8).



**Figura 8.** A) Cromatograma da solução extrativa a 3,86 mg/g, em 254 nm B) estresse oxidativo, 3h; C) hidrólise alcalina, 4h com neutralização; D) hidrólise ácida, 4h; E) hidrólise ácida, 15 min com aquecimento; F) hidrólise neutra, 15 min com aquecimento.

A linearidade é a capacidade da metodologia analítica demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra em um intervalo especificado (BRASIL, 2003). O ensaio de linearidade foi realizado através da elaboração de uma curva analítica para o padrão, uma para a solução extrativa e outra para solução extrativa adicionada de padrão.

Após análise por CLAE, os valores de áreas obtidos foram plotados com as respectivas concentrações e foi calculada a equação da reta através da análise de regressão linear, conforme a Figura 9.

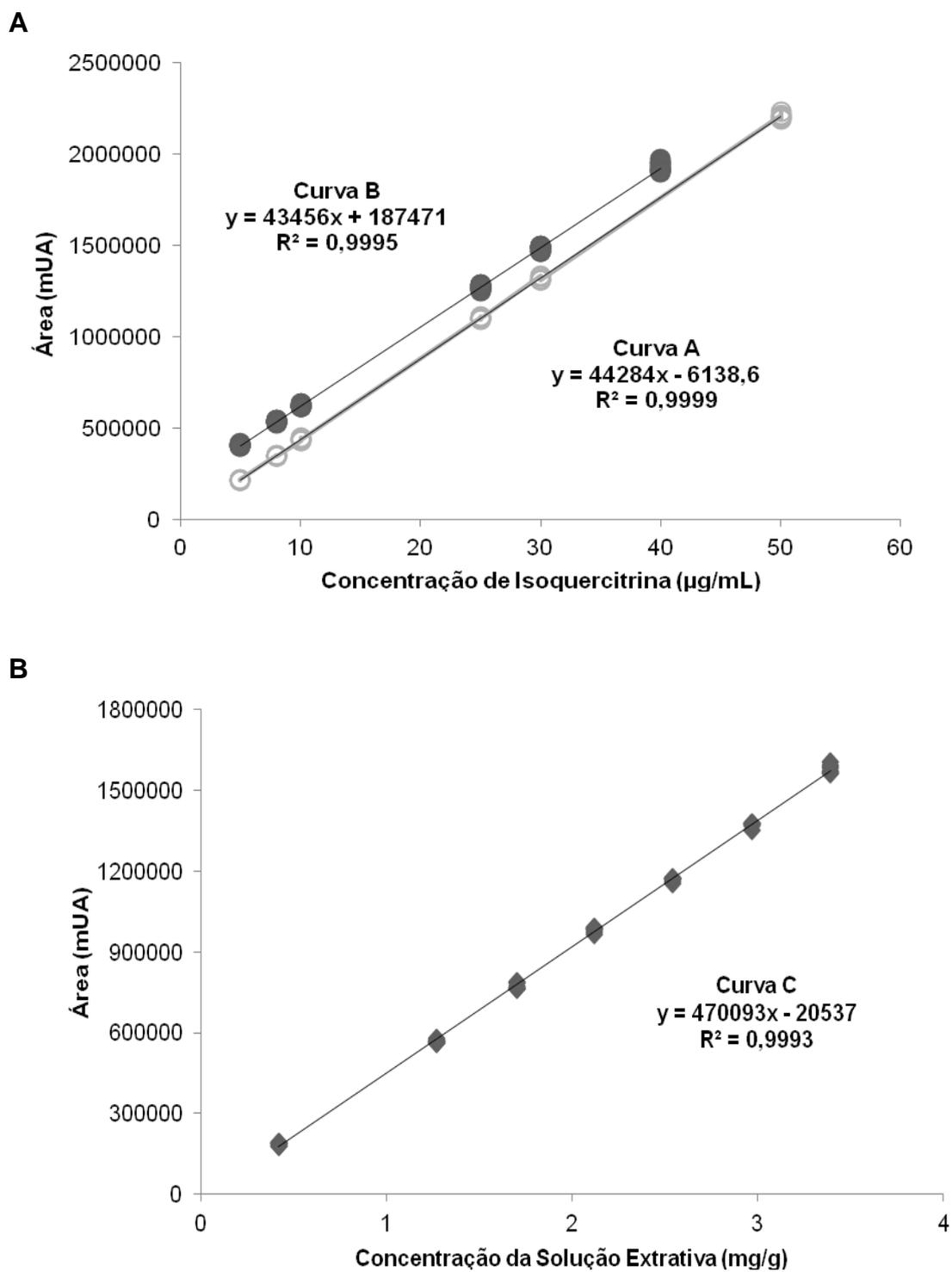
A SE apresenta uma concentração de cerca de 25,0 µg/mL de ISO, dentro da faixa de linearidade de 5-50 µg/mL, demonstrada na Curva A (Figura 9A), portanto a concentração alvo de 25 µg/mL foi utilizada para a validação do presente método para fins de doseamento da SE de *I. pes-caprae*. O coeficiente de determinação ( $r^2$ ) calculado para a curva analítica da ISO (curva A) foi de 0,9999 conforme Figura 9A e Tabela 4. O  $r^2$  permite estimar a qualidade da curva obtida, pois quanto mais

próximo a 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. Outro elemento importante para a correspondência da linearidade é o valor de  $F_{\text{calculado}}$  (267997,03) muito superior ao  $F_{\text{crítico}}$  ( $7,7451 \times 10^{-68}$ ), demonstrando a elevada significância do modelo linear. Além disso, o  $F_{\text{crítico}}$  e o valor de  $P$  (0,010521) são menores do que 0,05, se ajustando bem aos dados e confirmando que a reta tem inclinação. Desta maneira, pode-se afirmar que a curva analítica da ISO possui uma relação linear fortemente positiva, onde a influência é tal que tende a aumentar a área conforme aumenta a concentração do marcador. Porém, o limite de confiança não inclui o zero, demonstrando erro sistemático constante. A inspeção dos resíduos na curva A (Figura 10A) demonstrou que a concentração de 50  $\mu\text{g/mL}$  apresenta uma variabilidade maior, porém a concentração alvo corresponde a 50% desta concentração.

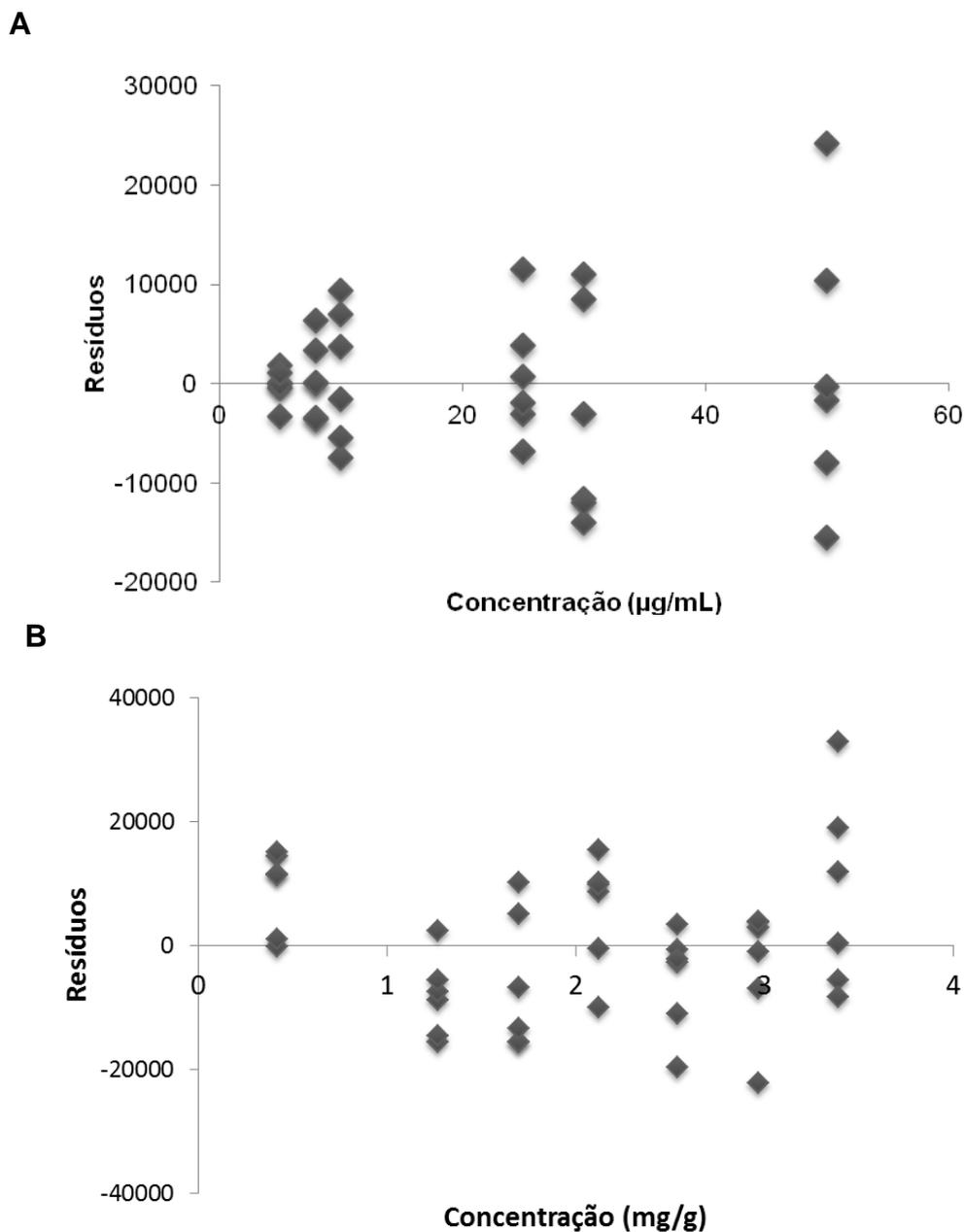
Para a Curva B, de SA adicionada de padrão, na faixa de 5-40  $\mu\text{g/mL}$ , o  $r^2$  foi de 0,9995 conforme a Figura 9A e Tabela 4. O coeficiente angular das curvas A e B correspondem a 44284 e 43456, respectivamente, demonstrando que são paralelas e portanto não há interferência da matriz na linearidade do método.

Para a Curva C, de RS na faixa de 0,4-3,5 mg/g o  $r^2$  foi de 0,9993 conforme Figura 9B e Tabela 4. A SE apresenta um RS cerca de 3,0%, o qual se encontra dentro da faixa de linearidade observada na Curva C (Figura 9B). Para esta curva o valor de  $F_{\text{calculado}}$  (59867,93) é muito superior ao  $F_{\text{crítico}}$  ( $3,88909 \times 10^{-65}$ ), demonstrando a elevada significância do modelo linear. Além disso, o  $F_{\text{crítico}}$  e o valor de  $P$  ( $2,89772 \times 10^{-5}$ ) são menores do que 0,05, se ajustando bem aos dados e confirmando que a reta tem inclinação diferente de zero. Desta maneira, pode-se afirmar que a curva analítica possui uma relação linear fortemente positiva, onde a influência é tal que tende a aumentar a área conforme aumenta a concentração do marcador. A Figura 9B evidencia a linearidade do método para a solução extrativa, porém, o limite de confiança não inclui o zero, demonstrando erro sistemático constante (Figura 10B).

O desvio padrão relativo de todas as áreas obtidas em todas as curvas não ultrapassou 2,0%, exceto o primeiro ponto analisado da Curva C que alcançou um valor de 3,61%. No entanto a Curva C está bem ajustada demonstrando linearidade em toda a faixa de concentração testada, com variância constante e ausência de amostras atípicas (Figura 10B).



**Figura 9.** A) Curva analítica do padrão de isoquercitrina a 25  $\mu\text{g/mL}$  - curva A e da solução extrativa adicionada do padrão - curva B; B) Curva da solução extrativa de *I. pes-caprae* a 11,80 mg/g - curva C.



**Figura 10.** Gráficos dos resíduos no modelo quadrático: A) Curva da linearidade do padrão -curva A; B) Curva da linearidade da solução extrativa -curva C.

Após a elaboração da curva analítica pela análise de regressão linear foram calculados os limites de quantificação e de detecção para o marcador, conforme a Tabela 4.

**Tabela 4.** Análise estatística para o cálculo de LD e LQ da isoquercitrina e coeficientes angulares e lineares, valor de P e  $r$  das Curvas A, B e C.

	Coef. linear	Coef. angular	$r^2$	Valor de P	LQ ( $\mu\text{g/mL}$ )	LD ( $\mu\text{g/mL}$ )
<b>Isoquercitrina (curva A)</b>	- 6138,6	44284	0,9999	0,010521	3,07	0,92
<b>Adição de Iso na matriz (curva B)</b>	+ 187471	43456	0,9995	$2,24 \times 10^{-66}$	-	-
<b>Solução extrativa (curva C)</b>	- 20537	470093	0,9993	$2,90 \times 10^{-05}$	-	-

LD= Limite de Detecção; LQ= Limite de Quantificação;  $r^2$ = coeficiente de determinação.

A exatidão do método foi realizada após o estabelecimento da linearidade e do intervalo linear. A legislação exige que, no mínimo, nove determinações devem ser realizadas para o ensaio de exatidão, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, três concentrações (baixa, média e alta) com três réplicas cada (BRASIL, 2003; INTERNATIONAL..., 2005). Desta maneira, a exatidão foi determinada a partir de 3 concentrações (10, 25 e 40  $\mu\text{g/mL}$  para SE e 10, 20 e 30  $\mu\text{g/mL}$  para ES), com três réplicas cada, injetadas em duplicata, contemplando os níveis da faixa linear do método, até 40  $\mu\text{g/mL}$ .

A exatidão do método foi determinada através do ensaio de adição do padrão (item 4.2.1.6.4) e expressa por meio do percentual de recuperação do marcador isoquercitrina. A Tabela 5 demonstra estes resultados.

A análise estatística ratificou pelo Teste F, que a porcentagem de recuperação não difere entre as concentrações analisadas, com valor de  $p > 0,05$ .

De acordo com Huber (2001), os resultados estão dentro da faixa de recuperação de 97-103% estabelecida como aceitável para os níveis de concentrações da amostra (cerca de 1%), indicando que a matriz não sofre influência de eventuais interferentes para a solução extrativa tal qual para o extrato seco. Os resultados também atendem às especificações de Green (1996) e Harris (2008) que estabelecem uma faixa de recuperação de  $100 \pm 2\%$ .

**Tabela 5.** Análise estatística para a determinação de exatidão, como percentual de recuperação do método para quantificação de isoquercitrina em solução extrativa e extrato seco de *I. pes-caprae*.

Concentração Teórica ISO ( $\mu\text{g/mL}$ )	Concentração Prática ISO ( $\mu\text{g/mL}$ ) (DPR)	Percentual de Recuperação (%)
10*	9,99 (1,68)	99,90
25*	24,64 (1,11)	98,56
40*	39,56 (1,32)	98,90
10**	9,98 (0,12)	98,87
20**	20,40 (0,05)	101,99
30**	29,66 (0,97)	99,80

\*solução extrativa; \*\*extrato seco; ISO= isoquercitrina; DPR=desvio padrão relativo.

Para a determinação da precisão, optou-se por trabalhar com a SA e SES de *I. pes-caprae* preparadas em sextuplicadas a 100% da concentração teste, o que corresponde a uma concentração de 25  $\mu\text{g/mL}$ , injetadas em duplicata (BRASIL, 2003; INTERNATIONAL..., 2005; HARRIS, 2008). O ensaio foi realizado a partir da SE com resíduo seco de 3,39% e extrato seco com perda por dessecação de 4,11%.

Foi observado que o método possui ótima precisão intra-ensaio, pois o DPR foi de 1,55% para o pico do marcador na SA e 1,53% para o pico no marcador na SES, valor muito abaixo do preconizado pela ANVISA (BRASIL, 2003) (Tabela 6), que é de 15% para ensaios bioanalíticos, enquadrando-se no valor de 5,0% determinado para ensaios analíticos. Huber (2001) preconiza um limite de 2,7% de DPR para precisão no nível de concentração do analito de 1%.

Para a precisão intermediária do método, o mesmo analista repetiu o experimento anterior em um segundo dia, utilizando a mesma instrumentação. O resultado mostra adequada precisão inter-ensaio, com DPR máximo de 2,29% para a SA e 2,08% para a SES, abaixo dos valores preconizados pela ANVISA (Tabela 6) (BRASIL, 2003).

Estatisticamente, as médias são significativamente diferentes quando analisadas pelo Teste T, apresentando valor de P unicaudal =  $p < 0,05$ . Esta diferença pode ser explicada pelas variações da própria droga vegetal e extrato seco, já que o equipamento demonstrou excelente precisão em cada análise.

**Tabela 6.** Análise estatística para a determinação da precisão inter e intra-ensaio para a quantificação de isoquercitrina em solução extrativa e extrato seco de *I. pes-caprae*.

Precisão	Teor médio de ISO ( $\mu\text{g/mL}$ )	Teor médio de ISO (mg/g)
<b>Repetibilidade*</b>	24,14	3,43
<b>s*</b>	0,37	0,05
<b>DPR (%)*</b>	1,55	1,55
<b>Precisão Intermediária*</b>	24,86	3,53
<b>s*</b>	0,57	0,08
<b>DPR (%)*</b>	2,29	2,29
<b>Repetibilidade**</b>	24,31	10,14
<b>s**</b>	0,37	0,16
<b>DPR (%)**</b>	1,54	1,53
<b>Precisão Intermediária**</b>	23,66	10,17
<b>s**</b>	0,49	0,21
<b>DPR (%)**</b>	2,06	2,08

\*solução extrativa; \*\*extrato seco; s= desvio padrão; DPR=desvio padrão relativo; ISO=isoquercitrina.

Segundo Ribani et al. (2004) a robustez de um método mede a sensibilidade que este apresenta face a pequenas variações. Um método é considerado robusto quando não é afetado por uma modificação pequena e deliberada em seus parâmetros. A robustez do método proposto foi avaliada a partir de uma SE com resíduo seco de 3,30%, perante a discreta variação de parâmetros descritos no item 4.2.1.6.6, analisando-se o tempo de retenção dos marcadores, assimetria dos picos, resolução e o teor do marcador em mg/g na droga vegetal. A Tabela 7 demonstra estes resultados que foram tomados no mínimo em triplicata de cada condição, com detecção em 254 nm.

Como pode-se observar na Tabela 7, estatisticamente, a maioria das variações impostas no método proporcionaram diferença significativa, com valores de  $p < 0,05$ , entretanto, o DPR calculado para cada parâmetro cromatográfico, nas variações de pH da fase móvel, estabilidade das soluções, temperatura, solução diluente e lote da coluna, apresentou valores menores do que 3,0%, mostrando que o método pode ser considerado robusto frente à pequenas e deliberadas variações. Cabe ressaltar que o teor dos marcadores não demonstrou ser afetado pelas variações impostas, apresentando valores de DPR  $< 2,7\%$ , podendo ser considerado robusto.

Dentre as variações analisadas, a alteração de fluxo da fase móvel promoveu maior impacto nos parâmetros cromatográficos da análise, sendo que o DPR ficou acima de 8% nos parâmetros de área, tempo de retenção e teor de ISO. Os testes com fluxo e temperatura foram realizados em dias diferentes dos demais testes e portanto, sugere-se que a solução extrativa estava mais concentrada (Tabela 7). Snyder, Kirkland e Glajch (1997) comentam que alterações no fluxo e na temperatura influenciam na formação do pico e, conseqüentemente, o valor da área, mas sem alterar a precisão do método, porém no presente método houve alteração em relação ao teor determinado. Este parâmetro deve ser mantido sobre controle na aplicação do método.

**Tabela 7.** Análise estatística para a determinação da robustez do método para a quantificação de isoquercitrina em solução extrativa de *I. pes-caprae*.

Parâmetros	Média (%DPR <sub>intra</sub> )				
	Área	R <sub>t</sub> (min)	R	Teor (mg ISO /g DV)	
<b>Isoquercitrina*</b>					
<b>Temperatura (°C)</b>	29	1307317 (0,23)	23,711 (0,29)	2,12 (0,27)	4,22 (0,23)
	30	1284977 (0,20)	23,894 (0,23)	2,12 (0,47)	4,14 (0,20)
	31	1302353 (0,06)	23,774 (0,05)	2,14 (0,71)	4,20 (0,06)
% DPR <sub>entre</sub> valor de P	0,79 p<0,05	0,39 p<0,05	0,46 p>0,05	0,99 p<0,05	
<b>Fluxo (mL/min)</b>	0,9	1166443 (0,23)	27,327 (1,20)	2,14 (0,54)	3,76 (0,23)
	1,0	1043709 (0,52)	24,718 (0,13)	2,13 (0,27)	3,37 (0,52)
	1,1	967296 (0,33)	23,211 (0,24)	2,16 (0,71)	3,12 (0,33)
% DPR <sub>entre</sub> valor de P	9,49 p<0,05	8,30 p<0,05	0,71 p<0,05	9,44 p<0,05	
<b>pH da fase móvel</b>	2,88	1126867 (0,36)	25,889 (0,08)	2,12 (0,47)	3,63 (0,14)
	3,0	1123318 (0,05)	24,407 (0,03)	2,08 (0,28)	3,63 (0,05)
	3,1	1133985 (0,26)	25,405 (0,11)	2,10 (0,27)	3,66 (0,25)
% DPR <sub>entre</sub> valor de P	0,47 p>0,05	2,59 p<0,05	0,95 p<0,05	0,48 p<0,05	
<b>Solução diluente</b>	A	1134949 (2,14)	23,849 (0,24)	2,07 (0,24)	3,66 (2,13)
	B	1133873 (0,44)	23,854 (0,23)	2,06 (0,43)	3,66 (0,44)
	C	1152930 (2,78)	23,796 (0,31)	2,03 (0,39)	3,72 (2,76)
% DPR <sub>entre</sub> valor de P	2,23 p>0,05	0,28 p>0,05	0,92 p<0,05	0,94 p>0,05	
<b>Lote da coluna</b>	D	1123318 (0,05)	23,407 (0,03)	2,08 (0,28)	3,67 (0,17)
	E	1095399 (0,08)	23,795 (0,20)	2,07 (0,28)	3,54 (0,08)
% DPR <sub>entre</sub> valor de P	1,38 p<0,05	1,40 p<0,05	0,36 p>0,05	2,67 p<0,05	
<b>Estabilidade das soluções (h)</b>	0	1197182 (0,35)	24,056 (0,09)	2,06 (0,28)	3,86 (0,35)
	26	1196731 (0,24)	24,091 (0,48)	2,05 (0,28)	3,86 (0,24)
	48	1194204 (0,14)	23,881 (0,08)	2,05 (0,28)	3,85 (0,14)
	168	1146294 (0,69)	23,606 (0,45)	1,91 (0,30)	3,70 (0,69)
% DPR <sub>entre</sub> valor de P	1,93 p<0,05	0,48 p<0,05	0,26 p<0,05	2,36 p<0,05	

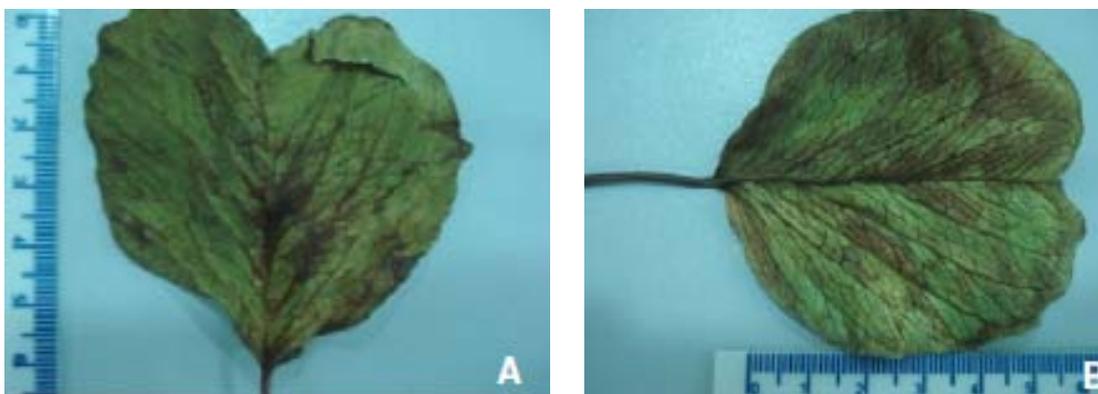
\*Resíduo seco da solução extrativa= 3,30%. R<sub>t</sub>= tempo de retenção; R= resolução; A= metanol:água purificada 50:50 (V/V); B= metanol:água acidificada pH 3,0 com ácido sulfúrico R 50:50 (V/V); C= metanol:água purificada 80:20 (V/V); D= coluna usual; E= coluna de lote diferente; ISO= isoquercitrina; DV=droga vegetal.

## 5.2 Caracterização da droga vegetal (DV)

Através de ensaios de controle de qualidade verifica-se a autenticidade da droga vegetal, sendo esta característica imprescindível no desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos (ADRIANO, 2009). Esta verificação pode ser realizada empregando ensaios de identificação macro e microscópicos, assim como ensaios físico-químicos e microbiológicos. Desta maneira, todas as análises listadas no item 4.2.2 foram realizadas.

A DV (lote 0911) constituída das partes aéreas (folhas e caules) de *I. pes-caprae brasiliensis* (L.) R. Br. foram avaliados segundo suas características macroscópicas, comparando-as com a exsicata da planta depositada no Herbário da HUEM, apresentando-se em conformidade.

Conforme descrito na literatura (CASTELANNI; SANTOS, 2006; ADRIANO 2009) e apresentado na Figura 11, as folhas de coloração verde-escura possuem nervuras bem evidentes, contorno orbicular, ápice reentrante e base obtusa. Os caules apresentaram-se com coloração marrom característica.



**Figura 11.** Face adaxial (A) e face abaxial (B) das folhas de *Ipomoea pes-caprae brasiliensis* (L.) R. Br. (ADRIANO, 2009).

Foi verificado durante a análise microscópica das folhas, células epidérmicas (em secção paradérmica) em ambas as faces apresentando paredes anticlinais retas e espessadas (Figura 12). Foram localizados ainda, tricomas glandulares pluricelulares e estômatos anfiestomáticos (Figura 12C), conforme os estudos de Micheletto (2006).

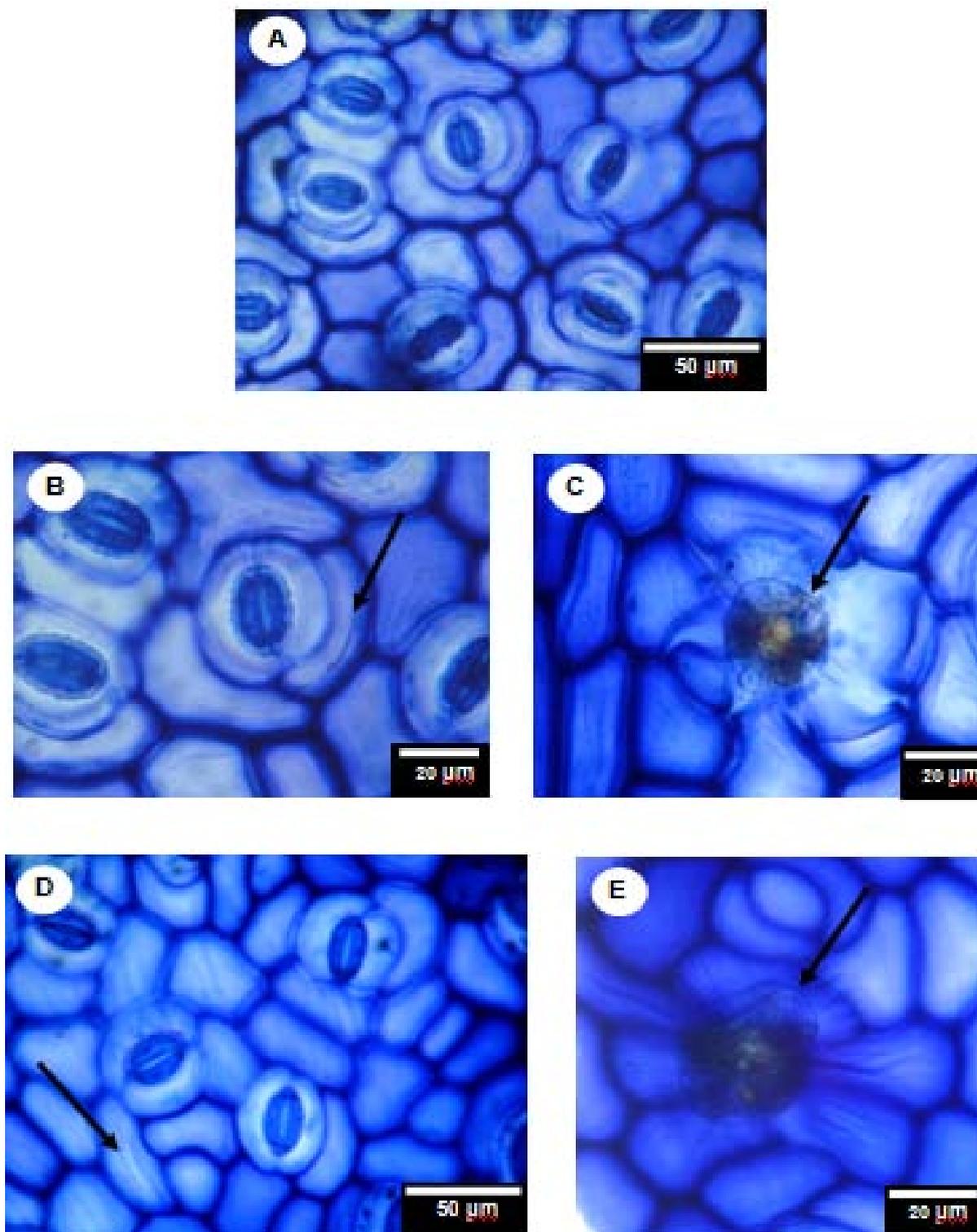
Na Figura 13B foi observado em secção transversal, a epiderme da face adaxial caracterizada como uniestratificada com cutícula espessada, dado ainda não relatado em estudos anteriores.

Micheletto (2006) e Adriano (2009) citaram a presença de lactíferos. Desta maneira, a informação foi ratificada com a detecção dos canais lactíferos secretores de látex contornados por células epiteliais de parede delgada no mesofilo (Figura 14D).

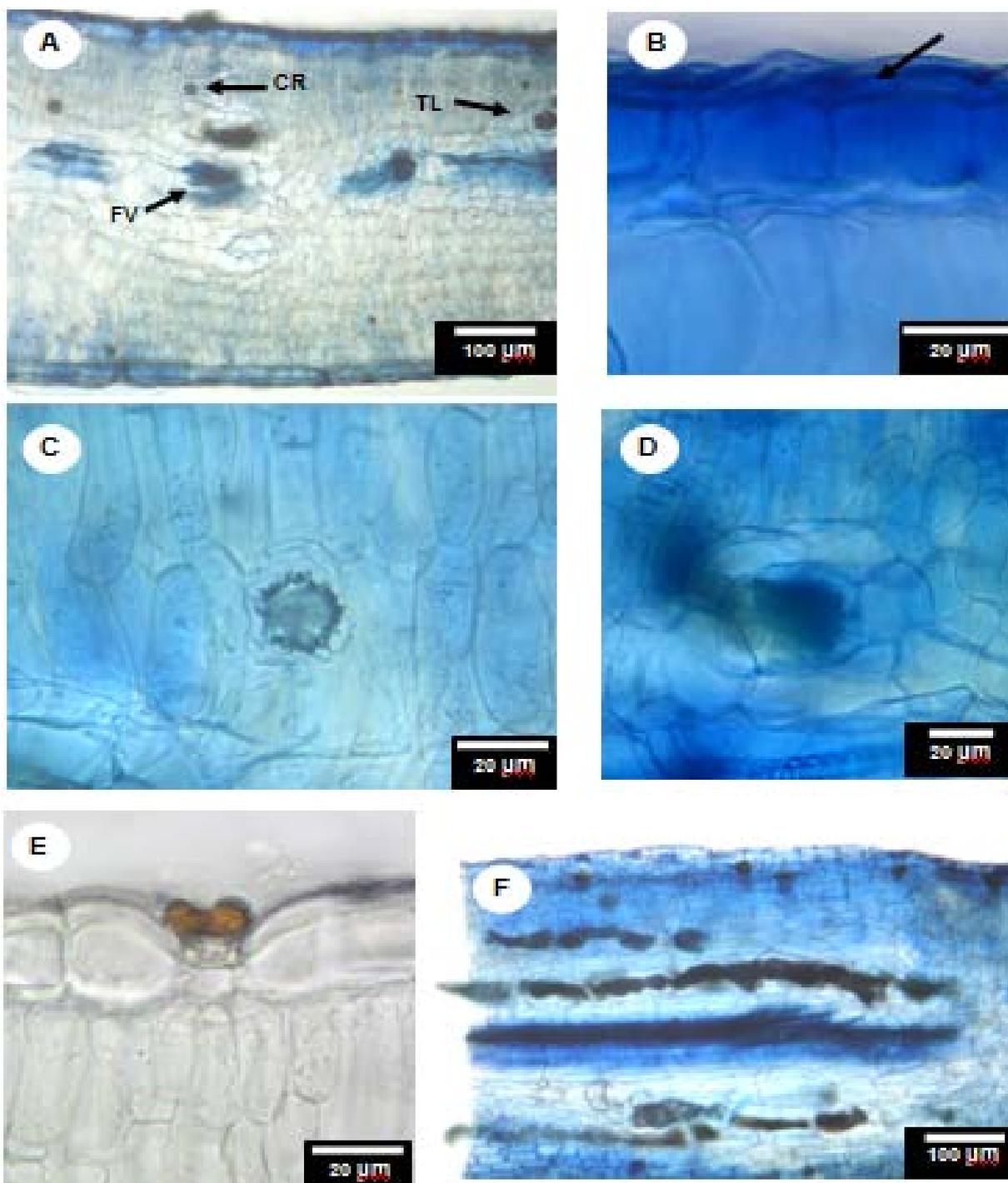
No mesofilo, foram encontrados de cinco a doze camadas de parênquima paliádico voltado para as duas faces, caracterizando a estrutura do tipo isolateral (mesofilo heterogêneo simétrico) e a presença de drusas (Figura 13C), informação que condiz com os estudos de Gasper, Holetz e Quadros (2006) e Micheletto (2006).

De acordo com os estudos de Arruda, Viglio e Barros, (2009) e Gasper, Holetz e Quadros (2006) foram encontrados na nervura central em secção transversal, o desenvolvimento de colênquima sob a epiderme, idioblastos cristalíferos semelhantes aos descritos no mesofilo e sistema vascular bicolateral.

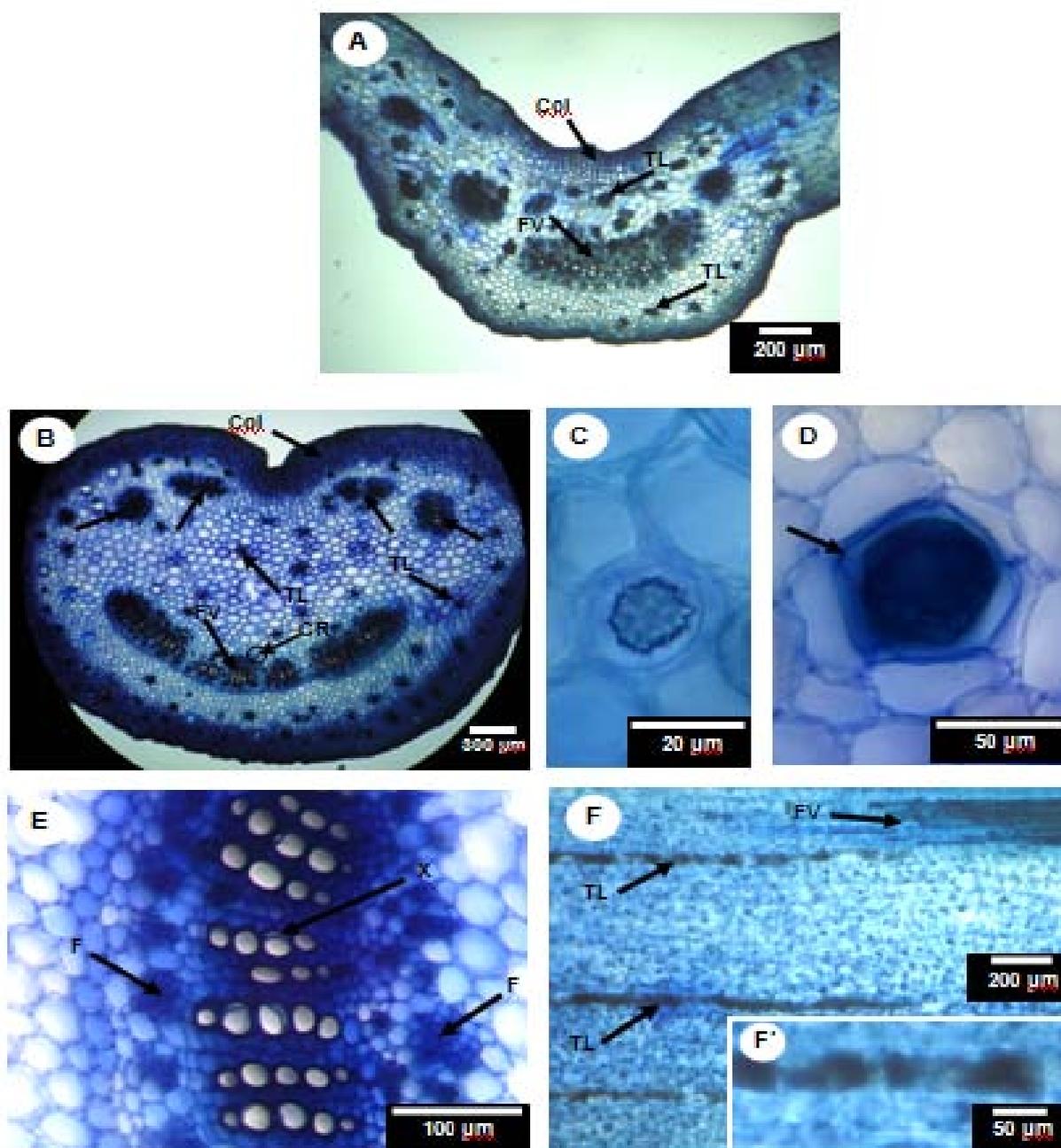
No pecíolo a epiderme é unisseriada. No centro (córtex) do pecíolo foi encontrado um amplo desenvolvimento de tecido aquífero aclorofilado e a presença de colênquima angular sob a camada epidérmica (Figura 14A). Foi verificado ainda que o sistema vascular de *I. pes-caprae* é formado por um conjunto de feixes bicolaterais arranjados em semicírculo envolvidos por uma camada amilífera, conforme dados descritos por Arruda, Viglio e Barros (2009).



**Figura 12.** Características microscópicas das folhas de *Ipomoea pes-caprae brasiliensis* (L.) R. Br. em vista frontal. A) Secção paradérmica da face adaxial com estômatos paracíticos. B) Detalhe da face adaxial com células epidérmicas de contorno poligonal com cutícula estriada (seta). C) Ocorrência de tricoma glandular (TG) na face adaxial. D) Secção paradérmica da face abaxial da folha com estômatos paracíticos e células epidérmicas de contorno poligonal com cutícula estriada (seta). E) Ocorrência de tricoma glandular (TG) na face abaxial.



**Figura 13.** Características microscópicas das folhas de *Ipomoea pes-caprae brasiliensis* (L.) R. Br. em seção transversal. A) Mesofilo isolateral em seção transversal: parênquima paliçádico, parênquima esponjoso e parênquima paliçádico; mesofilo com cristal tipo drusa, tubo laticífero e feixe vascular. B) Detalhe do mesofilo em seção transversal mostrando cutícula espessa (seta) na face adaxial. C) Detalhe do mesofilo mostrando cristal tipo drusa (CR). D) Detalhe do mesofilo mostrando tubo laticífero (canal secretor de látex) em vista transversal. E) Detalhe do tricoma glandular na face adaxial da epiderme foliar. F) Ocorrência de tubos laticíferos em vista longitudinal (setas) no mesofilo em volta do feixe vascular em vista longitudinal (FV).



**Figura 14.** Características microscópicas das folhas (nervura central e pecíolo) de *Ipomoea pes-caprae*. A) Secção transversal da nervura central: feixe vascular central (FV), colênquima (Col) e tubo laticífero (TL). B) Secção transversal do pecíolo: colênquima (Col), feixes vasculares (setas), feixe vascular em arco (FV), cristal tipo drusa (CR) e tubo laticífero (TL). C) Detalhe do pecíolo em secção transversal com cristal do tipo drusa. D) Detalhe do tubo laticífero em secção transversal evidenciando epitélio secretor (seta). E) Detalhe do feixe vascular em arco do pecíolo destacando floema externo e interno (F) ao xilema (X). F) Secção longitudinal do pecíolo mostrando feixe vascular (FV) e tubos laticíferos (TL). F') Detalhe do tubo laticífero em secção longitudinal.

É fundamental ressaltar a importância da descrição anatômica como critério para a identificação da espécie, principalmente quando a droga vegetal é constituída de partes secas e rasuradas e é possível destacar estruturas morfológicas que sejam exclusivas da espécie.

A DV foi caracterizada quanto à perda por dessecação, como parâmetro indicativo da sua estabilidade frente à degradação de constituintes químicos por ação de enzimas (SIMÕES et al., 2004). A perda por dessecação do lote 0911 (n=3) foi de  $9,96\% \pm 0,1$ , demonstrando conformidade com os valores estabelecidos de 8 a 14%, segundo a Farmacopéia Brasileira (2010).

Em relação ao controle de qualidade microbiológico de produtos não estéreis, nos quais se admite a presença de carga microbiana limitada, o objetivo imediato desta análise é comprovar a ausência de microrganismos patogênicos e determinar o número de microrganismos viáveis, em função da utilização do produto, por exemplo, para uso tópico ou oral (ANDRADE et al., 2005). A contagem de bactérias mesófilas foi de  $20,7 \times 10^3$  UFC/g e a contagem de fungos e leveduras foi equivalente a  $2,1 \times 10^2$  UFC/g estando de acordo com os limites microbianos da para a DV. Não foram encontrados microrganismos patogênicos.

Como ensaio indicativo de pureza, foi realizada a determinação de cinzas totais, cujos resultados estão descritos na Tabela 8. A determinação do teor de cinzas totais permite a verificação de impurezas inorgânicas não-voláteis que podem estar presentes como contaminantes. Já os contaminantes como resíduo de terra ou areia, geralmente observada em raízes são verificados pela determinação do teor de cinzas ácido insolúveis (SIMÕES et al., 2004).

A *I. pes-caprae* é uma planta rasteira, encontrada extensivamente sobre as dunas das praias, trazendo consigo resíduos de areia, no momento da colheita. Os valores encontrados em relação a cinzas totais e insolúveis no presente estudo diferem dos valores obtidos por Barni, Cechinel-Filho e Couto (2009) (planta coletada em 2006) e Adriano (2009) (planta coletada em 2007), que coletaram a DV no mesmo local como mostra a Tabela 8. Neste trabalho, o percentual de cinzas insolúveis em ácido (1,26%) foi consideravelmente inferior aos valores encontrados em estudos anteriores para a mesma espécie, já o percentual de cinzas totais obtido (10,61%) equiparou-se ao valor encontrado na coleta de 2006 (Tabela 8). (BARNI; CECHINEL-FILHO; COUTO, 2009; ADRIANO, 2009).

Não existem teores máximos para cinzas totais e cinzas insolúveis em ácido estabelecidos oficialmente para a espécie em estudo. Porém, os teores de cinzas totais da *I. pes-caprae* é menor do que os de outras espécies farmacopeicas constituídas de partes aéreas, como *Centella asiatica* (L.) Urb. (11%) e *Malva sylvestris* L. (16%) (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010). Estas diferenças estão

relacionadas à própria composição do material, bem como ao local de ocorrência da espécie e das partes do vegetal, principalmente considerando a sua proximidade ao solo. A Tabela 8 faz um comparativo com outros lotes estudados em anos anteriores para tentar estabelecer uma faixa de aceitação neste trabalho.

**Tabela 8.** Resultados (média e DPR) para as cinzas totais e ácido insolúveis, perda por dessecação e teor de ISO da mistura de folhas e caules (droga vegetal) de *I. pes-caprae* em diferentes estudos.

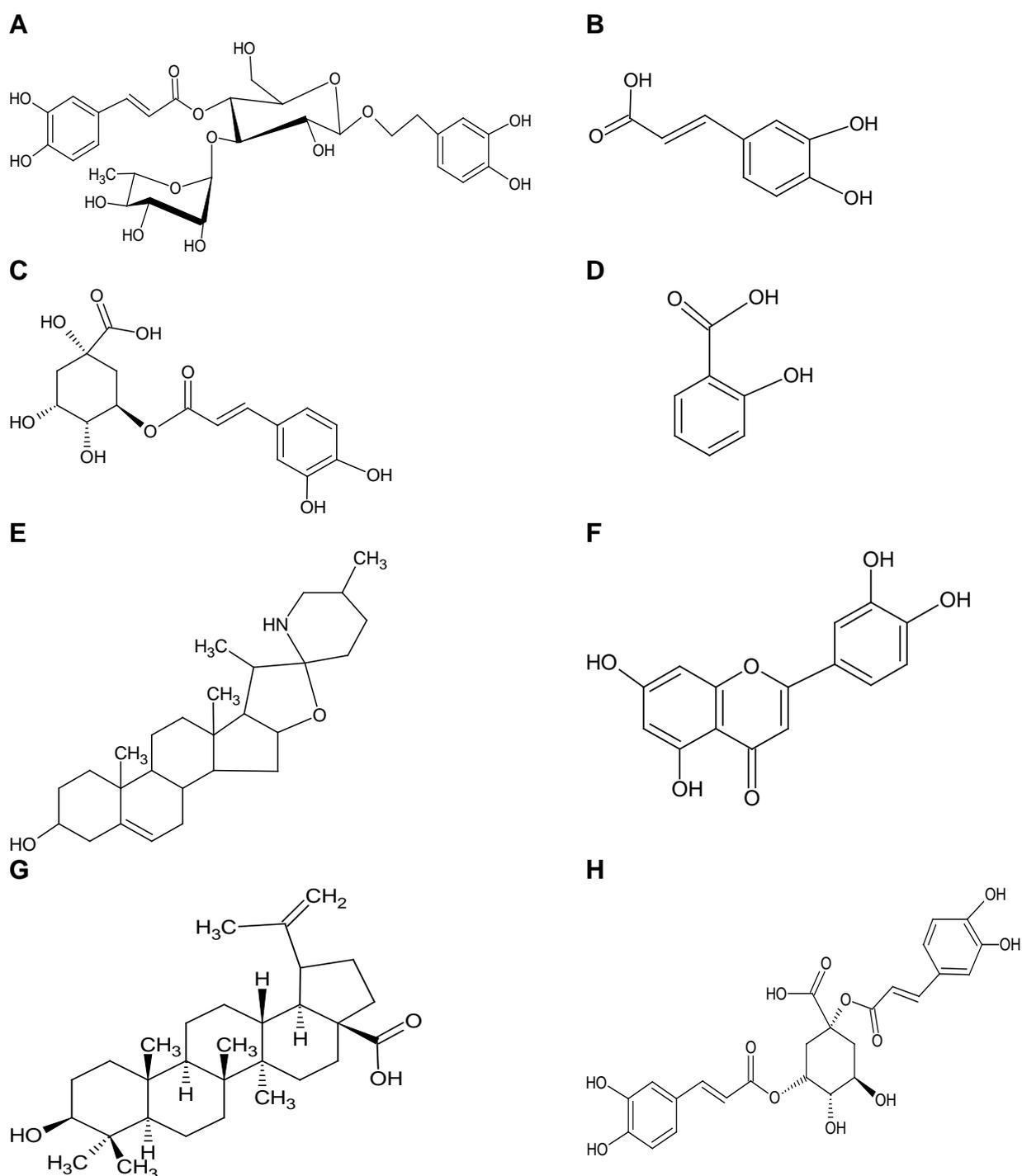
<b>Droga vegetal</b>	<b>Cinzas Totais (%)</b>	<b>Cinzas Insolúveis (%)</b>	<b>Perda por dessecação (%)</b>	<b>Teor ISO (mg/g)</b>
Lote 0911 (DPR)	10,61 (0,07)	1,26 (0,41)	9,96 (0,10)	3,86 (0,01)
Adriano (2009)* (DPR)	6,77 (0,10)	2,77 (0,10)	11,50 (0,10)	0,22 (0,87)
Barni; Cechinel-Filho; Couto (2009)	9,84 (0,13)	8,48 (0,65)	8,01 (0,47)*F 10,45 (15,54)*C	NA

ISO= isoquercitrina; DPR= desvio padrão relativo; \*F= folhas; \*C=caules; NA= não analisado.

A análise do teor de ISO na DV foi realizada através das soluções extrativas preparadas conforme o item 4.2.1.4 e foi verificado um teor médio de ISO de 3,86 mg/g ( $s=0,01$ ), enquanto Adriano (2009) encontrou um teor médio de 0,22 mg/g ( $s=0,87$ ). Possivelmente, esta diferença se deve ao processo de extração utilizado, já que neste estudo, a maceração dinâmica foi empregada a partir da agitação constante por 18 h e Adriano (2009) utilizou o processo de maceração sem agitação por sete dias. Não se pode descartar a hipótese de as plantas terem sido coletadas em épocas e ano diferentes (fevereiro de 2007 e setembro de 2011), podendo a sazonalidade influenciar no teor de ISO na DV, bem como a metodologia analítica empregada no presente trabalho ter sofrido modificações em relação ao trabalho anterior.

Com o intuito de identificar os demais picos presentes no cromatograma desenvolvido, foram testados diferentes compostos, sendo alguns já relatados para esta espécie vegetal (KROGH, 1999) (Figura 15). No entanto, no sistema empregado não foi observada a presença de nenhum pico referente aos padrões de compostos apolares: glochidona 50 µg/mL, ácido betulínico 50 µg/mL e acetato alfa e beta amirina 50 µg/mL (já relatados), além de luteolina 50 µg/mL, ácido cafeico 40 µg/mL, coregosina 20 µg/mL, verbascosídeo 10 µg/mL, ácido clorogênico 10 µg/mL, cinarina 50 µg/mL; solazodina 50 µg/mL (não relatados para esta espécie). O ácido salicílico (50 µg/mL) e a quercetina (50 µg/mL) eluíram com tempo de retenção de

aproximadamente 31 min e 47 min, respectivamente, porém não corresponderam a nenhum dos picos do cromatograma, sendo o método desenvolvido inviável para quantificar compostos apolares. A não detecção dos compostos pelo método pode ser devida a baixa concentração dos mesmos, pela força insuficiente do eluente ou a não retenção na coluna, levando os compostos a eluírem no volume morto.



**Figura 15.** Estruturas moleculares de alguns compostos pesquisados. A) Verbascosídeo; B) Ácido Cafeico; C) Ácido Clorogênico; D) Ácido Salicílico; E) Solazodina; F) Luteolina; G) Ácido Betulínico; H) Cinarina.

A exposição da droga vegetal às radiações ultravioleta (UV) e visível (VIS) não provocou efeito significativo no teor do marcador. Foi verificado que a exposição à radiação UV e VIS (Figura 16B e D e Tabela 9) provocou uma diminuição do pico do marcador em cerca de 7 e 0,5%, respectivamente, comparando com as amostras revestidas com papel laminado, indicando que a DV é estável às radiações.

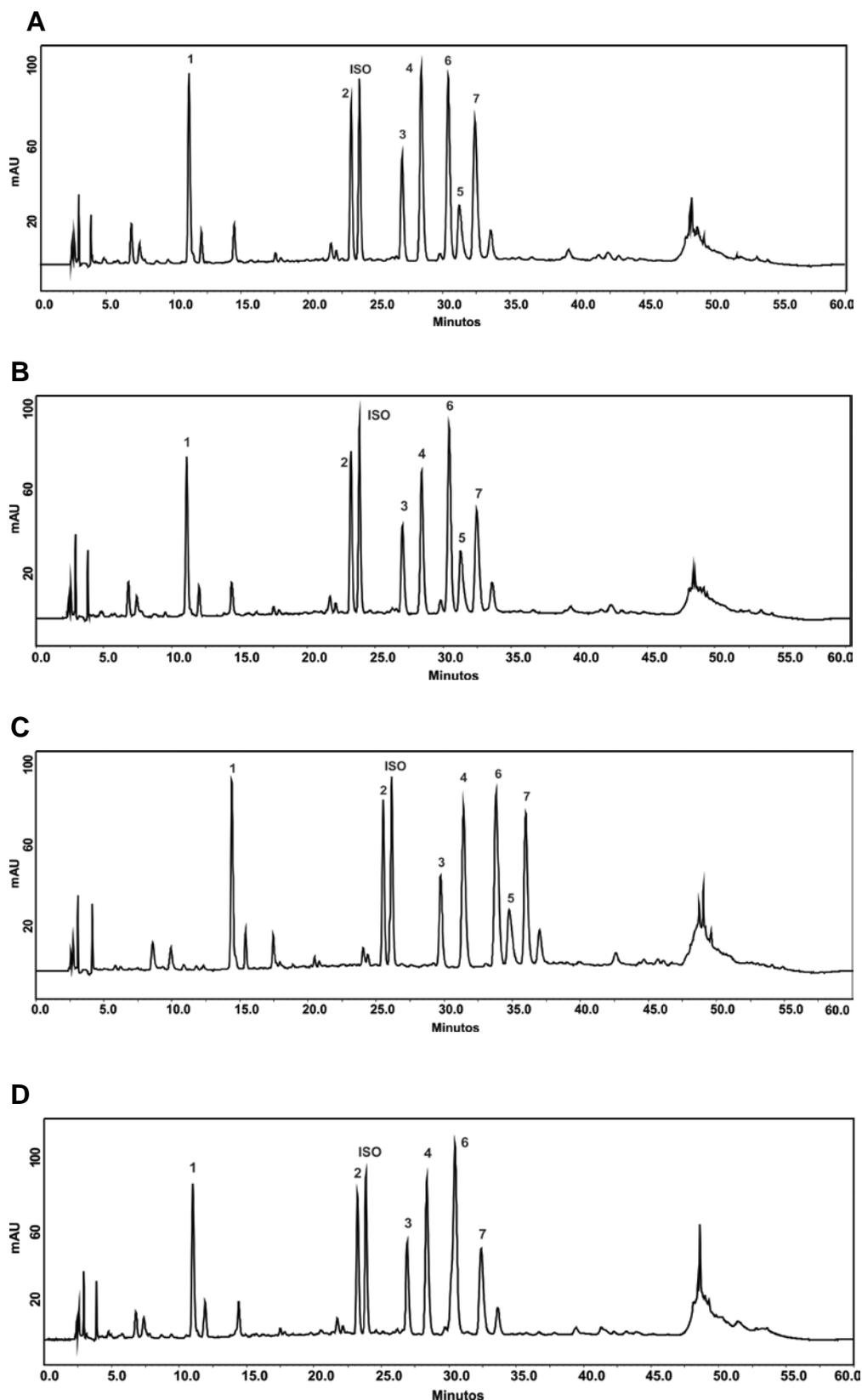
Foi verificado na exposição à radiação VIS que o pico 5 não aparece, sugerindo uma possível co-eluição com produtos de degradação e/ou com o pico 6. Desta maneira, estudos posteriores dos produtos de degradação podem ser conduzidos para determinar as vias de degradação dos componentes da droga vegetal. Na Figura 16C que se refere ao cromatograma controle VIS, foi constatado um atraso nos tempos de retenção em relação aos picos das Figuras 16A, 16B e 16D, com pico do marcador eluindo após os 25 min.

Em relação às amostras submetidas a radiação UV, todos os picos diminuíram em relação a solução controle, porém foi verificado um aumento sutil no pico entre os picos 4 e 6. Os picos 4 e 7 (Figura 16B) diminuíram consideravelmente em relação à amostra controle (Figura 16A). Não foram percebidas alterações nos tempos de retenção entre a amostra controle e a exposta à radiação. Observa-se, ocasionalmente, a ausência ou o deslocamento do pico 5.

**Tabela 9.** Média das áreas obtidas e porcentagem de recuperação (%) calculada em relação à amostra controle no ensaio de fotoestabilidade da droga vegetal de *I. pes-caprae*.

Tipo de Exposição	Picos majoritários							
	Pico 1	Pico 2	ISO	Pico 3	Pico 4	Pico 5	Pico 6	Pico 7
<b>UV C</b>	1188932	891367	1048495	739503	1568406	609079	1609149	1411004
<b>UV</b>	880781 (74,08)	821524 (92,16)	973715 (92,87)	556867 (75,30)	1098363 (70,03)	595028 (97,69)	1460345 (90,75)	966031 (68,46)
<b>VIS C</b>	963114	885516	1047799	731047	1533384	622017	1624625	1385251
<b>VIS</b>	941746 (97,78)	891730 (100,70)	1042432 (99,49)	672490 (91,99)	1373810 (89,59)	Co	Co	1103324 (79,65)

ISO= isoquercitrina; UV=ultravioleta, 200 watt horas/m<sup>2</sup>; VIS=visível, 1,2 milhões de lux. hora; Co= co-eluição; C= controle; SE=solução amostra.



**Figura 16.** Cromatogramas do ensaio de fotoestabilidade da droga vegetal. A) Amostra protegida com papel alumínio (controle UV); B) Amostra submetida à radiação UV (200 watt.hs/m<sup>2</sup>); C) Amostra protegida com papel alumínio (controle VIS); D) Amostra submetida à radiação VIS (1,2 milhões lux. hora).

### **5.3 Caracterização da solução extrativa hidroetanólica de *I. pes-caprae brasiliensis* (L.) R. Br.**

A partir da SE preparada conforme citado para o lote 0911, o controle de qualidade foi realizado de acordo com as análises descritas no item 4.2.3.

A SE apresentou odor alcoólico característico, cor verde-escuro e aspecto homogêneo. Tem a característica de apresentar-se resinada a ponto de gerar dificuldade de manipulação na parte prática.

A SE obtida no presente trabalho obteve pH de  $5,67 \pm 0,01$ , resíduo seco de  $3,30\% \pm 0,50$  e grau alcoólico de  $63,36 \text{ }^\circ\text{GL} \pm 0,96$ . Considerando os dados de controle de qualidade da SE descritos por outros autores (ADRIANO, 2009; VIEIRA et al., 2012), os valores de pH tem sido obtidos na faixa de 5,5 - 5,7, o grau alcoólico na faixa de 59-69  $^\circ\text{GL}$  e o resíduo seco de 2,4-3,3%. O conhecimento destes parâmetros é importante para o monitoramento do processo produtivo e estabelecimento de uma faixa de aceitação, além de serem resultados relevantes para a determinação de ISO, assim como para o rendimento do processo de secagem.

Os ensaios de grau alcoólico e resíduo seco encontraram valores superiores ao estudo anterior realizado por Adriano (2009). Estes resultados podem ser justificados pela alteração do método de extração. Para a obtenção da SE, a autora utilizou a maceração de 12,5% (m/V) das partes aéreas secas e moídas em álcool 70  $^\circ\text{GL}$  durante 7 dias, enquanto que neste trabalho foi utilizada a maceração dinâmica por 18 horas, com agitação constante.

Em relação à pureza microbiológica, não houve crescimento bacteriano e de fungos e leveduras, apresentando-se em conformidade com os parâmetros farmacopeicos, assim como foi encontrada a ausência de patógenos.

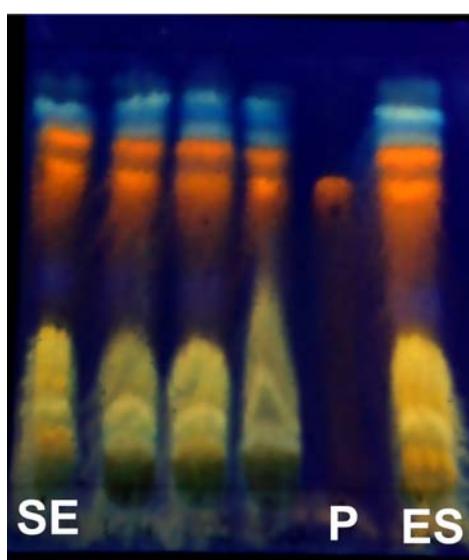
O teor de ISO encontrado na SE foi de  $11,80 \text{ mg/g} \pm 0,86$  neste estudo (colheita no inverno 2011), enquanto que Adriano (2009) obteve um teor médio de  $3,10 \text{ mg/g} \pm 0,87$  (colheita no verão de 2007), mais uma vez evidenciando a influência do processo de extração utilizado, os efeitos da sazonalidade e possivelmente também no método analítico.

A CCD é o método mais comum de análise, principalmente antes da implementação dos métodos de CLAE e Cromatografia Gasosa (CG), por ser fácil,

versátil, rápido e sensível para uma caracterização prévia dos constituintes de uma DV, proporcionando análise qualitativa e semi-quantitativa, indicando uma possível adulteração (SOUZA-MOREIRA; SALGADO; PIETRO, 2010). A Figura 17 apresenta o perfil cromatográfico por CCD da SE comparada com o padrão de ISO e ES, utilizando o sistema de eluição, revelação e fixação descrito no item 4.2.3.5. Foi observada a presença de 6 manchas, no sentido de baixo para cima: amarelo, lilás, laranja (correspondente ao padrão), laranja, verde e azul. Dentre estas, foi possível identificar apenas a ISO, por ser o único padrão testado. A cor alaranjada e fluorescente é característica de flavonoides.

Os padrões de coloração amarelo-alaranjado fluorescente (Orientina, Quercetina e Rutina) já foram confrontados com a solução hidroetanólica em trabalho anterior (MAGALHÃES; GHIGGI, 2009), com 3 sistemas diferentes, incluindo o método utilizado neste trabalho. Foi verificado que apenas a ISO (laranja) foi correspondente. A Vitexina (amarelo-esverdeada) e o Camferol (azul) também não foram correspondentes.

No presente trabalho, o fator de retenção ( $R_f$ ) do padrão foi de 0,66, muito próximo ao da SE e ES, ambos com  $R_f$  de 0,69. Em trabalhos anteriores o  $R_f$  das amostras variou entre 0,55 (MAGALHÃES; GHIGGI, 2009) e 0,68 (ADRIANO, 2009).



**Figura 17.** Perfil cromatográfico em CCD da solução extrativa de *I. pes-caprae* (SE), comparados ao padrão de isoquercitrina (P) e extrato seco (ES). Sistema de eluição acetato de etila: acetona: água purificada: metanol (25:8:1:3), em cromatoplaça de sílica gel (6,5 cm) revelada com solução metanólica de difenilboriloxi-etilamina a 1%, fixadas com solução hidroetanólica 77%, contendo polietilenoglicol 4000 a 4% (m/v) e observadas sob luz em 365 nm. Como substância de referência para flavonoides foi utilizada a isoquercitrina.

#### **5.4 Caracterização do extrato seco obtido por *spray dryer* (ES)**

Etapas como a eliminação parcial ou total do solvente justificam-se, em princípio, pela maior estabilidade física, química e microbiana perante as formas líquidas. Ao remover parcialmente o solvente, aumenta-se o teor de sólidos para um determinado valor de resíduo seco, importante para o processo de produção do extrato mole, ou como etapa preliminar para a produção do extrato seco (COUTO; VITORINO; SILVA, 2010).

O extrato seco de *L. pes-caprae brasiliensis* (L.) R. Br. que se refere à eliminação de 70% do etanol, acumulou um tempo de evaporação de 3 horas. O lote foi produzido com sistema aberto de secagem e modo pneumático. A determinação e o controle dos parâmetros de secagem como temperaturas de entrada e saída, velocidade de fluxo de alimentação, concentração e tipo de adjuvante tecnológico, assim como os teores de resíduo seco da solução extrativa a nebulizar são fatores indispensáveis para obtenção de extratos secos com melhores características físico-químicas e aumento do rendimento da operação (VASCONCELOS et al., 2005).

Neste trabalho, foi utilizado o dióxido de silício coloidal (Aerosil®), um dos adjuvantes amplamente utilizados e citados em literatura (VASCONCELOS et al., 2005; OLIVEIRA, 2009). O uso de adjuvantes tecnológicos influencia de maneira decisiva no aumento do rendimento do processo de secagem, além de contribuir positivamente sobre a reconstituição do produto em água (SOUZA et al., 2000). No caso do dióxido de silício coloidal, seu amplo emprego fundamenta-se pelo tamanho de partícula em torno de 15 nm, baixa incompatibilidade e boas propriedades de fluxo (ROWE; SHESKEY; OWEN, 2006).

No desenvolvimento tecnológico de fitoterápicos, a técnica de secagem por aspersão (*spray drying*) tem sido bastante empregada com o intuito de obter produtos intermediários com maior concentração de constituintes químicos e com melhores características tecnológicas. Sabe-se que, extratos vegetais secos pelo método de aspersão têm sido utilizados como produtos finais e intermediários na obtenção de diferentes formas farmacêuticas (VASCONCELOS et al., 2005; ADRIANO, 2009).

A estabilidade física e química de extratos secos obtidos a partir de plantas medicinais é essencial para a garantia da qualidade, segurança e eficácia do produto disponibilizado ao consumidor. Nesta técnica, o aquecimento necessário

para a eliminação do solvente ocorre em fração de segundos, o que pode ser suficiente para preservar a integridade química do produto.

Para a secagem do volume de 1500 mL foi possível obter um rendimento de 82,28%. O rendimento foi reprodutível (quando comparado ao resultado obtido por Adriano (2009) que obteve rendimento de no máximo 63%), considerando que o teor de sólidos no fluido de alimentação era semelhante, tendo-se adicionado 20% de dióxido de silício coloidal em relação ao total de sólidos de ambas as soluções.

Entretanto, a recuperação de ISO no ES foi de  $10,04 \text{ mg/g} \pm 0,03$  e quando comparado a SE ( $11,80 \text{ mg/g} \pm 0,86$ ) representou um percentual foi de 68%. As possíveis perdas que possam justificar o rendimento e a recuperação obtidos, podem estar relacionadas à adição do adjuvante de secagem, à forte adesão de partículas ainda na câmara de secagem e à separação de pós finíssimos no ciclone e exaustão, que não são recuperados no coletor. É importante ressaltar que durante a desalcoholização, houve a precipitação de um material de consistência pegajosa, semelhante a uma resina que é característico da composição química da espécie vegetal (MEIRA et al, 2012).

O lote de ES desenvolvido é altamente higroscópico, possui odor característico e coloração amarelo-queimado a marrom-claro, conforme a Figura 18.



**Figura 18.** Extrato seco de *Ipomoea pes-caprae brasiliensis* (L.) R. Br.

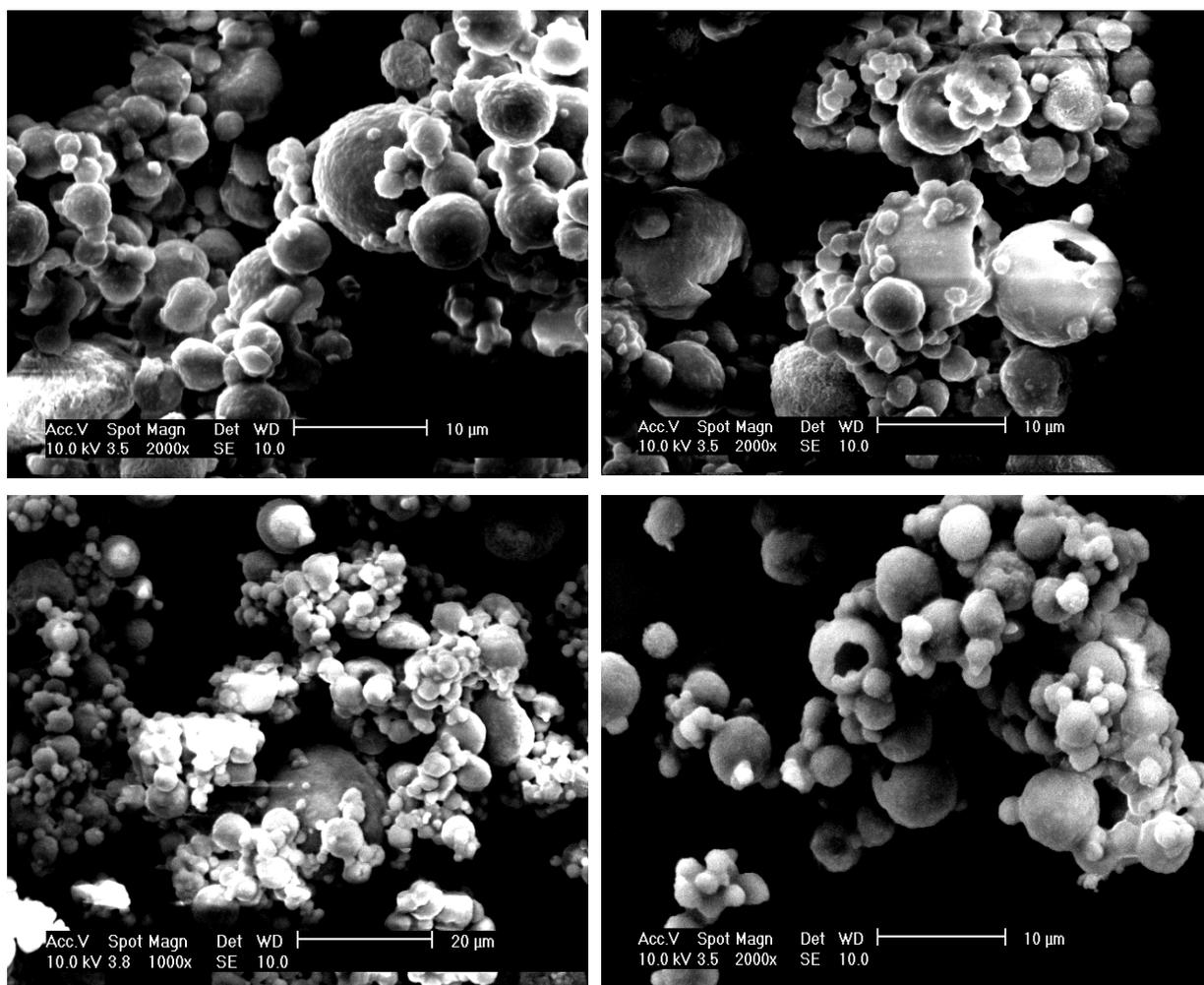
A contagem de bactérias mesófilas correspondeu a  $2,9 \times 10^3$  UFC/g e a contagem de fungos e leveduras foi equivalente a  $1,6 \times 10^2$  UFC/g, estando conforme segundo as especificações da Farmacopéia Britânica (2008) e a Farmacopéia Brasileira (2010). A análise microbiológica do Aerosil<sup>®</sup> também foi

realizada e apresentou conformidade baseada em ambos os compêndios, com contagem de fungos e bactérias <10 UFC/g e ausência de microrganismos patogênicos. Em comparação com o resultado obtido na análise microbiológica da DV, houve redução significativa na contagem de bactérias mesófilas e fungos e leveduras na amostra de ES. Não foram encontrados microrganismos patogênicos.

A perda por dessecação calculada foi equivalente a  $4,97 \pm 0,04$  e o pH do ES reconstituída em solução diluente (item 4.2.1.1) correspondeu a  $5,21 \pm 0,02$ . O ES foi acondicionado em vidro âmbar e armazenado em dessecador à vácuo, para retenção da absorção de umidade do ar, até sua posterior utilização. Em geral, a umidade residual nos extratos secos é limitada a um máximo de 5% (LIST; SCHMIDT, 1989) e de 2 a 8% (LEITE, 2010), apresentando conformidade.

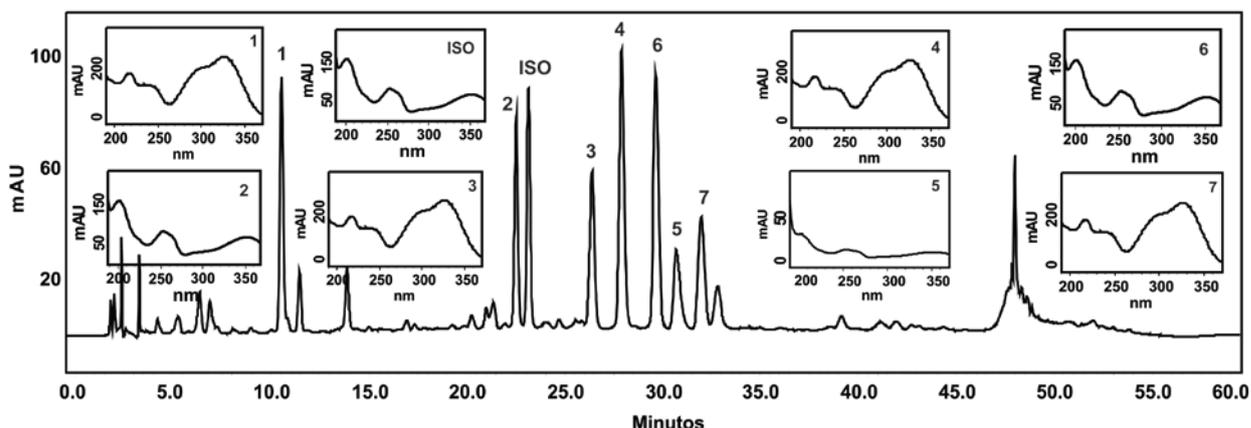
O perfil por CCD foi demonstrado e comparado com o padrão e SE no item 5.3.2 (Figura 17).

A caracterização morfológica foi realizada através da análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV) como mostra a Figura 19. Foi observado através da MEV que o ES de *I. pes-caprae* é formado por partículas esféricas de diâmetro entre 2 e 10  $\mu\text{m}$ . As esferas apresentam, em sua maioria, superfície lisa, havendo algumas partículas ocas. De acordo com Cano-Chauca et al. (2005), a presença de poucas fendas e a forte aderência das partículas menores em torno das maiores demonstra ausência de superfícies cristalinas, sendo esta característica de produtos amorfos.



**Figura 19.** Microscopia eletrônica por varredura (MEV) do extrato seco de *I. pes-caprae*.

Em relação ao perfil cromatográfico pode-se observar na Figura 20, a presença de sete picos distintos após os 20 min, sendo os picos 2, ISO e 6 característicos de flavonoides. O pico ISO refere-se ao marcador ISO. O detector de diodos indicou índice de pureza de 0,9999 para o marcador que possui tempo de retenção na faixa de 23,5-24,5 min, em 254 nm, e resolução de aproximadamente 2. Foi observado um perfil semelhante para a SE (Figura 7B), sendo que o pico 5 (perfil característico de flavonoide) foi evidenciado entre os picos 6 e 7 nesta análise, podendo em alguns casos, aparecer entre os picos 4 e 6.



**Figura 18.** Perfil cromatográfico do extrato seco a 2,5 mg/mL de *I. pes-caprae*.

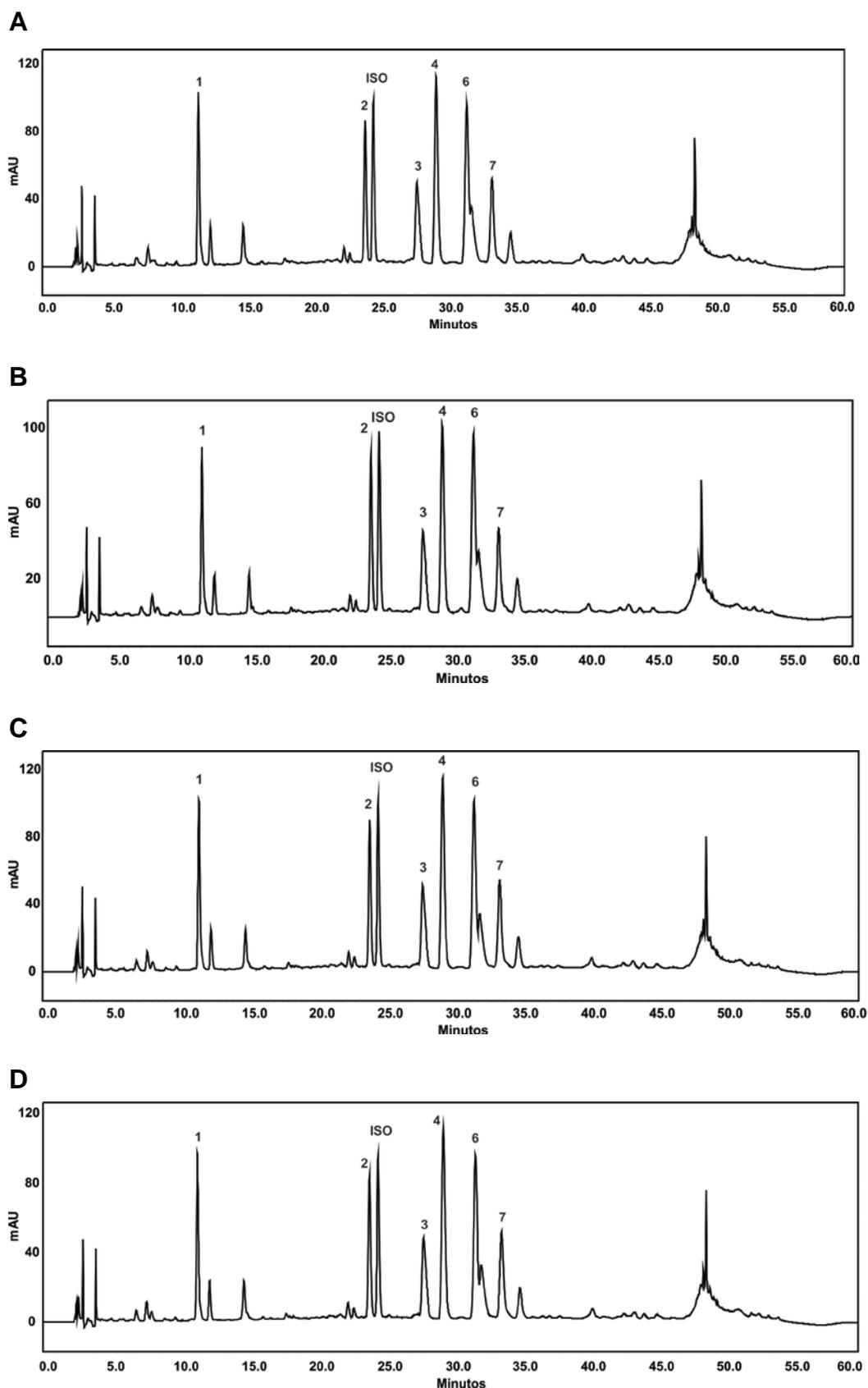
A exposição do ES à radiações não provocou efeito significativo no teor do marcador. De acordo com a Tabela 10 e Figura 21, a exposição à radiação UV e VIS provocou uma diminuição do pico do marcador em cerca de 1 e 3%, respectivamente, quando comparadas com as amostras revestidas com papel laminado, indicando que o ES é estável às radiações.

Foi verificada a co-eluição dos picos 5 e 6 tanto nas amostras controle quanto nas amostras expostas à radiação, mais uma vez indicando a necessidade de aperfeiçoar a reprodutibilidade da análise. Todos os picos restantes tiveram suas áreas diminuídas em relação a solução controle. Não foram percebidas alterações nos tempos de retenção entre a amostra controle e a exposta à radiação.

**Tabela 10.** Média das áreas obtidas e porcentagem de recuperação (%) em relação as amostras revestidas com papel laminado no ensaio de fotoestabilidade do extrato seco de *I. pes-caprae*.

Tipo de Exposição	Picos majoritários							
	Pico 1	Pico 2	ISO	Pico 3	Pico 4	Pico 5	Pico 6	Pico 7
UV C	1109179	917164	1039382	919993	1857758	Co	Co	1010143
UV	1006918 (90,78)	906718 (98,86)	1030884 (99,18)	822096 (89,36)	1587757 (85,60)	Co	Co	862148 (85,35)
VIS C	1101561	952972	1084965	946752	1937889	Co	Co	1039945
VIS	1083520 (98,36)	917680 (96,30)	1049910 (96,77)	910120 (96,13)	1841805 (95,04)	Co	Co	994532 (95,63)

ISO= isoquercitrina; UV=ultravioleta, 200 watt horas/m<sup>2</sup>; VIS=visível, 1,2 milhões de lux. hora; Co= co-eluição; C= controle.



**Figura 21.** Cromatogramas do ensaio de fotoestabilidade do extrato seco de *I. pes-caprae*. A) Amostra protegida com papel alumínio (controle UV); B) Amostra submetida à radiação UV (200 watt.hs/m<sup>2</sup>); C) Amostra protegida com papel alumínio (controle VIS); D) Amostra submetida à radiação VIS (1,2 milhões lux. hora).

## **5.5 Estudo de Estabilidade do extrato seco e droga vegetal**

Numerosos são os fatores que podem afetar a estabilidade dos extratos secos e droga vegetal, dentre eles, pH, solvente, temperatura, luz, reações químicas como hidrólise e oxidação, tamanho de partículas, entre outros (ALLEN Jr.; POPOVICH; ANSEL, 2007). Desta maneira, o lote do ES foi submetido aos estudos de estabilidade acelerada e longa duração, assim como a própria DV.

O estudo de estabilidade acelerada é projetado para acelerar a degradação química ou física de um produto farmacêutico. Para que a estabilidade química seja mantida, cada componente ativo deve reter sua integridade química e manter-se potente dentro dos limites especificados e dentro do período de armazenagem de uso, preservando as propriedades e características, desde a sua preparação (GIL; FILHO, 2007). Já o estudo de longa duração tem por objetivo avaliar a vida útil real do produto sob condições habituais de armazenamento e utilização (D'LEON, 2001) e os resultados são usados para estabelecer ou confirmar o prazo de validade, além de recomendar as condições de armazenamento (BRASIL, 2005; GIL, 2007).

As análises realizadas com o extrato seco e a droga vegetal nos tempos 45, 90 e 135 dias foram características organolépticas, determinação do pH, perda por dessecação e teor de ISO (mg/g). No  $t_0$ , todas as análises descritas nos itens 4.2.2 e 4.2.4 foram realizadas e, para o estudo acelerado, serão repetidas no  $t_{180}$ .

As análises por percepção direta do aspecto, cor e odor podem identificar modificações indicativas de alterações químicas e microbiológicas. No entanto, as características organolépticas não podem ser utilizadas com fins analíticos, devido à subjetividade na análise (CESCA, 2010). As amostras de DV submetidas ao estudo de estabilidade acelerado mostraram-se aparentemente estáveis neste parâmetro, com coloração característica (proveniente da mistura de caules e folhas), bem como odor característico em todos os tempos analisados neste estudo. As amostras de ES mostraram-se altamente higroscópicas, com odor característico e coloração amarelo-queimado a marrom-claro nos tempos  $t_0$  e  $t_{45}$ . A partir do  $t_{90}$ , foi constatada alteração da coloração para marrom-escuro. Já no estudo de longa duração, onde a umidade foi menor, as amostras de ES e DV permaneceram com as mesmas características organolépticas do  $t_0$ , com exceção do ES a partir do  $t_{90}$ , que apresentou coloração marrom-escuro, possivelmente devido às reações de hidrólise e oxidação do extrato.

A determinação do pH é um fator muito importante a ser avaliada em estudos de estabilidade, pois proporciona informações que podem refletir a estabilidade química da amostra, principalmente quanto às reações de degradação do marcador ou demais adjuvantes presentes, este último no caso do ES. Esta instabilidade pode ocorrer também devido ao tempo de estocagem e/ou condições inadequadas de transporte e armazenamento (ANSEL; POPOVICK; ALLEN Jr., 2005; MORAES, 2007). O pH dos produtos de via tópica varia de acordo com a sua aplicabilidade, não devendo alterar o pH da superfície cutânea. De acordo com Peyrefitte, Martini e Chivot (1998) o pH cutâneo está compreendido entre 4,00 e 6,50, já para Barata (2003) e Rebello (2005) varia entre 4,50 a 5,50. Na análise de pH, as amostras de DV e ES se enquadraram aos limites preconizados pelos autores, demonstrando pouca variabilidade neste parâmetro em ambos os estudos (Tabelas 11 e 12).

As amostras também apresentaram conformidade nas análises do  $t_0$  quanto à perda por dessecação. Nos tempos subsequentes a perda por dessecação do ES e da DV aumentou consideravelmente, de modo um pouco maior no estudo acelerado onde a umidade da câmara foi maior, o que indica grande absorção de umidade do extrato, caracterizando-o como altamente higroscópico, o que demonstra que a embalagem não protegeu o produto da umidade.

Os teores de ISO na DV e no ES também foram determinados e comparados com o  $t_0$ , a partir das áreas obtidas em cada cromatograma. Tanto a DV quanto o ES apresentaram teores dentro da variação de  $\pm 5,4\%$  (Tabela 11) estando adequados para dar continuidade ao estudo de estabilidade acelerado, não obstante o elevado aumento da umidade nas amostras. No entanto, no estudo de longa duração, a DV apresentou variações de teor acima de 10%. Já o ES apresentou variações de até 6% (Tabela 12).

As variações de doseamento até 135 dias apresentaram-se entre 5,1% e 10,0% para ambas as amostras no estudo de estabilidade acelerado. De acordo com a legislação (BRASIL, 2005), caso o estudo acelerado tivesse concluído (6 meses), dentro desta mesma faixa de variação, o pedido do prazo de validade provisório de 12 meses poderia ser solicitado.

**Tabela 11.** Resultados obtidos durante o estudo de estabilidade acelerada (tempos zero, 45 dias, 90 dias e 135 dias) da droga vegetal e do extrato seco *I. pes-caprae*.

<b>Estabilidade</b> <b>acelerada</b>	<b>pH</b> <b>média (s)</b>	<b>Perda por</b> <b>dessecação (%)</b>	<b>Área</b> <b>média (s)</b>	<b>Teor de ISO (mg/g)</b> <b>média (s)</b>
<b><math>t_0</math>(DV)</b>	5,67 (0,01)	9,96	1195651 (4167,77)	3,86 (0,01)
<b><math>t_{45}</math>(DV)</b>	5,25 (0,03)	16,80	1086817 (5398,56)	3,80 (0,02)
<b><math>t_{90}</math>(DV)</b>	5,32 (0,01)	19,20	1137327 (4415,67)	4,09 (0,02)
<b><math>t_{135}</math>(DV)</b>	5,05 (0,01)	19,91	1150323 (6021,01)	4,07 (0,02)
<b><math>t_0</math>(ES)</b>	5,21 (0,02)	4,97	1050054 (3471,13)	10,04 (0,03)
<b><math>t_{45}</math>(ES)</b>	5,22 (0,01)	29,25	780814 (5237,88)	10,05 (0,07)
<b><math>t_{90}</math>(ES)</b>	5,11 (0,02)	33,07	748874 (6235,11)	10,19 (0,08)
<b><math>t_{135}</math>(ES)</b>	5,05 (0,02)	28,09	803164 (5747,94)	10,16 (0,07)

**Tabela 12.** Resultados obtidos durante o estudo de estabilidade de longa duração (tempos zero, 45 dias, 90 dias, 135 dias e 180 dias) da droga vegetal e do extrato seco *I. pes-caprae*.

<b>Estabilidade</b> <b>longa duração</b>	<b>pH</b> <b>média (s)</b>	<b>Perda por</b> <b>dessecação (%)</b>	<b>Área</b> <b>média (s)</b>	<b>Teor de ISO (mg/g)</b> <b>média (s)</b>
<b><math>t_0</math>(DV)</b>	5,67 (0,01)	9,96	1195651 (4167,77)	3,86 (0,01)
<b><math>t_{45}</math>(DV)</b>	5,50 (0,02)	14,90	933958 (6615,61)	3,19 (0,02)
<b><math>t_{90}</math>(DV)</b>	5,50 (0,01)	17,70	1106147 (12740,34)	3,91 (0,04)
<b><math>t_{135}</math>(DV)</b>	5,88 (0,02)	19,01	1316034 (5935,45)	4,60 (0,02)
<b><math>t_{180}</math>(DV)</b>	5,81 (0,02)	19,93	1301397 (1412,86)	4,72 (0,02)
<b><math>t_0</math>(ES)</b>	5,21 (0,02)	4,97	1050054 (3471,13)	10,04 (0,03)
<b><math>t_{45}</math>(ES)</b>	5,31 (0,01)	27,57	789869 (9331,11)	9,66 (0,11)
<b><math>t_{90}</math>(ES)</b>	5,20 (0,02)	29,96	773576 (14853,96)	10,06 (0,19)
<b><math>t_{135}</math>(ES)</b>	5,14 (0,02)	19,09	917826 (19070,13)	10,31 (0,21)
<b><math>t_{180}</math>(ES)</b>	5,12 (0,02)	26,95	856776 (4960,40)	10,67 (0,06)

ES = extrato seco; DV = droga vegetal; s=desvio padrão.

## 6 CONCLUSÕES

A planta coletada na praia da Esplanada, no município de Jaguaruna-SC, em setembro de 2011, foi identificada como *I. pes-caprae brasiliensis* (L.) R. Br., mediante as suas características macro e microscópicas. O rendimento fresco desta coleta foi de 2,31 kg, representado por 68,71% de folhas e 27,13% de caules, além de 4,16% de botões, flores e frutos. A droga vegetal foi caracterizada e apresentou conformidade quanto às características físicas, físico-químicas e microbiológicas estipulados pela Farmacopéia Brasileira (2010) e Farmacopéia Britânica (2008). A caracterização microscópica em secção transversal demonstrou a epiderme da face adaxial caracterizada como uniestratificada com cutícula espessada, dado ainda não relatado em estudos anteriores.

Foi desenvolvido e validado um método de análise por CLAE para quantificação do marcador (ISO) e análise do perfil dos derivados vegetais (solução extrativa e extrato seco) empregando coluna de fase reversa para o doseamento do marcador e perfil cromatográfico das soluções extrativas de *I. pes-caprae*, com boa resolução e um maior número de picos em relação ao método desenvolvido por Adriano (2009). A *solução amostra* apresentou um cromatograma com 7 picos majoritários além do pico do marcador, sendo 4 com perfil característico de flavonoides. A ISO eluiu em cerca de 25 min, com resolução > 2.

O método por CLAE foi validado com sucesso e mostrou ser linear na faixa de 5-50 µg/mL de ISO, sem influência da matriz na linearidade do método, exato, preciso, sensível e robusto. Em relação à robustez do método, dentre as variações analisadas, a alteração de fluxo da fase móvel promoveu maior impacto nos parâmetros cromatográficos da análise, sendo que o DPR ficou acima de 8% nos parâmetros de área, tempo de retenção e teor de ISO.

A solução extrativa foi suscetível aos testes de degradação forçada, com maior degradação do pico 6 em todas as condições de estresse testadas. Nos testes realizados em temperatura ambiente, o peróxido, o ácido e o álcali com posterior neutralização obteve-se aproximadamente 5% de degradação do marcador, sem co-eluição na maioria dos casos, indicando que o método é indicativo de estabilidade.

O teor de ISO na droga vegetal encontrado foi de 3,86 mg/g, valor maior do que o relatado por Adriano (2009) de 0,22 mg/g, sugerindo que esta diferença se

deve possivelmente à sazonalidade e às modificações no método analítico. A exposição direta da droga vegetal à radiações UV e VIS não provocou efeito significativo no teor do marcador (degradação < 10%).

As soluções extrativas obtidas com etanol 70 °GL e maceração dinâmica por 18 h demonstraram um teor de 11,80 mg/g RS, superior ao obtido anteriormente por Adriano (2009) de 3,10 mg/g RS, que empregou maceração estática por 7 dias.

O extrato seco obtido por *spray dryer* foi caracterizado quanto às características físicas, físico-químicas e microbiológicas, apresentando conformidade com a literatura. O teor de ISO no extrato seco foi de 10,04 mg/g e quando comparada à solução extrativa (11,80 mg/g RS) representou um percentual de 85%, considerado adequado. As perdas que justificam a recuperação obtida podem estar relacionadas à adição do adjuvante de secagem; à forte adesão de partículas na câmara de secagem, que não são recuperados no coletor; além da precipitação e perda da resina glicosídica, característica da planta.

O teor de ISO na droga vegetal (3,86 mg/g) foi concentrado na solução extrativa (11,80 mg/g RS) e preservado após a secagem por *spray dryer* (10,04 mg/g).

A análise do perfil por CCD revelou um fator de retenção (Rf) do padrão de ISO (0,66) semelhante ao observado no cromatograma da solução extrativa e extrato seco, ambos com Rf de 0,69, sugerindo a presença de ISO nesses derivados vegetais, conforme já observado por CLAE.

A exposição direta do extrato seco às radiações UV e VIS não provocou efeito significativo no teor do marcador (degradação < 5%).

A análise cromatográfica por CLAE demonstrou que o perfil cromatográfico da solução extrativa foi semelhante ao do extrato seco.

O extrato seco submetido ao estudo de estabilidade acelerada e de longa duração em embalagem do tipo saco de polietileno revestido com papel pardo, seguindo normas oficiais, apresentou a partir dos 90 dias, alterações na coloração (escurecimento), fato este não evidenciado para a DV que manteve-se estável neste parâmetro. Houve um aumento crescente na umidade (9-20% para droga vegetal e de 5-30% para o extrato seco) evidenciando que a embalagem empregada não é hermética. Porém, houve manutenção do pH e os teores de ISO, na droga vegetal e extrato seco, apresentaram-se dentro da variação de  $\pm 5,4\%$  após 135 dias. Já no estudo de longa duração, após 180 dias a droga vegetal apresentou aumento no

teor em mais de 10%, enquanto o extrato seco apresentou variação no teor de 6%. Tais resultados indicam que outro tipo de embalagem deve ser empregado para o armazenamento especialmente para a droga vegetal em estudos futuros.

De acordo com os resultados alcançados, conclui-se que o método por CLAE é confiável para o controle de qualidade das solução extrativa e extrato seco de *I. pes-caprae*.

Desta maneira, espera-se obter produtos intermediários estáveis para o futuro desenvolvimento de formulações semissólidas tópicas seguras e eficazes para o tratamento de afecções cutâneas, baseada na biodiversidade nacional.

As dificuldades encontradas na realização desta pesquisa apontam a necessidade de estudos para aprimorar o método quantitativo por CLAE para a investigação de produtos de degradação e futuros estudos de estabilidade empregando embalagens com maior grau de proteção, bem como realizar estudos de biomonitoramento nas amostras.

## REFERÊNCIAS

- ADRIANO, J. **Desenvolvimento de forma farmacêutica tópica gel contendo o extrato seco de *Ipomoea pes-caprae brasiliensis***. 2009. 180 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Mestrado Acadêmico em Ciências Farmacêuticas, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2009.
- ALLEN Jr., L. V.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. **Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.
- ANDRADE, F. R. O.; SOUZA, A. A.; ARANTES, M. C. B.; PAULA, J. R.; BARA, M. T. F. Análise microbiológica de matérias-primas e formulações farmacêuticas magistrais. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 2, n. 2, p. 38-44, 2005.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Séries Temáticas. **Guia de estabilidade de produtos cosméticos**. Brasília (DF), 2004.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Estudo de Fotoestabilidade**. Brasília (DF), 2011.
- ARRUDA, R. C. O.; VIGLIO, N. S. F.; BARROS, A. A. M. Anatomia foliar de halófitas e psamófilas reptantes ocorrentes na restinga de Ipitangas. **Rodriguésia**, v. 60, n. 2, p. 333-352, 2009.
- AUSTIN, D. F.; HUÁMAN, Z. A synopsis of *Ipomoea* (Convolvulaceae) in the Americas. **Taxon**, v. 43, n. 3, p. 38, 1996.
- BABY, A. R. **Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de formulações cosméticas anticelulíticas contendo o extrato vegetal comercial de *Trichilia catigua* Adr. Juss (e) *Ptychopetalum olacoides* Bentham, padronizado em flavonoides totais**. 2005. 159f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.
- BAERTSCHI, S. W. ALSANTE, K. M. TØNNESEN, H. H. A Critical Assessment of the ICH Guideline on Photostability Testing of New Drug Substances and Products (Q1B): Recommendation for Revision. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, n. 7, p. 2934-2940, 2010.
- BAHR, C. B.; COUTO, A. G.; VITORINO, J. C. Controle de qualidade microbiológico de *Ipomoea pes-caprae* em processos tecnológicos para obtenção de extratos secos. In: Simpósio de plantas medicinais do Brasil, 20., INTERNATIONAL CONGRESS OF ETHNOPHARMACOLOGY, 10., 2008, São Paulo. **Resumos...** São Paulo, 2008.
- BARATA, E. A. F. **A cosmetologia: princípios básicos**. São Paulo: Tecnopress, 2003.
- BARNI, S. T.; CECHINEL FILHO, V.; COUTO, A. G. Caracterização química e tecnológica das folhas, caules e planta inteira da *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br., Convolvulaceae, como matéria-prima farmacêutica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 4, p. 865-870, 2009.
- BEDSE, G.; KUMAR, V.; SINGH, S. Study of forced decomposition behavior of lamivudine using LC, LC-MS/TOF and MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 49, p. 55-63, 2009.

BEHLING, E. B.; SENDÃO, M. C.; FRANCESCATO, H. D. C.; ANTUNES, L. M. G.; BIANCHI, M. L. P. Flavonóide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. **Alimentos e Nutrição**, v. 15, n. 3, p. 285-292, 2004.

BLANK, A. F.; COSTA, A. G.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; CAVALCANTI, S. C. H.; ALVES, P. B.; INNECCO, R.; EHLERT, P. A. D.; SOUSA, I. F. Influence of season, harvest time and drying on *Java citronella* (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) volatile oil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 557-564, 2007.

BORELLA, J. C.; RIBEIRO, N. S.; TEIXEIRA, J. C. L.; CARVALHO, D. M. A. Avaliação da espalhabilidade e do teor de flavonoides em forma farmacêutica semissólida contendo extratos de *Calendula officinalis* L. (Asteraceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 31, n. 2, p. 193-197, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899 de 29 de maio de 2003. Dispõe sobre a Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, 02 jun. 2003.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 1 de 29 de julho de 2005. Publica o Guia para a Realização de Estudos de Estabilidade de Produtos Farmacêuticos. **Diário oficial da União**, 01 ago. 2005.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria Ministerial MS/GM nº 971 de 03 de maio de 2006. Publica a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde. **Diário Oficial da União**, 04 mai. 2006a.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Decreto nº 5.813, em 22 de junho de 2006. Publica a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. **Diário Oficial da União**, 23 jun. 2006b.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Área de Economia da Saúde e Desenvolvimento. Estrutura de mercado do segmento de fitoterápicos no contexto atual da indústria farmacêutica brasileira. Brasília, 2007.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Informe Técnico nº 1, de 15 de julho de 2008. Esclarece o item 2.9 do anexo da Resolução RE nº 1 de 29 de julho de 2005, que trata do Guia para Realização dos Estudos de Estabilidade. **Diário Oficial da União**, 2008.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 14 de 31 de março de 2010. Dispõe sobre o Registro de Medicamentos Fitoterápicos. **Diário Oficial da União**, 05 abr. 2010a.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 17 de 16 de abril de 2010. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. **Diário Oficial da União**, 17 abr. 2010b.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 27 de 17 de maio de 2012. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. **Diário Oficial da União**, 22 mai. 2012.

BREHMER, J. S. **Estudo de extratos de plantas medicinais no desenvolvimento do tumor ascítico de Ehrlich**. 2005. Dissertação (Mestrado) - Programa de Mestrado Acadêmico em Ciências Farmacêuticas, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2005.

BRITISH PHARMACOPOEIA. London: The Office Stationery, 2008.

CANO-CHAUCA, M.; STRINGHETA, P. C.; RAMOS, A. M.; CAL-VIDAL, J. Effect of the carriers on the microstructure of mango powder obtained by spray drying and its functional characterization. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.6, n.4, p.420-428, 2005.

CAO, S.; GUZZA, R. C.; WISSE, J. H.; MILLER, J.S.; EVANS, R.; KINGSTON, D. G. I. Ipomoeassins A-E, cytotoxic macrocyclic glycoresins from the leaves of *Ipomoea squamosa* from the Suriname rainforest. **Journal of Natural Products**, v. 68, p. 487-492, 2005.

CARVALHO, A. C. B.; BALBINO, E. E.; MACIEL, A.; PERFEITO, J. P. S. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 314-319, 2008.

CASTELI, V. C.; MENDONÇA, C. .C.; CAMPOS, M. A. L.; FERRARI, M.; MACHADO, S. R. P. Desenvolvimento e estudos de estabilidade preliminares de emulsões O/A contendo Cetoconazol 2,0%. **Acta Scientiarum Health Sciences**, v. 30, n. 2, p. 121-128, 2008.

CASTELLANI, T. T. **Estrutura e dinâmica populacional de *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Brown (Convolvulaceae) na Ilha de Santa Catarina**. 2003. 206 f. Tese (Doutorado) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

CASTELLANI, T. T.; SANTOS, F. A. M. Abundância, sobrevivência e crescimento de plântulas de *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br. (Convolvulaceae) na Ilha de Santa Catarina, SC, Brasil. **Acta Botânica Brasileira**, v. 20, n. 4, p. 875-885, 2006.

CESCA, T. G. **Formas semissólidas contendo extrato seco de *Aleurites moluccana* L. Wild. (Euphorbiaceae): Desenvolvimento, controle de qualidade e estudo farmacológico**. 2010. 125 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Mestrado Acadêmico em Ciências Farmacêuticas, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2010.

CORRADINI, E.; FOGLIA, P.; GIAN SANTIA, P.; GUBBIOTTIA, R.; SAMPERIA, R.; LAGANÀ, A. Flavonoids: chemical properties and analytical methodologies of identification and quantitation in foods and plants. **Natural Product Research**, v. 25, n. 5, p. 469-495, 2011.

COUTO, A. G.; VITORINO, J. C.; SILVA, R. M. L. Tecnologia e garantia da qualidade de fitoterápicos. In: BRESOLIN, T. M. B.; CECHINEL FILHO, V. **Fármacos e medicamentos: uma abordagem multidisciplinar**. Itajaí: Santos, 2010. p. 241-308.

D'LEON, L. F. P. Estudos de estabilidade de produtos cosméticos. **Cosmetics & Toiletries**, v. 13, n.4, p. 54-62, 2001.

DAVID, J. P. L.; NASCIMENTO, J. A. P.; DAVID, J. M. Produtos fitoterápicos: uma perspectiva de negócio para a indústria, um campo pouco explorado pelos farmacêuticos. **Infarma**, v. 71, n. 6, p. 9-10, 2004.

DE SOUZA, M. M.; MADEIRA, A.; BERTI, C.; KROGH, R.; YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. Antinociceptive properties of the methanolic extract obtained from *Ipomoea pes-caprae*(L.) R. Br. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 69, p. 85-90, 2000.

DEVALL, M. S. Ecology of *Ipomoea pes-caprae*(Convolvulaceae) at Grand Isle, Louisiana. **Proceedings of Louisiana Academy Science**, v. 50, p. 7-12, 1987.

DEVALL, M. S. The biological flora of coastal dunes and wetlands. 2. *Ipomoea pes-caprae* (L.) Roth. **Journal of Coastal Research**, v. 8, p. 442-456, 1992.

DI CARLO, G.; MASCOLO, N.; IZZO, A. A.; CAPASSO, F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. **Life Science**, v. 65, n. 4, p. 337-353, 1999.

EMENDORFER, F.; BELLATO, F.; NOLDIN, V. F.; NIERO, R.; CECHINEL FILHO, V.; CARDOZA, A. M. Evaluation of the relaxant action of some Brazilian medicinal plants in isolated guinea-pig ileum and rat duodenum. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 8, p. 63-68, 2005.

ESCOBEDO-MARTÍNEZ, C.; PEREDA-MIRANDA, R. Resin glycosides from *Ipomoea pes-caprae brasiliensis*. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 974-978, 2007.

ESCOBEDO-MARTÍNEZ, C.; CRUZ-MORALES, S.; FRAGOSO-SERRANO, M.; RAHMAN, M. M.; GIBBONS, S. PEREDA-MIRANDA, R. Characterization of a xylose containing oligosaccharide, an inhibitor of multidrug resistance in *Staphylococcus aureus*, from *Ipomoea pes-caprae brasiliensis*. **Phytochemistry**, v. 71, p. 1796-1801, 2010.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY. **Stability Testing of new Drug Substances and Products** (ICH Topic Q 1 A (R2)). London, 2003. Disponível em: <[http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2009/09/WC50002651.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC50002651.pdf)>. Acesso em: 10 mar. 2011.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY **Reflection paper on stability testing of herbal medicinal products and traditional herbal medicinal products**. London, 2010.

FARMACOPÉIA Brasileira. 5. ed. Brasília: Anvisa, 2010. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd\\_farmacopeia/pdf/volume1%2020110216.pdf](http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/pdf/volume1%2020110216.pdf)>. Acesso em: 18 mar. 2011.

FARMACOPÉIA Portuguesa. 7. ed. Lisboa, 2002.

FLORENCE, A. T.; ATTWOOD, D. **Princípios físico-químicos em farmácia**. 3. ed. São Paulo: Edusp; 2003.

FDA. **Reviewer guidance, validation of chromatography methods**. Center for drug Evaluation and Research, 1994.

FISCHER, D. C. H. Controle de qualidade de matérias-primas vegetais e produtos fitoterápicos. In: GIL, E. S.; ORLANDO, R. M.; MATIAS, R.; SERRANO, S. H. P. **Controle físico-químico de qualidade de medicamentos**. Campo Grande: Editora Uniderp, 2005. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Guidance for Industry (Draft): Stability Testing of Drug Substances and Drug products**. Rockville (MD), 1998.

FOOTT, J. A detailed view of a beach morning glory flower (*Ipomoea pes-caprae*) amidst wet leaves. Disponível em: <<http://www.art.com/products/p6911196712-sa-i5099647/jeff-foott-a-detailed-view-of-a-beach-morning-glory-flower-ipomoea-pes-caprae-amidst-wet-leaves.htm>>. Acesso em: 16 jan. 2013.

FORMICA, J. V.; REGELSON, W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. **Food Chemical Toxicology**, London, v.33, n. 12, p. 1061-1080, 1995.

GASPER, A. L.; HOLETZ, L. G. S.; QUADROS, K. E. Estudo anatômico de *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Brown (Convolvulaceae). In: REUNIÃO ANUAL DA SBPC, 58., 2006, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: Centro de Ciências Biológicas, 2006.

GIL, E. S. **Controle físico-químico de qualidade de medicamentos**. 2. ed. São Paulo: Pharmabooks, 2007.

GIL, E. S.; FILHO, B. Teste de estabilidade e prazo de validade. In: GIL, E. S. **Controle físico-químico de qualidade de medicamentos**. 2 ed. São Paulo: Pharmabooks, 2007. p. 337-342.

GARREC, R. B.; BENOIT, E.; SAUVIAT, M.; LEWIS, R. J.; MOLGÓ, J.; LAURENT, D. Ability of some plant extracts, traditionally used to treat ciguatera fish poisoning, to prevent the in vitro neurotoxicity produced by sodium channel activators. **Toxicol**, v. 46, p. 625-634, 2005.

GREEN, J.M. A Practical Guide to Analytical Method Validation. **Analytical Chemistry News & Features**, v. 68, p. 305A-309A, 1996.

HARRIS, D. C. **Análise química quantitativa**. 7. ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 2008.

HERRMANN, A. P.; WILLEMS, M.; JANKE, H. D. Degradation of natural polyphenols by methanogenic consortia enriched from digested municipal sludge. **Water Research**, v. 35, n. 11, p. 2575-2582, 2001.

HUBER, L. Validation of analytical methods: review and strategy. Oberkirch, 2001. Disponível em: <[http://www.labcompliance.com/solutions/free\\_literature.aspx?sm=b](http://www.labcompliance.com/solutions/free_literature.aspx?sm=b)>. Acesso em: 17 mar. 2011.

HUECK, K. **Plantas e formação organogênica das dunas no litoral paulista - Parte I**. São Paulo: Instituto de Botânica, 1955.

INABA, H.; TAGASHIRA, M.; HONMA, D.; KANDA, T.; KOU, Y.; OHTAKE, Y.; AMANO, A. Identification of hop polyphenolic components which inhibit prostaglandin E2 production by gingival epithelial cells stimulated with periodontal pathogen. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, p. 527, 2008.

INMETRO. INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMATIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos**. DOQ-CGCRE-008, 2003.

INMETRO. INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMATIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **Orientação sobre validação de métodos analíticos**: documento de caráter orientativo. DOQ-CGCRE-008, 2010.

INTERNATIONAL OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. **ICH Quality Guideline**: Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2. Genebra, 1996a.

INTERNATIONAL OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. **ICH Quality Guideline**: Stability Testing: Photostability Testing of New Drug Substances And Products Q1B. Genebra, 1996b.

INTERNATIONAL OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. **ICH Quality Guideline: Stability Testing of New Drug Substances and Products**. Genebra, 2000.

INTERNATIONAL OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. **ICH Quality Guideline: Guidance for Industry Q1A(R2) Stability Testing of New Drug Substances and Products**. Genebra, 2003.

INTERNATIONAL OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. **ICH Quality Guideline: Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1)**. Genebra, 2005.

KAPOOR, N.; KHANDAVILLI, S.; PANCHAGNULA, R. Simultaneous determination of Lamivudine and Stavudine in antiretroviral fixed dose combinations by first derivative spectrophotometry and high performance liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, p. 761–5, 2006.

KIM, H. Y.; LEE, J. M.; YOKOZAWA, T.; SAKATA, K.; LEE, S. Protective activity of flavonoid and flavonoid glycosides against glucose-mediated protein damage. **Food Chemistry**, v.126, n. 3, p. 892-895, 2011.

KLICK, S.; MUIJSELAAR, P. G.; WATERVAL, J.; EICHINGER, T.; KORN, C.; GERDING, T. K.; DEBETS, A. J.; DE GRIEND, C. S.; SOMSEN, G. W.; DE JONG, G. J. Towards a generic approach for stress testing of drug substances and drug products. **Pharmaceutical Technology**, v. 29, n. 2, p. 48-66, 2005.

KLEIN, T.; LONGHINI, R.; BRUSCHI, M. L.; MELLO, J. C. P. Fitoterápicos: um mercado promissor. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada**, v. 30, n. 3, p. 241-248, 2010.

KROGH, R.; BERTI, C.; MADEIRA, A. O.; SOUZA, M. M.; CECHINEL FILHO, V.; DELLE-MONACHE, F.; YUNES, R. A. Isolation and identification of compounds with antinociceptive action from *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br. **Pharmazie**, v. 54, p. 464-466, 1999.

LEE, S.; KIM, B.; OH, M. J.; YOON, J.; KIM, H. Y.; LEE, K. J.; LEE, J. D.; CHOI, K. Y. *Persicaria hydropiper* (L.) spach and its flavonoid components, isoquercitrin and isorhamnetin, activate the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway and inhibit adipocyte differentiation of 3T3-L1 Cells. **Phytotherapy Research**, v. 25, p.1629-1635, 2011.

LEITE, J. P. V. **Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas**. São Paulo: Atheneu, 2010.

LIST, P. H.; SCHMIDT, P. C. **Phytopharmaceutical Technology**. Heyden & Son: London, 1989.

MAGALHÃES, A. A.; GHIGGI, M. B. ***Ipomoea pes-caprae brasiliensis*: avaliação tecnológica das partes aéreas e desenvolvimento de soluções extrativas aquosas e hidroetanólicas**. 2009. 70 f. Monografia (Graduação) - Curso de Farmácia, Universidade do Vale do Itajaí, 2009.

MARQUES, L. C.; SOUZA, C. M. Pesquisa e desenvolvimento de fitoterápicos: relatos de experiência em indústria farmacêutica nacional. **Revista Fitos**, v. 07, n. 01, p. 50-66, 2012.

MEIRA, M.; SILVA, E. P.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Review of the genus *Ipomoea*: traditional uses, chemistry and biological activities. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 3, p. 682-713, 2012.

MICHELETTO, J. S. Anatomia e constituição química foliar de *Ipomoea pes-caprae* de restingas do litoral Paulista. **UNESP**, 2006. Disponível em: <[http://www.csv.unesp.br/P\\_coloquio\\_2006/resumos/Janaina%20Silva%20Micheletto.pdf](http://www.csv.unesp.br/P_coloquio_2006/resumos/Janaina%20Silva%20Micheletto.pdf)>. Acesso em 22 fev. 2011.

MORAES, L. Sabonetes: Inovando no Desenvolvimento com Tecnologia. **Bisconsult**, v.19, 2007.

MUSCHIETTI, L. V.; MARTINO, V. S. Atividades biológicas dos flavonoides naturais. In: YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. Itajaí: UNIVALI, 2007. p. 185-207.

NIERO, R.; MALHEIROS, A.; BITTENCOURT, C. M. S.; BIAVATTI, M. W.; LEITE, S. N.; CECHINEL FILHO, V. Aspectos químicos e biológicos de plantas e considerações sobre fitoterápicos. In: BRESOLIN, T. M. B.; CECHINEL FILHO, V. **Ciências Farmacêuticas: contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos**. Itajaí: Univali, 2003. p. 10-59.

NIJVELDT, R. J.; NOOD, E. V.; HOORN, D. E. C.; BOELENS, P. G.; NORREN, K. V. LEEUWEN, P. A. M. V. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 74, p. 418-425, 2001.

OLIVEIRA, O. W. **Parâmetros de produção e caracterização de produto seco de *Maytenus ilicifolia Martius ex Reissek* - celastraceae - em torre de secagem por aspersão**. 2009. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

PAVEI, C. **Desenvolvimento de métodos analíticos e tecnológicos aplicados a fração saponosídica presente nos frutos de *Ilex Paraguariensis***. 2004. 133p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

PEREDA-MIRANDA, R.; ESCALANTE-SÁNCHEZ, E.; ESCOBEDO-MARTÍNEZ, C. Characterization of lipophilic pentasaccharides from beach morning glory (*Ipomoea pes-caprae brasiliensis*). **Journal of Natural Products**, v. 226, n. 68, p. 226-230, 2005.

PERFEITO, J. P. S. **O registro sanitário de medicamentos fitoterápicos no Brasil: uma avaliação da situação atual e das razões de indeferimento**. 2012. 162 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Faculdade de Ciências da Saúde, Brasília, 2012.

PEYREFITTE, Y.; MARTINE, C. M.; CHIVOT, M. **Estética cosmética: cosmetologia biologia geral, biologia da pele**. São Paulo: Andrei, 1998. p. 325-482.

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **Journal Natural Products**, v. 63, n. 7, p. 1035-1042, 2000.

PINTO, T. J. A.; KANEKO, T. M.; OHARA, M. T. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. São Paulo: Atheneu, 2000.

PONGPRAYOON, U.; BOHLIN, L. WASUWAT, S. Neutralization of toxic effects of different crude jellyfish venoms by an extract of *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 35, p. 65-69, 1991.

- PONGPRAYOON, U.; BAECKSTROM, P.; JACOBSSON, U.; LINDSTROM, M.; BOHLIN, L. Compounds inhibiting prostaglandin synthesis isolated from *Ipomoea pes-caprae brasiliensis*. **Planta Medica**, v. 57, n. 6, p. 515-518, 1991.
- PONGPRAYOON, U.; BAECKSTROM, P.; JACOBSSON, U.; LINDSTROM, M.; BOHLIN, L. Antispasmodic activity of beta-damascenone and E-phytol isolated from *Ipomoea pes-caprae brasiliensis*. **Planta Medica**, v. 58, n. 1, p. 19-21, 1992.
- QUEIROZ, M. B. R. **Desenvolvimento e estudo da estabilidade de gel com extrato de *Matricaria Recutita* (L.) e avaliação da atividade anti-inflamatória tópica comparada com gel de diclofenaco sódico**. 2008. 101 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Faculdade de Ciências da Saúde, Brasília, 2008.
- REBELLO, T. **Guia de produtos cosméticos**. 6. ed. São Paulo: Senac, 2005.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, 2004.
- RIBEIRO, F. A. L.; FERREIRA, M. M. C.; MORANO, S. C.; SCHNEIDER, R. P. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 164-171, 2008.
- ROGERS, K. L.; GRICE, I. D.; GRIFFITHS, L. R. Inhibition of platelet aggregation and 5-HT release by extracts of Australian plants used traditionally as headache treatments. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 9, n. 4, p. 355-363, 2000.
- ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; OWEN, S. C. **Handbook of pharmaceutical excipients**. 5 ed. London: APhA Publications, 2006.
- SANTOS, C. R.; ARRUDA, V. L. V. Floração, predação e flores e frutificação de *Ipomoea pes-caprae* e *Ipomoea imperati* (Convolvulaceae). **Insula**, v. 24, p. 15-36, 1995.
- SCHULTZ, A. **Introdução à Botânica Sistemática**. 6. ed. Porto Alegre: Sagra, 1990.
- SHABIR, G. A. Validation of high performance liquid chromatographic methods for pharmaceutical analysis. **Journal of Chromatography Analysis**, v. 987, p. 57-66, 2003.
- SIANI, C. S. **Desenvolvimento tecnológico de fitoterápicos**. Plataforma metodológica. Rio de Janeiro: Scriptorio, 2003.
- SILVA, R. M. L.; COUTO, A. G.; BRESOLIN, T. M. B. Tecnologia e garantia da qualidade de fitoterápicos. In: CECHINEL FILHO, V. **Plant bioactives and drug discovery: principles, practice, and perspectives**. Itajaí: John Wiley & Sons, 2012. p. 359-394.
- SILVA, K. E. R.; ALVES, L. D. S.; SOARES, M. F. R.; PASSOS, R. C. S.; FARIA, A. R.; ROLIM NETO, P. J. Modelos de avaliação da estabilidade de fármacos e medicamentos para a indústria farmacêutica. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 2, p.129-135, 2009.
- SILVEIRA, P. F.; BANDEIRA, M. A. M.; ARRAIS, P. S. D. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 618-626, 2008.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2004.

SINGH, S.; BAKSHI, M. Guidance on conduct of stress tests to determine inherent stability of drugs. **Pharmaceutical Technology**. v. 24, p.1-14, 2000.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. **Practical HPLC Method Development**. 2. ed. New York: John Wiley & Sons, 1997.

SOARES, J. S. **Desenvolvimento de método analítico por CLAE para análise qualitativa de flavonoides nos produtos da extração de *Ipomoea pes-caprae brasiliensis***. 2008. 73 f. Monografia (Graduação) - Curso de Farmácia, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2008.

SOARES, J. S.; ADRIANO, J.; COUTO, A. G.; BRESOLIN, T. M. B. Avaliação preliminar da estabilidade química da solução extrativa hidroetanólica e do produto seco da *Ipomoea pes-caprae* frente ao estresse térmico e hidrolítico. In: International Congress of Ethnopharmacology, 10., Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 20., 2008, São Paulo. **Resumos...** São Paulo, 2008. 1 CD-ROM.

SOUZA-MOREIRA, T. M.; SALGADO, H. R. N.; PIETRO, R. C. L. R. O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 3, p. 435-440, 2010.

SOUZA FILHO, A. P.S.; TREZZI, M. M.; IOUE, M. H. Sementes como fonte alternativa de substâncias químicas com atividade alelopática. **Planta Daninha**, v. 29, n. 3, 2011.

TAO, H. W.; HAO, X. J.; LIU, J. G.; FANG, Y. C.; GU, Q. Q.; ZHU, W. M. Resin Glycoside Constituents of *Ipomoea pes-caprae* (Beach Morning Glory). **Journal of Natural Products**, v. 71, 2008.

TERAMACHI, F.; KOYANO, T.; KOWITHAYAKORN, T.; HAYASHI, M.; KOMIYAMA, K.; ISHIBASHI, M. Collagenase inhibitory quinic esters from *Ipomoea pes-caprae brasiliensis*. **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 5, p. 794-796, 2005.

TOLEDO, A. C. O.; HIRATTA, L. L.; BUFFON, M. C. M.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. **Lecta**, v. 21, p. 7-13, 2003.

TONHI, E. **Método indicador de estabilidade e produtos de degradação**. Disponível em: <[http://www.crf-rj.org.br/crf/arquivos/file/Metodo\\_Indicador\\_de\\_Estabilidade-Edivan\\_Tonhi-Bioagri\\_Laboratorios.pdf](http://www.crf-rj.org.br/crf/arquivos/file/Metodo_Indicador_de_Estabilidade-Edivan_Tonhi-Bioagri_Laboratorios.pdf)>. Acesso em: 10 jun. 2011.

UNITED STATES PHARMACOPEIA. 35<sup>th</sup>. Rockville: United States Pharmacopeial Convention; 2012.

VASCONCELOS, E. A. F.; MEDEIROS, M. G. F.; RAFFIN, F. N.; MOURA, T. F. A. L. Influência da temperatura de secagem e da concentração de Aerosil® 200 nas características dos extratos secos por aspersão da *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 15, p. 243-249, 2005.

VIEGAS JÚNIOR, C.; BOLZANI, V. B.; BARREIRO, E. B. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

VIEIRA, D. **Otimização de macerado hidroetanólico de *Ipomoea pes-caprae* e avaliação farmacológica**. 2008. Monografia (Graduação) - Curso de Farmácia, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2008.

VIEIRA, D.; PADOANI, C.; SOARES, J. S.; ADRIANO, J.; CECHINEL FILHO, V.; SOUZA, M. M.; BRESOLIN, T. M. B.; COUTO, A. G. Development of hydroethanolic extract of *Ipomoea pes-caprae* using factorial design followed by antinociceptive and antiinflammatory evaluation. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. In Press, 2012.

VILEGAS, W.; CARDOSO, C. A. L. QUEVEDO, A. E. P. Controle químico de qualidade de fitoterápicos e plantas medicinais. In: YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. 2. ed. Itajaí: UNIVALI, 2009.

ZAGUE, V. Manipulação de géis hidrofílicos. **Encarte Técnico Anfarmag**, v. 13, p. 2-5, 2006.

ZERAIK, M. L.; PEREIRA, C. A. M.; ZUIN, V. G.; YARIWAKE, J. H. Maracujá: um alimento funcional? **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 3, p. 459-471, 2010.

ZUANAZZI, J. A. S.; MAYORGA, P. Fitoprodutos e desenvolvimento econômico. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1421-1428, 2010.

YU, B.; LUO, J.; WANG, J.; ZHANG, D.; YU, S.; KONG, L. Pentasaccharide Resin Glycosides from *Ipomoea pes-caprae*. **Journal Natural Products**, v. 74, p. 620-628, 2011.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis: A thin layer chromatography atlas**. 2<sup>nd</sup>. ed. Berlin: Springer, 2001.

WASUWAT, S. Extract of *Ipomoea pes-caprae* (Convolvulaceae) antagonistic to histamine and jelly-fish poison. **Nature**, v. 225, n. 5234, p. 758-759, 1970.

WILSON, D. E. Ecological observations on the tropical strand plants *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br. (Convolvulaceae) and *Canavalia maritima* (Aubl.) Thou. (Fabaceae). **Brenesia**, v. 10, n. 11, p. 31-42, 1977.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Quality control methods for medicinal plant materials. 1998. Disponível em: <<http://whqlibdoc.who.int/publications/1998/9241545100.pdf>>. Acesso em 15 set. 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Traditional medicine strategy 2002-2005. WHO/EDM/TRM/2002.1, Geneva, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Expert Commite on Specifications for Pharmaceutical Preparations. WHO *Working document* QAS/03.055, Geneva, 2005a.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Quality control methods for medicinal materials. WHO *Working document* QAS/05.131/Rev.1, Geneva, 2005b.