

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**ESTUDO DA ESTABILIDADE DE PRODUTOS SECOS OBTIDOS A PARTIR DE
Achyrocline satureioides (Lam.) DC. Asteracea**

MARIBETE HOMRICH HOLZSCHUH

PORTO ALEGRE, 2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ESTUDO DA ESTABILIDADE DE PRODUTOS SECOS OBTIDOS A PARTIR DE
Achyrocline satureioides (Lam.) DC. Asteracea

Tese apresentada por **Maribete Homrich
Holzschuh** para obtenção do TÍTULO DE
DOUTOR em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dr. Valquiria L. Bassani
Co-orientadora: Profa. Dr. Elfrides E. S. Schapoval

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 19 de setembro de 2008 pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dr. Elenara Lemos Senna
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Dr. Grace Gosmann
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Paulo Henrique Schneider
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Pedro Ros Petrovick
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

H762e	Holzschuh, Maribete Homrich Estudo da estabilidade de produtos secos obtidos a partir de <i>Achyrocline satureioides</i> (Lam.) DC. Asteracea / Maribete Homrich Holzschuh – Porto Alegre : UFRGS, 2008. – xxiv, 170 p.: il. Tese (Doutorado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. 1. Achyrocline satureioides. 2. Asteraceae. 3. Marcela. 4. Produtos secos. 5. Estabilidade. 6. Cinética de degradação. 7. Bichalcona. I. Bassani, Valquiria Linck. II. Schapoval, Elfrides Eva Scherman. III. Título. CDU: 615.45:582.998.2
-------	---

Bibliotecária responsável:
Margarida Maria Cordeiro Fonseca Ferreira – CRB10/480

“Já se disse que as grandes idéias vêm ao mundo mansamente, como pombas. Talvez, então, se ouvirmos com atenção, escutaremos, no meio do estrépito de impérios e nações, um discreto bater de asas, o suave acordar da vida e da esperança. Alguns dirão que tal esperança jaz numa nação; outros, num homem. Eu creio, ao contrário, que ela é despertada, revivificada, alimentada por milhões de indivíduos solitários, cujos atos e trabalho, diariamente, negam as fronteiras e as implicações mais cruas da história. Como resultado, brilha por um breve momento a verdade, sempre ameaçada, que cada e todo homem, sobre as bases de seus próprios sofrimentos e alegrias, constrói para todos”.

Albert Camus

Aos meus filhos

Artur e Betina

Agradeço aos que de alguma forma me auxiliaram na realização deste trabalho.

Muito Obrigada a todos!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xv
LISTA DE ABREVIATURAS	xix
RESUMO	xxi
ABSTRACT	xxiii
1. INTRODUÇÃO.....	1
RELEVÂNCIA DO TEMA.....	3
2. OBJETIVOS.....	7
2.1 Objetivo geral.....	9
2.2 Objetivos específicos.....	9
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
3.1 Aspectos botânicos e fitoquímicos.....	13
3.2 Aspectos tecnológicos.....	16
3.3 Aspectos Analíticos.....	18
3.4 Atividade antiinflamatória de produtos secos de <i>Achyrocline satureioides</i>	19
3.5 Estabilidade.....	21
3.5.1 Aspectos legais.....	27
3.5.2 Estabilidade de fitoterápicos.....	30
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
4.1 Materiais e Equipamentos.....	37
4.1.1 Equipamentos e Acessórios.....	37
4.1.2 Solventes, reagentes e soluções.....	38
4.1.3 Adjuvantes farmacêuticos.....	39
4.1.4 Substâncias de referência.....	39
4.1.5 Materia-prima vegetal.....	39
4.2 Métodos.....	40
4.2.1 Preparação do extrato concentrado de <i>Achyrocline satureioides</i>	40
4.2.2 Preparação do produto seco de <i>Achyrocline satureioides</i>	40
4.2.3 Estabilidade frente ao calor.....	41
4.2.4 Estabilidade frente à luz	42
4.2.5 Análise das amostras	43
4.2.6 Microscopia eletrônica de varredura.....	46
4.2.7 Isolamento e identificação de substância presente no PS40.....	46
4.2.8 Isolamento e identificação de substância presente no PS80.....	47

4.2.9 Atividade antiinflamatória do PS40.....	48
5. RESULTADOS.....	51
5.1 Avaliação da estabilidade do PS40.....	55
5.1.1 Método analítico.....	55
5.1.2 Avaliação da estabilidade do PS40 frente à temperatura.....	58
5.1.3 Estabilidade do PS40 frente à luz UV-C.....	77
5.1.4 Avaliação da atividade antiinflamatória - PS40.....	81
5.2 Avaliação da estabilidade do PS80.....	83
5.2.1 Método Analítico.....	83
5.2.2 Avaliação da estabilidade frente à temperatura – PS80	88
5.2.3 Avaliação da estabilidade frente à luz – PS80	97
5.3 Cinética de degradação das substâncias quercetina, luteolina, 3-O- metilquercetina e P8 presentes no PS80.....	101
5.4 Isolamento de substâncias fenólicas presentes em PS40 (P3, P1, P2 e 3- O-metilquercetina)	104
5.5 Isolamento e identificação substâncias presentes no PS80	108
6. DISCUSSÃO GERAL.....	121
7. CONCLUSÕES.....	131
8. REFERÊNCIAS	135
9. ANEXOS.....	147
9.1 Anexo I.....	149
9.2 Anexo II.....	151
9.3 Anexo III.....	153
9.4 Anexo IV	159
9.5 Anexo V	161
9.6 Anexo VI	163

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Parâmetros para realização de estudos de estabilidade, RE nº 1, de 29 de julho de 2005	29
Tabela 2 – Substâncias presentes no cromatograma do PS40.....	56
Tabela 3 – Análise de exatidão para o ácido caféico presente no PS40.....	58
Tabela 4 – Características sensoriais PS40 exposto à temperatura de 80 °C, por 28 dias.....	59
Tabela 5 – Perda por dessecação PS40 exposto à temperatura de 80 °C, por 28 dias.....	59
Tabela 6 – Constituintes fenólicos PS40 exposto à temperatura de 80 °C, por 28 dias.....	61
Tabela 7 – Características sensoriais PS40 exposto à 50 ± 2 °C / 90 ± 5 % UR, por 3 meses.....	68
Tabela 8 – Perda por dessecação PS40 exposto à 50 ± 2 °C / 90 ± 5 % UR, por 3 meses.....	68
Tabela 9 – Constituintes fenólicos PS40 exposto à 50 ± 2 °C e 90 ± 5 % UR, por 3 meses.....	70
Tabela 10 – Características sensoriais PS 40 exposto à 25 ± 2 °C e 60 ± 5 % UR, por 12 meses.....	71
Tabela 11 – Perda por dessecação PS40 exposto à 25 ± 2 °C e 60 ± 5 % UR, por 12 meses.....	72
Tabela 12 – Constituintes fenólicos PS40 exposto à 25 ± 2 °C e 60 ± 5 % UR, por 12 meses.....	73
Tabela 13 – Características sensoriais PS40, exposição à radiação UV-C , por 48 horas.....	77
Tabela 14 – Perda por dessecação PS40, exposição à radiação UV-C , por 48 horas.....	78
Tabela 15 – Concentração dos constituintes fenólicos PS40, exposição à radiação UV-C , por 48 horas.....	79

Tabela 16 –Concentração dos constituinte fenólicos presentes em PS40 e PS40+ (80 °C/ 2 dias).....	81
Tabela 17 - Efeito do PS40 e PS40+ (500 mg/kg), sobre o edema de pata de rato induzido por carragenina	82
Tabela 18 – Substâncias presentes no cromatograma do PS 80.....	84
Tabela 19 – Características sensoriais PS80 exposto à temperatura de 80 °C, por 14 dias.....	89
Tabela 20 – Perda por dessecação PS80 exposto à temperatura de 80 °C, por 14 dias.....	89
Tabela 21 – Constituintes fenólicos PS80 exposto à temperatura de 80 °C, por 14 dias.....	91
Tabela 22 – Características sensoriais PS80 exposto à 40 °C ± 2 °C e 75 % ± 5 % UR, por 3 meses.....	92
Tabela 23 – Perda por dessecação PS 80 exposto à 40 °C ± 2 °C e 75 % ± 5 % UR, por 6 meses	93
Tabela 24 – Constituintes fenólicos PS80 exposto à 40 ± 2 °C e 75 ± 5 % UR, por 6 meses.....	93
Tabela 25 – Características sensoriais PS80 exposto à 30 ± 2 °C e 75 ± 5 % UR, por 12 meses.....	95
Tabela 26 – Perda por dessecação PS80 exposto à 30 ± 2 °C e 75 ± 5 %UR, por 12 meses.....	95
Tabela 27 – Constituintes fenólicos PS80 exposto à 30 ± 2 °C e 75 ± 5 %UR, por 12 meses.....	97
Tabela 28 – Características sensoriais PS80, exposição à radiação UV-C, por 48 horas.	98
Tabela 29 – Perda por dessecação PS80, exposição à radiação UV-C, por 48 horas	98
Tabela 30 – Concentração dos constituintes fenólicos PS80, exposição à radiação UV-C , por 48 horas.....	100
Tabela 31 - Parâmetros de cinética de degradação de substâncias presentes no PS80, submetido à temperatura de 80 °C	102

Tabela 32 - Parâmetros de cinética de degradação de substâncias presentes no PS80, submetido à radiação UV-C por 96 horas	103
Tabela 33 – Valores de deslocamentos químicos e atribuição dos carbonos a partir do espectro RMN ¹³ C da substância P8	115
Tabela 34 – Valores de deslocamentos químicos multiplicidade, constante de acoplamento e atribuição dos hidrogênios a partir do espectro RMN ¹ H da substância P8.....	116

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Núcleo fundamental dos flavonóides e ácido caféico.....	14
Figura 2 – Características macroscópicas dos produtos secos PS40 e PS80 ..	53
Figura 3 – Características microscópicas dos produtos secos PS40 e PS80....	54
Figura 4 – Cromatograma (CLAE) típico do PS40.....	55
Figura 5 - Curva analítica de quercetina.....	56
Figura 6 - Curva analítica de luteolina	57
Figura 7 - Curva analítica de ácido caféico.....	57
Figura 8 - Constituintes fenólicos PS40 (80 °C), durante 28 dias.....	60
Figura 9 – Comparativo entre a quercetina e P3 (80 °C).....	62
Figura 10 - Espectros de absorção no ultravioleta das substâncias presentes no cromatograma do PS40.....	64
Figura 11 – Comparativo PS40, tempo zero e tempo 7 dias (80 °C).....	65
Figura 12 – Constituintes fenólicos PS40 (80 °C) por 7 dias.....	66
Figura 13 - Constituintes fenólicos, PS40 (80 °C) por 4 dias.....	67
Figura 14 – Constituintes fenólicos PS40 (50 ± 2 °C / 90 ± 5 % UR), por 3 meses.....	69
Figura 15 – Constituintes fenólicos PS40 (25 ± 2 °C e 60 ± 5 % UR.), por 12 meses.....	73
Figura 16 - Concentração total dos constituintes fenólicos PS40 (25 ± 2 °C e 60 ± 5 % UR), por 12 meses	74
Figura 17 – Variação do teor de quercetina (25 ± 2 °C e 60 ± 5 % UR), por 12 meses.....	75
Figura 18 – Variação do teor de luteolina (25 ± 2 °C e 60 ± 5 % UR), por 12 meses.....	76

Figura 19 –Variação do teor de 3- <i>O</i> -metilquercetina (25 ± 2 °C e 60 ± 5 % UR), por 12 meses.....	76
Figura 20 – Constituintes fenólicos PS40, exposição à radiação UV-C, por 48 horas	76
Figura 21 - Constituintes fenólicos PS40, exposição à radiação UV-C, por 48 horas (individualizados).....	80
Figura 22 – Cromatograma típico do PS80	83
Figura 23 – Cromatograma do PS40 adicionado de PS80.....	85
Figura 24 – Espectros de absorção no ultravioleta das substâncias presentes no cromatograma do PS80.....	86
Figura 25 - Curva analítica de quercetina.....	87
Figura 26 - Curva analítica de luteolina	87
Figura 27 - Curva analítica de 3- <i>O</i> -metilquercetina	88
Figura 28 - Constituintes fenólicos PS80 (80 °C), durante 14 dias.....	90
Figura 29 – Constituintes fenólicos PS80 (40 °C \pm 2 °C e 75 % \pm 5 % UR), por 6 meses.....	94
Figura 30 - Constituintes fenólicos PS80 (30 °C \pm 2 °C e 75 % \pm 5 % UR), por 12 meses.....	96
Figura 31 - Constituintes fenólicos PS80, exposição à radiação UV-C, por 48 horas	99
Figura 32 - Cinética de degradação térmica PS80 a 80 °C, por 49 dias	101
Figura 33 - Cinética de degradação sob radiação UV-C, PS80, por 96 horas..	103
Figura 34 - Cromatograma da fração contendo a substância P3, obtida a partir de PS40.....	104
Figura 35 - Cromatograma da fração contendo a substância P1, obtida a partir de PS40.....	105
Figura 36 - Cromatograma da fração contendo a substância P2, obtida a partir de PS40.....	106

Figura 37 - Cromatograma da fração contendo a 3-O-metilquercetina, obtida a partir de PS40.....	107
Figura 38 – Espectro de massas do pico correspondente à quercetina	110
Figura 39 – Espectro de massas do pico correspondente à luteolina	111
Figura 40 – Espectro de massas do pico referente a 3-O-metilquercetina.....	112
Figura 41– Espectro de massas da substância P8 (PS80)	114
Figura 42– Espectro RMN 13C da substância P8 (PS80)	115
Figura 43– Espectro RMN 1H da substância P8 (PS80)	117
Figura 44 – Espectro correlação COSY da substância P8 (PS80)	118
Figura 45– 4,2',4'',2'''-tetraidróxi-6',6'''-dimetóxi- 4'-O- 4'''-bichalcona	119

LISTA DE ABREVIATURAS

SE40 e SE80 = Soluções extrativas obtidas, por maceração, a partir sumidades floridas de *Achyrocline satureioides* com solução hidroetanólica contendo 40 % (v/v) de etanol (SE40) e a partir de solução hidroetanólica contendo 80 % (v/v) de etanol (SE80)

EC40 e EC80 = Extratos concentrados obtidos a partir de solução extrativa hidroetanólica de *Achyrocline satureioides* contendo 40 % (v/v) de etanol (EC40) e a partir de solução extrativa hidroetanólica contendo 80 % (v/v) de etanol (EC80)

PS40 e PS80 = Produtos secos obtidos a partir extratos concentrados de *Achyrocline satureioides* obtidos a partir de solução extrativa hidroetanólica contendo 40 % (v/v) de etanol (PS40) e a partir de solução extrativa hidroetanólica contendo 80 % (v/v) de etanol (PS80)

PS40+ = PS40 contendo maior teor de quercetina

P1, P2 e P3 = substâncias não identificadas presentes no PS40

P4, P5ab, P6, P7 e P8 = substâncias não identificadas presentes no PS80

CAF = ácido caféico

Q = quercetina

L = luteolina

3-O-MQ = 3-O-metilquercetina

A = frasco âmbar

T = frasco transparente

V = vidro de relógio

RESUMO

Dois extratos secos de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC., preparados a partir de soluções extrativas hidroetanólicas contendo 40 %(v/v) e 80 % (v/v) de etanol, denominados respectivamente de PS40 e PS80, foram avaliados no que concerne a sua estabilidade frente à temperatura e à luz. Para a avaliação de PS40 e PS80 frente à temperatura foram realizados estudos em condição de estresse (80 °C, 28 dias para PS40 e 14 dias para PS80), estudo de estabilidade acelerada (50 ± 2 °C/ 90 ± 5 UR, durante 3 meses para o PS40 e 40 ± 2 °C/ 75 ± 5 UR, durante 6 meses para o PS80) e estudo de longa duração, 12 meses (25 ± 2 °C e 60 ± 5 % UR, para PS40 e 30 ± 2 °C e 75 ± 5 % UR, para PS80). Para a avaliação da fotoestabilidade, PS40 e PS80 foram submetidos à radiação UV-C, durante 48 horas. Em todos os testes, a concentração dos constituintes fenólicos foi avaliada por CLAE, sendo a quercetina, luteolina, e 3-O-metilquercetina utilizadas como substâncias de referência, em ambos os extratos PS40 e PS80. A concentração de ácido caféico e das substâncias não identificadas P1, P2 e P3 foram avaliadas em PS40 e a concentração de P4, P5ab, P6, P7 e P8 em PS80. Os testes de estabilidade de longa duração de PS40 e PS80 revelaram que a concentração total dos constituintes fenólicos manteve-se dentro dos limites de ± 10 %, por 9 e 12 meses, respectivamente. Nestes extratos, as substâncias quercetina, luteolina e 3-O-metilquercetina, individualmente, mantiveram-se dentro dos limites de ± 10 %, por 12 meses. O estudo do PS40 e do PS80, em condições de estresse, revelou aumento do teor de quercetina a partir do segundo dia até 7 dias, mas com redução dos constituintes, ácido caféico e P3 no PS40 e P5ab e P8 no PS80. O produto contendo maior teor de quercetina obtido a partir do PS40, denominado PS40+, foi avaliado quanto a sua atividade antiedematogênica, apresentando, na terceira hora diferença significativa ($p < 0,05$; *Student's t-test*) em relação ao controle negativo e, também, em relação ao controle positivo e na quarta hora, apresentou diferença significativa ($p < 0,01$; *Student's t-test*) em relação ao grupo controle negativo. Não houve diferença significativa entre a atividade observada para o PS40 e PS40+ contendo o maior teor de quercetina ($p < 0,05$; *Student's t-test*). No teste de estabilidade acelerado, para o PS40, o ácido caféico, a quercetina e a substância P3 reproduziram o comportamento instável,

demonstrado no estudo em condições de estresse, as demais substâncias mantiveram-se dentro dos limites de $\pm 10\%$, durante 3 meses. Para o PS80 as substâncias P5ab e P8 tiveram seus teores reduzidos além do limite de $\pm 10\%$ e as demais substâncias mantiveram-se dentro deste limite, no teste de estabilidade acelerado, durante 6 meses. O estudo da fotoestabilidade revelou que PS40 e PS80 são estáveis por 48 horas, quando acondicionados em frasco de vidro âmbar ou transparente. No entanto, quando expostos à luz UVC em vidro de relógio, os constituintes fenólicos apresentaram-se instáveis. O estudo de cinética de degradação do PS80 demonstrou que as substâncias estudadas: quercetina, luteolina, 3-O-metilquercetina e P8 seguem cinética de reação de segunda ordem, quando submetidas à temperatura de 80 °C e por sua vez, seguem cinética de primeira ordem quando submetidas à radiação UV-C. Por meio de comparação com substância de referência e pelo teste de recuperação, foi possível identificar o ácido caféico, presente no PS40. Utilizando a cromatografia em coluna, foram isoladas as substâncias P1, P2, P3 e 3-O-metilquercetina a partir do PS40. A partir de PS80 foi isolada, por cromatografia em camada delgada preparativa, e identificada a substância P8. A elucidação estrutural da substância P8 (PS80) e a correspondente P3 (PS40) revelou tratar-se da 4,2',4'',2'''-tetraidróxi-6',6'''-dimetóxi-4'-O-4'''- bichalcona.

Palavras-chave: *Achyrocline satureioides*, produtos secos, estabilidade, cinética de degradação, bichalcona.

ABSTRACT

Stability study of spray dried powders from *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. Asteraceae.

Thermal and photo stabilities of two *Achyrocline satureioides* spray dried powders, SDP40 and SDP80, were evaluated. These spray dried powders were, respectively, prepared from 40 % (v/v) or 80 % (v/v) ethanol extractive solution of the inflorescences. The thermal stability test conditions for SDP40 and SDP80 were the stress testing (80 °C, 28 days for SDP40 e 14 days for SDP80), the accelerated term testing (50 ± 2 °C/ 90 ± 5 RH, 3 months, for SDP40 and 40 ± 2 °C/ 75 ± 5 RH, 6 months, for SDP80) and the long term testing (25 ± 2 °C / 60 ± 5 % RH, for SDP40 and 30 ± 2 °C / 75 ± 5 % RH for SDP80). In the photo stability study SDP40 and SDP80 were submitted to UV-C radiation, for 48 hours. The long term testing for SDP40 and SDP80 revealed that the total concentration of phenolic constituents remained within the limit of ± 10 %, for 12 month, in both extracts. When SDP40 and SDP80 were submitted to stress testing, at the final of the second or the seventh day, respectively, it was observed an anomalous increase in the quercetin concentration; in contrast, caffeic acid and P3 in SDP40 and P5ab and P8 in SDP80 presented its concentrations decreased. The product with higher amount of quercetin, obtained from SDP40, designed SDP40+, was evaluated regarding to antiedematogenic activity, showing at the third hour significant difference (p < 0,05; Student's *t*-test) related to the negative control, as well as to the positive control. At the fourth hour it showed significant difference (p < 0,01; Student's *t*-test), related to the negative control. Between, SDP40 and SDP40+ it was not observed significant difference (p < 0,05; Student's *t*-test). In the accelerated term testing, for SDP40, caffeic acid, quercetin and substance P3, reproduced the unstable behavior observed in the stress testing; the other phenolic constituents remained within the limit of ± 10 %, for 3 months. For SDP80 accelerated term testing, the substances P5ab and P8 degraded below the limit of ± 10 % its concentration; the other phenolic constituents remained with its concentrations within the limit, for 6 months. The photostability study revealed that SDP40 and SDP80 were stable for 48 hours, when they were conditioned in amber or transparent flask. However, when they were conditioned in open-dish, the phenolics

showed unstable behavior. The kinetic of degradation study revealed that the polyphenols quercetin, luteolin, 3-*O*-methylquercetin and P8 followed second order reaction, when submitted to temperature (80 °C), and first order reaction when submitted to UV-C radiation. Regarding the identification of the phenolic constituents in SDP40 or SDP80, caffeic acid was identified in SDP40 by comparison with the reference substance. Column chromatography was used to isolate, from SDP40, the substances P1, P2, P3 and 3-*O*-methylquercetin. Preparative thin layer chromatography was used to isolate, from SDP80, the substance P8, which was identified. The structural elucidation of substance P8 (SDP80) and the corresponding P3 (SDP40) revealed that its chemical molecular formula is 4,2',4'',2'''-tetrahydroxy-6',6'''-dimethoxy-4'-*O*-4'''-bichalcone, for the first time reported to *Achyrocline satureioides*.

Key words: *Achyrocline satureioides* spray dried powder, stability, kinetic of degradation, bichalcone.

RELEVÂNCIA DO TEMA

O interesse por medicamentos de origem vegetal tem crescido expressivamente nos últimos anos com o intuito de substituir ou complementar a terapêutica convencional. Infelizmente, a qualidade da maioria destes produtos ainda carece de controle adequado e de estudos de estabilidade, razão pela qual não são classificados, em geral, como medicamentos (BILIA *et al.*, 2001).

Na legislação brasileira, a RDC n° 48, de 16 de março de 2004, (BRASIL, 2004) dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. No entanto, a indústria farmacêutica brasileira vem encontrando dificuldades para registrar estes medicamentos, que estão, freqüentemente, relacionadas à escassez de procedimentos de padronização e de controle de qualidade das matérias-primas, preparações intermediárias e finais. Esta limitação, bem como o reduzido número de investigações pré-clínicas e clínicas dos produtos, demonstram a importância de pesquisas no desenvolvimento de produtos farmacêuticos derivados.

Um dos aspectos críticos no desenvolvimento de fitoterápicos é o estudo da estabilidade, face à complexidade de composição dos mesmos. Testes de estabilidade são procedimentos de rotina bem definidos para produtos farmacêuticos, aplicados em várias fases de seu desenvolvimento. Nos estágios iniciais, testes de estabilidade acelerada (altas temperaturas e umidades) podem ser usados para produtos contendo fármacos, com o intuito de simular condições extremas de armazenagem e assim determinar os tipos de produtos de degradação esperados, após um período longo de armazenagem (KOMMANABOYNA, 1999; YOSHIOKA e STELLA, 2000; BAERTSCHI, 2005).

Em 1981, foram iniciadas pesquisas no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) envolvendo estudos fitoquímicos, farmacológicos, biotecnológicos, de tecnologia farmacêutica e controle de qualidade de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. Esta espécie vegetal, conhecida popularmente como marcela ou macela, é nativa da região sudeste subtropical e temperada da América do Sul, e tem seu emprego popular mais

intenso no Sul do Brasil, Uruguai, Argentina e Paraguai, como antiinflamatório, antiespasmódico, digestivo, carminativo, entre outros (SIMÕES *et al.*, 1998).

Estudos utilizando modelos *in vitro* ou *in vivo* demonstram diversas atividades farmacológicas relacionadas à espécie *Achyrocline satureioides*, destacando-se: antiespasmódica (LANGELOH e SCHENKEL, 1985; LEMOS-SENNA, 1993); antioxidante, anti-radicais livres e citoprotetora (DEMARCHELIER *et al.*, 1998; GUGLIUCCI e MENINI, 2002; ARREDONDO *et al.*, 2004); hepatoprotetora, antioxidante e colerética (KADARIAN *et al.*, 2002); relaxante da musculatura lisa e vasorelaxante (SIMÕES *et al.*, 1988; HNATYSZYN *et al.*, 2004); *antiglycation* (GUGLIUCCI e MENINI, 2002); hipoglicemiante (CARNEY *et al.*, 2002); analgésica e sedativa (SIMÕES *et al.*, 1988); antiviral (ZANON *et al.*, 1999; BETTEGA *et al.*, 2004); antimicrobiana (ANESINI E PEREZ, 1993); inseticida e tripanossomicida (ROJAS de ARIAS *et al.*, 1995); citotóxica frente ao carcinoma hepatocelular humano (RUFFA *et al.*, 2002); fotoprotetora para aplicação tópica (MORQUIO *et al.*, 2005); antiinflamatória e imunomodulatória (WAGNER *et al.*, 1985; SIMÕES *et al.*, 1988; PUHLMANN *et al.*, 1992; SANTOS *et al.*, 1999, De SOUZA *et al.*, 2007; CONSENTINO *et al.*, 2008).

Estudos avaliando diversas preparações, obtidas a partir de *Achyrocline satureioides*, sobre a toxicidade celular são contraditórios (POLYDORO *et al.*, 2004; RIVERA *et al.*, 2004; ARREDONDO *et al.*, 2004). Destes estudos, somente o realizado por Rivera e colaboradores (2004) refere-se à avaliação de toxicidade aguda por via oral, simulando o uso tradicional, não sendo observados efeitos tóxicos. No entanto estudos de genotoxicidade desenvolvidos por Vargas e colaboradores, demonstraram resultados positivos, para extratos aquosos preparados com *Achyrocline satureioides* (VARGAS, *et al.*, 1991).

Entre os diversos estudos de desenvolvimento de produtos secos obtido por *spray-drying* (BASSANI *et al.*, 1990; LEMOS-SENNA, 1997; TEIXEIRA, 1996; DE PAULA, 1996) destaca-se o trabalho realizado por De Souza (2007) que apresentou estudo comparativo entre três soluções extrativas: aquosa ou hidroetanólicas com etanol 40 % (v/v) ou etanol 80 % (v/v), bem como entre técnicas de secagem, liofilização ou *spray-drying*, além da influência de adjuvantes de secagem. Entre estes

produtos, o liofilizado e o produto seco obtido por *spray-drying* do macerado com etanol 40 % (v/v) apresentaram a mais pronunciada atividade antiinflamatória, por via oral, em ensaios em ratos. Por sua vez, o produto obtido por liofilização de macerado com etanol 80 % (v/v) demonstrou a mais pronunciada atividade antioxidante, *in vitro* (POLYDORO *et al.*, 2004).

No que concerne à estabilidade de produtos secos da planta, até o presente, não foram encontradas na literatura relatos sobre este aspecto.

Neste contexto, o objetivo do presente trabalho consiste na investigação da estabilidade de produtos secos obtidos por *spray-drying* a partir de soluções extrativas de inflorescências de *Achyrocline satureioides* preparadas com etanol 40 % (PS40) ou etanol 80 % (PS80). Estes produtos fazem parte de patente depositada no INPI-PI 0103468-5 (BASSANI *et al.*, 2001).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar a estabilidade de produtos secos por *spray-drying* obtidos a partir de soluções extrativas de inflorescências de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. em etanol 40 % (PS40) e em etanol 80 % (PS80) (BASSANI et al., 2001).

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a estabilidade do produto seco PS40 frente à temperatura e à luz;
- Avaliar a atividade antiinflamatória do produto seco PS40, antes e após, degradação pelo calor;
- Avaliar a estabilidade do produto seco PS80 frente à temperatura e à luz;
- Avaliar a cinética de degradação das substâncias quercetina, luteolina, 3-O-metilquercetina e P8 presentes no produto seco PS80 frente à temperatura e à luz;
- Isolar e identificar composto químico de interesse, resultantes ou não da degradação.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Aspectos botânicos e fitoquímicos:

Nome científico: *Achyrocline satureioides* (Lamarck) De Candolle, família *Asteraceae*, tribo *Inulae* (ICS, 2008).

Sinonímia botânica:

Achyrocline satureioides (DC.) Lam.
Achyrocline albicans Gris.
Achyrocline candidans DC.
Achyrocline citrina Gris.
Achyrocline matholaefolia DC.
Achyrocline mollis Bentham
Achyrocline vargasiana DC.
Gnaphalium satureioides Lamarck
Achyrocline satureioides (Lam.) var. *citrina* Lorentz (ICS, 2008).

Nomes populares:

Brasil: marcela, marcela-do-campo, macela, macela-do-campo;

Argentina: vira-vira, marcela hembra, bira-bira, marcela del campo, juan blanco, marcelita;

Uruguai: marcela blanca;

Guarani: yatey-caá;

Quéchua: alkko wira wira, wira wira (ICS, 2008).

O gênero *Achyrocline* DC., pertencente a família *Asteraceae*, compreende entre 20 a 30 espécies afro-americanas, distribuídas em regiões tropicais e subtropicais da América do Sul e Central, África e Madagascar. Entre as espécies encontradas na América do Sul destacam-se *Achyrocline alata*, *Achyrocline tomentosa*, *Achyrocline flaccida* e *Achyrocline satureioides* (GUPTA,1995).

Trata-se de uma erva anual, monóica, ramificada, de até 1,5 m de altura, coberta de pilosidade branca. Folhas alternas, inteiras sésseis, lineares e lanceoladas, de até 12 cm de comprimento por 1,8 cm de largura. Capítulos com dois tipos de flores, reunidos em panículas corimbosas. Flores amarelo-douradas, as centrais hermafroditas, de corola tubulosa, em número de uma a duas e as flores marginais,

quatro ou cinco, femininas de corola filiforme; papus branco. Fruto do tipo aquênio, glabro e pardo(SIMÕES *et al*,1998).

Seu *habitat* natural é a América austral oriental, florescendo espontaneamente no Uruguai, Paraguai, Argentina e sul do Brasil. No Estado do Rio Grande do Sul cresce, abundantemente, sob forma de vegetal silvestre, tanto em solos arenosos como em solos basálticos (SIMÕES *et al*,1998).

Ferraro e colaboradores, em 1981, isolaram a partir das partes aéreas secas de *Achyrocline satureioides*, coletada na Argentina, substâncias flavonoídicas, dentre as quais as agliconas quercetina, galangina, 3-*O*-metilquercetina, além de ácido caféico. Norbedo e colaboradores, também em 1981, descreveram a presença de uma flavanona, 7,4'-diidróxi-5-metóxi-flavanona, e de uma chalcona nas partes aéreas de *Achyrocline flaccida*.

Simões (1984) ao estudar as sumidades floridas de *Achyrocline satureioides*, coletadas na região Sul do Brasil, isolou, a partir resíduo resultante da evaporação de extrato etanólico, redissolvido em metanol e éter, ácido caféico, quercetina, 3-*O*-metilquercetina, luteolina (Figura 1), uma aglicona flavonoídica poliidroxilada não identificada, 7,4'-diidróxi-5-metóxi-flavanona e 7-*O*-glicosídeo de 3-*O*-metilquercetina.

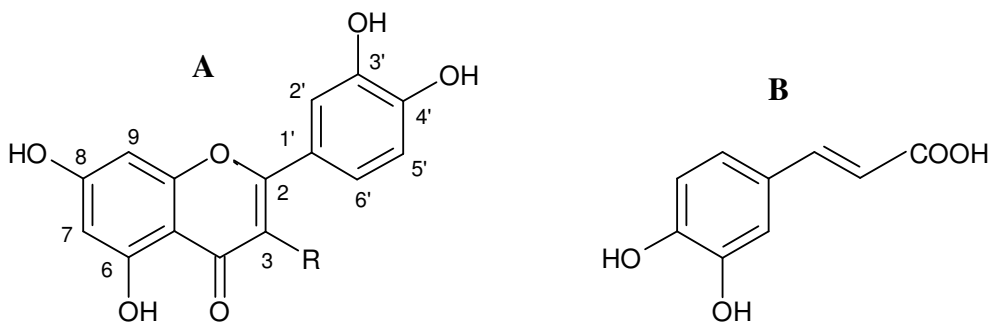


Figura 1 – A = núcleo fundamental dos flavonóides: quercetina (R - OH), 3-*O*-metilquercetina (R - CH₃OH) e luteolina (R - H) e B = ácido caféico.

A partir de extrato etanólico de folhas secas de *Achyrocline satureioides* var. *albicans* foram isolados os flavonóides 5-hidróxi-3,6,7-trimetóxi-flavona (alnustina), 5,7,8-trimetóxi-flavona, 7-hidróxi-flavona e 3,5,7,8-tetrametóxi-flavona (MESQUITA *et al.*, 1986).

Em 1988 e 1989, Broussalis e colaboradores publicaram estudos fitoquímicos com partes aéreas de quatro espécies de *Achyrocline* coletadas na Argentina, *A. alata*, *A. tomentosa*, *A. flaccida* e *A. satureioides*. Nos estudos relataram para a espécie *Achyrocline satureioides* a presença de quercetina, 3-O-metilquercetina, 3,7-di-O-metilquercetina, tamarixetina (4'-O-metilquercetina), galangina (3,5,7-triidróxilflavona), gnafalina (5,7-diidróxi-3,8-di-O-metilflavona), isognafalina (5,8-diidróxi-3,7-di-O-metilflavona), quercetagetina (6-hidróxi-quercetina), os ácidos fenólicos caféico, clorogênico, isoclorogênico, entre outros. A espécie *Achyrocline flaccida* apresentou em sua composição flavonóis, duas flavanonas, uma chalcona descrita como 4,2',4'-triidróxi-6'-metóxi-chalcona e ácidos fenólicos. Para *Achyrocline alata* relataram a presença de apigenina, de flavonóis, de uma flavanona e de ácidos fenólicos (BROUSSALIS *et al.*, 1988; BROUSSALIS *et al.*, 1989).

Para a espécie *Achyrocline satureioides* foi relatada, também, a presença de polissacarídeos em extratos obtidos a partir de partes aéreas secas da espécie vegetal (WAGNER *et al.*, 1984; PUHLMANN, 1989; PUHLMANN *et al.*, 1992), e em análise, por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, foram observados polissacarídeos constituídos por oses neutras, xilose, arabinose, frutose, galactose, manose e glicose (SANTOS, 1996). Outras substâncias foram identificadas nesta espécie vegetal, como cavapirona (KALOGA *et al.*, 1983), 23-metil-6-O-desmetilauricepirona e italdipirona (HIRSCHMANN, 1984) e minerais (PUHLMANN, 1989).

Em óleo volátil, obtido a partir de inflorescências de *Achyrocline satureioides*, coletadas em diversos locais no Sul do Brasil, foram identificados α -pineno (como componente majoritário), β -pineno, limoneno, β -cariofileno e 1,8-cineol (AKISUE, 1971; BAUER *et al.*, 1979; LAMATY *et al.*, 1991). Para amostras de *Achyrocline satureioides*

coletadas na Argentina, cariofileno foi indicado como o componente mais abundante, e para amostras coletadas no Uruguai, α -pineno tem sido relatado como o constituinte majoritário do óleo volátil (LABUCKAS *et al.*, 1999; LORENZO *et al.*, 2000).

Para a espécie foi também relatada, a presença de uma substância derivada do dibenzofurano presente no extrato etanólico 80 % (v/v), da planta inteira, denominada de aquirofurano (CARNEY *et al.*, 2002).

Os derivados fenólicos presentes nas diversas espécies do gênero *Achyrocline* apresentam ação sobre sistemas biológicos, de onde decorre o interesse da avaliação de sua atividade farmacológica e de sua estabilidade química em produtos destinados ao uso terapêutico.

3.2 Aspectos tecnológicos

A secagem por *spray-drying* apresenta um vasto campo de aplicações nas indústrias química, alimentícia, biotecnológica e farmacêutica. Face às propriedades bem definidas que confere ao produto, como tamanho e forma das partículas, a técnica revela-se de grande interesse no desenvolvimento de produtos farmacêuticos. A secagem ocorre por meio da dispersão do líquido na forma de pequenas gotículas, no interior de uma câmara de secagem na qual é introduzida uma corrente de ar quente. Assim que as gotículas do líquido entram em contato com o ar quente, inicia-se a evaporação originando uma película na superfície das gotículas. Devido a sua espessura, a posterior evaporação de solvente fica restrita, ocorrendo, em geral, devido à pressão interna, a abertura de um orifício por onde sai o vapor. As partículas formadas, quando quase secas tornam-se mais sensíveis ao calor, mas são rapidamente removidas do sistema. Portanto, mesmo no caso de produtos termolábeis, a degradação em larga escala pode não ocorrer, pois, a evaporação do solvente consome a maior parte do calor disponível. Geralmente, as partículas alcançam temperaturas máximas situadas em 15 a 20 °C abaixo da temperatura de saída, nos sistemas de secagem em co-corrente. A extensão da degradação de materiais termolábeis é particularmente dependente da combinação tempo-temperatura que estes encontram durante o processo de secagem, bem como da termolabilidade dos

constituintes químicos. Tipicamente, o período de tempo de exposição a altas temperaturas é somente de 5 a 30 segundos (BROADHEAD *et al.*, 1992).

Assim, a grande utilização da secagem por *spray-drying* deve-se às vantagens apresentadas pela técnica, tais como, baixo risco de degradação química durante a operação; versatilidade na obtenção de pós, grânulos ou aglomerados e elevado rendimento por tempo de produção. Consiste numa técnica de baixo custo, quando comparada a outras técnicas de secagem, tais como a liofilização (MASTERS, 1976; LIST e SCHMIDT, 1989).

A necessidade de utilizar adjuvantes de secagem tem sido evidenciada por diversos autores, tanto como fator crítico no rendimento do processo, como na padronização da qualidade e na manutenção da estabilidade do extrato seco por *spray-drying* (JACOB *et al.*, 1976; SOERTANO, 1980; CASADEBAIG, 1987; BASSANI, 1990; GAUDY *et al.*, 1991).

A viabilidade de obtenção de extrato seco por *spray-drying* de *Achyrocline satureioides* foi verificada pela primeira vez por Bassani (1990) seguindo-se estudos de aprofundamento do seu desenvolvimento, por Lemos-Senna (1993).

Teixeira, em 1996, avaliou a influência de adjuvantes farmacêuticos, dióxido de silício coloidal, celulose microcristalina e β -ciclodextrina sobre as características físicas, químicas e tecnológicas de três produtos secos por *spray-drying*, preparados a partir de solução extrativa hidroetanólica 80 % (v/v) de *Achyrocline satureioides*, previamente desalcoholizada. O autor concluiu que o produto seco, contendo dióxido de silício coloidal como adjuvante de secagem, apresentava as melhores características de rendimento, umidade residual, recuperação de flavonóides e estabilidade física frente à umidade relativa.

De Souza, em 2002, preparou produtos secos, por *spray-drying* (Büchi 190), a partir de soluções extrativas, de *Achyrocline satureioides*, preparadas com soluções hidroetanólicas com etanol 40 % ou etanol 80 % (v/v). Foram utilizados como adjuvantes de secagem dióxido de silício coloidal ou dióxido de silício coloidal

associado à β -ciclodextrina. Os produtos obtidos a partir de solução hidroetanólica 40 % (v/v) apresentaram baixo rendimento, 50 % para o produto que tem somente o dióxido de silício coloidal como adjuvante de secagem e 39 % para o produto contendo dióxido de silício coloidal associado à β -ciclodextrina. Os produtos obtidos a partir de solução hidroetanólica 80 % (v/v), contendo os adjuvantes citados anteriormente, apresentaram rendimentos, respectivamente, de 75 e 70 %, semelhante ao relatado por Teixeira (1996). O teor de umidade destes produtos situou-se em torno de 5 %, ou seja, dentro dos limites aceitos, para extratos secos, que varia de 4 a 16 % (PHARMACOPEÉ, 1980; BRITISH, 2008; F. BRAS. IV, 1988). Os produtos obtidos somente com dióxido de silício coloidal como adjuvante de secagem apresentaram maior rendimento, em relação às substâncias flavonoídicas de referência, quercetina, luteolina e 3-O-metilquercetina.

Silva e colaboradores, em 2003, obtiveram em escalas piloto e laboratorial produtos secos por *spray-drying*, a partir de solução extrativa de *Achyrocline satureioides*, preparada com etanol 40 % (v/v), utilizando como adjuvantes de secagem dióxido de silício coloidal associado à celulose microcristalina. Tanto em escala piloto, como em laboratorial, o rendimento ficou em torno de 70 %. Para o produto obtido em escala laboratorial, observaram-se partículas com diâmetro médio de 2 μm e para o produto obtido em escala piloto as partículas apresentaram diâmetro médio de 10 μm . As partículas apresentaram semelhanças quanto à forma, esférica e oca, em ambas as escalas de produção.

3.3 Aspectos Analíticos

As orientações para a realização de testes de estabilidade foram significativamente alteradas em consequência de dois principais avanços tecnológicos: o uso de métodos cromatográficos, que permitem a separação e doseamento de substâncias intactas, diferenciadas de seus produtos de degradação; e o emprego do computador para a aquisição e tratamento dos dados, armazenamento, análise e elaboração de relatórios finais. Mais recentemente, o avanço no desenvolvimento de sistemas de detecção, especialmente o acoplamento de sistemas ultra-sensíveis como

detectores de massas aos aparelhos de cromatografia líquida de alta eficiência abriu uma nova perspectiva analítica para as matrizes complexas e contendo substâncias em baixas concentrações.

Vários trabalhos têm sido desenvolvidos com a finalidade de realizar o doseamento de flavonóides por CLAE em preparações fitoterápicas de *Achyrocline satureioides* (BASSANI, 1990; LEMOS-SENNA, 1993; DE PAULA, 1996; SANTOS, 1996; TEIXEIRA, 1996). Entretanto, as condições cromatográficas empregadas, a pesar de possibilitar a obtenção de um pico correspondente à quercetina, com adequada resolução, não foi possível a separação entre luteolina e 3-O-metilquercetina, sendo estas quantificadas conjuntamente e expressas em luteolina

De Souza, em 2002, desenvolveu um método por cromatografia líquida que permitiu separar a luteolina da 3-O-metilquercetina e quantificá-las. Este método foi validado segundo os parâmetros estabelecidos pela ICH (1996) e pela USP 24 (2000). Os resultados demonstraram que o método proposto apresentava linearidade, precisão e exatidão (DE SOUZA *et al.*, 2002).

3.4 Atividade antiinflamatória de produtos secos de *Achyrocline satureioides*

Quando ocorre lesão tecidual, seja ela causada por bactérias, trauma, agentes químicos, calor ou qualquer outro fenômeno, diversas substâncias são liberadas pelos tecidos danificados. Todo esse complexo de alterações teciduais caracteriza o processo de inflamação.

O estudo da atividade antiinflamatória, pelo ensaio de edema em pata de rato, induzido pela carragenina, avalia o processo inflamatório na sua fase aguda. Esse processo caracteriza-se por vasodilatação com conseqüente aumento do fluxo sangüíneo local, aumento da permeabilidade dos capilares permitindo a saída de grande quantidade de líquido para os espaços intersticiais (edema), coagulação do líquido nos espaços intersticiais devido a quantidades excessivas de fibrinogênio e outras proteínas que migram dos capilares, migração de grande quantidade de monócitos e granulócitos para os tecidos e dilatação das células teciduais. Muitos são

os agentes teciduais causadores dessas reações, entre os quais, encontram-se a histamina, a bradicinina, as prostaglandinas, diversos produtos da reação do sistema complemento, produtos da reação do sistema de coagulação sangüínea e várias substâncias denominadas linfocinas, que são liberadas pelas células T sensibilizadas (GUYTON e HALL,2006).

Observa-se, num primeiro momento, após a injúria, dilatação e aumento da permeabilidade dos vasos na área afetada com migração de leucócitos e aumento de fluxo sangüíneo pela liberação de histamina. Estes fenômenos determinam o surgimento de eritema, aumento da temperatura local e o extravasamento do plasma para os tecidos intersticiais. O plasma acumulado nos tecidos extracelulares é responsável pelo aparecimento de edema e, como conseqüência, ocorre aumento da concentração de células no interior dos vasos com diminuição da velocidade de circulação e posterior marginação leucocitária (LARSEN e HENSON, 1983; GUYTON e HALL, 2006). Os leucócitos migram pelos interstícios em direção ao foco inflamatório, mediados por substâncias quimiotáxicas, sendo o fenômeno denominado quimiotaxia (LEY, 1996; GUYTON e HALL, 2006).

A atividade antiinflamatória de soluções extrativas obtidas a partir de *Achyrocline satureioides* foi avaliada, empregando principalmente, o modelo de edema em pata de rato induzido por carragenina e a via de administração intraperitoneal (SONAGLIO, 1987; SIMÕES *et al.*, 1988).

Teixeira, em 1996, avaliou a atividade antiedematogênica de produtos secos de *Achyrocline satureioides*, administrados por via oral. Uma solução extrativa hidroetanólica obtida por maceração de inflorescências com etanol a 80 % (v/v) e os correspondentes produtos secos por *spray-drying*, empregando como adjuvantes dióxido de silício coloidal, celulose microcristalina e β -ciclodextrina, foram administrados na dose de 250 mg de resíduo seco por quilograma de peso. No modelo de edema de pata de rato induzido por carragenina, a solução extrativa desalcoolizada e o produto seco, obtido com a mistura dióxido de silício coloidal e β -ciclodextrina, promoveram significativa redução do edema somente a partir da 4^a hora (60 e 78 %,

respectivamente) e o produto seco contendo dióxido de silício coloidal e celulose microcristalina inibiu a formação do edema a partir da primeira hora (73 e 71 %, respectivamente).

De Souza e colaboradores (2007), avaliaram a atividade antiedematogênica de diferentes preparações extrativas obtidas a partir de *Achyrocline satureioides*, também utilizando a via oral como via de administração. Foram testadas, inicialmente, as soluções extrativas que originaram os produtos secos, uma solução extrativa aquosa preparada por decocção e duas soluções hidroetanólicas preparadas, respectivamente, por maceração com etanol 40 % e 80 % (v/v). Paralelamente, foram testados os correspondentes produtos secos por *spray-drying* obtidos a partir destas soluções extrativas contendo dióxido de silício coloidal e/ou β -ciclodextrina, como adjuvantes de secagem. Além destes, foi testado produto seco por *spray-drying* de quercetina com os excipientes já mencionados. Destes, somente o extrato seco obtido a partir da solução etanólica 40% (v/v), contendo dióxido de silício coloidal e polisorbato 80, reduziu significativamente o edema ($P < 0,01$), 41 % na primeira hora e chegando a 57; 58 e 56 % nas segunda, terceira e quarta horas, respectivamente.

3.5 Estabilidade

Segundo Nudelman (1975), a primeira razão para a realização de estudo de estabilidade de um produto é sanitária, pois o fato de uma substância não ser tóxica não significa que seus produtos de degradação também não o sejam. Além disso, mesmo que os produtos de degradação não sejam tóxicos, um medicamento degradado pode não conter a dosagem terapêutica prescrita, ou se a contém, esta pode não estar biodisponível.

Em segundo lugar, existem razões legais, que exigem que todos os medicamentos cumpram as condições de identidade, efetividade, potência, pureza e segurança durante o período em que se encontra no mercado e até o momento de seu uso (NUDELMAN, 1975).

Finalmente, existem razões econômicas. Um medicamento fora de suas especificações seja porque não contém a dose terapêutica correta ou por possuir características sensoriais que não são as esperadas, pode provocar a não-adesão ao tratamento por parte do paciente, ou pelo próprio médico (NUDELMAN, 1975).

Os fatores que podem alterar um produto com o tempo são: temperatura, radiações, umidade, oxigênio ou outros gases atmosféricos, pressão, solventes, alterações de pH, interações físicas e químicas, contaminação microbiana. Os estudos de estabilidade devem levar em conta estes fatores (NUDELMAN, 1975; LACHMAN *et al.*, 2001; YOSHIOKA e STELLA, 2000; BAERTSCHI, 2005).

Freqüentemente os processos de degradação são reações químicas que consomem energia e que podem acelerar-se pelo aumento da temperatura. A maioria dos métodos de degradação acelerada leva em conta este fato e fundamenta-se em medições de velocidade de degradação em temperaturas superiores às normais, para então inferir no que ocorreria em temperatura ambiente. Dentre os métodos de degradação acelerada propostos, os que mais se utilizam são: a aplicação direta da equação de Arrhenius, exaustivamente desenvolvida por Garrett para a predição de estabilidade; o coeficiente de temperatura; a relação de pendentes e de temperaturas oscilantes (NUDELMAN, 1975).

Se a degradação é provocada por uma reação fotolítica, esta não pode ser acelerada pelo aumento da temperatura, já que a energia de ativação é muito baixa (2-3 kcal/mol). Neste caso, a velocidade do processo pode ser incrementada pela irradiação com fontes luminosas de intensidade relativamente alta (NUDELMAN, 1975).

Um fato importante no aprimoramento dos testes de estabilidade de produtos farmacêuticos tem sido o desenvolvimento de métodos analíticos que, além de separar sistemas complexos, são sensíveis. Em particular, a disponibilidade da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada a detectores tais como UV/Vis e de massas traz um grande avanço para os testes de estabilidade (KOMMANABOYNA e RHODES, 1999; LACHMAN *et al.*, 2001).

Vários são os efeitos provocados pela instabilidade de produtos farmacêuticos, tais como:

- Perda de substâncias ativas

A perda de substâncias ativas tem grande importância no estudo de estabilidade dos produtos farmacêuticos, que está relacionada, com a perda de atividade. Em geral, é consensual que um produto com menos que 90 % do teor especificado no rótulo não possui garantia da qualidade (NUDELMAN, 1975; CARSTENSEN e RHODES, 2000; YOSHIOKA e STELLA, 2000; LACHMAN *et al.*, 2001; BAERTSCHI, 2005).

Portanto, para a maioria dos produtos farmacêuticos, determinar o tempo necessário para que o teor de substâncias ativas não seja inferior a 90 % (quando armazenado conforme instruções) é um elemento essencial para determinar o prazo de validade. A maioria dos produtos farmacêuticos é caracterizada por somente um prazo de validade. Entretanto, produtos como pós para reconstituição devem apresentar dois prazos de validade: um do pó antes da reconstituição e outro para o produto após reconstituição, no veículo adequado (NUDELMAN, 1975; CARSTENSEN e RHODES, 2000; YOSHIOKA e STELLA, 2000; LACHMAN *et al.*, 2001; BAERTSCHI, 2005).

- Aumento da concentração de substâncias ativas

Para alguns produtos, a perda do veículo resulta em aumento da concentração de substâncias ativas. Este comportamento é raro, mas para algumas situações uma imagem do gráfico da concentração pelo tempo pode ser usada para estimar o prazo de validade. Neste caso o limite de potência em 110 % define o período de conformidade (CARSTENSEN e RHODES, 2000).

- Instabilidade devido à carga microbiológica

Para produtos farmacêuticos não-estéreis, a qualidade microbiológica deve considerar a carga microbiológica total e o interesse específico de excluir microrganismos patogênicos. Com o intuito de reduzir ou eliminar a contaminação microbiológica, deve-se dar atenção à qualidade das matérias-primas e ao processo

produtivo. Certas matérias-primas de origem natural, que servem de substrato para microrganismos (amido de milho, lecitina) devem receber cuidados especiais com monitoração da carga microbiológica. Para excluir a contaminação durante a fabricação, alguns fatores, como ar circulante com pressão positiva, equipamentos adequados, pessoal treinado, procedimentos operacionais padrão, são elementos importantes (CARSTENSEN e RHODES, 2000).

- Perda das características sensoriais da forma farmacêutica e aceitabilidade pelo paciente

Inclui aspectos do produto que sugerem que este se encontra fora dos padrões ou com variações. Um bom aspecto do produto farmacêutico não quer dizer que todos os medicamentos devam ter boa aparência e sabor agradável. O que importa é que os produtos tenham seu sabor, odor e aparência reprodutíveis e inalterados, dentro do prazo adequado, e que não ocorram variações de lote-a-lote (CARSTENSEN e RHODES, 2000).

- Formação de produtos de degradação tóxicos

Se o fármaco degrada originando espécies moleculares tóxicas, deve-se dar especial atenção à quantidade destes produtos tóxicos formados durante o prazo de validade do fármaco. Nos medicamentos de origem protéica, qualquer perturbação da estrutura molecular resulta em perda de atividade e estes se tornam potencialmente tóxicos. Por esta razão, este é um aspecto do estudo da estabilidade que deverá ganhar grande importância no futuro (CARSTENSEN e RHODES, 2000). O nível de impurezas permitidas dependerá da dose e da toxicidade; entretanto, para a maioria dos fármacos, o nível permitido de impurezas sem testes clínicos toxicológicos é em geral de menos de 1%, com base no fármaco (WATERMANN, 2005).

- Modificação de qualquer fator de relevância funcional

Este aspecto contempla, especialmente, as características da forma farmacêutica. Se houver alguma alteração dependente do tempo, de qualquer atributo relevante para a perda da funcionalidade do produto, que prejudique a segurança,

eficácia, aceitabilidade pelo paciente ou facilidade do uso, esta, deve ser monitorada durante o processo de avaliação da estabilidade (CARSTENSEN e RHODES, 2000).

Para determinar as condições apropriadas de armazenagem para os produtos farmacêuticos é necessário o conhecimento das condições que induzem à degradação e os seus mecanismos. Grande parte destas informações pode ser obtida pelos estudos em condições de estresse combinados aos estudos de estabilidade acelerada. Entretanto, para a determinação precisa do prazo de validade, são necessários estudos de longa duração (BAERTSCHI, 2005).

Podem ainda fazer parte dos estudos de estabilidade a avaliação da cinética de degradação. Na maioria dos estudos de estabilidade presume-se que a velocidade da reação depende da velocidade de degradação do fármaco e é determinada em função do tempo. Sendo assim, a representação das três funções da concentração do fármaco em função do tempo, onde cada uma das correlações corresponde, respectivamente, a uma reação de ordem zero ($C \times t$), primeira ordem ($\text{Log } C \times t$) e segunda ou pseudo primeira ordem ($1/C \times t$). A ordem da reação será decidida pela função que apresentar a curva mais linear, levando-se em conta o índice de correlação linear (NUDELMANN, 1975; LACHMANN *et al.*, 2001).

Reações em que a velocidade da reação depende da concentração do reagente, é dita seguir cinética de primeira ordem. Neste tipo de reação, uma substância decompõe-se em um ou mais produtos ($A=\text{produtos}$) e a velocidade da reação é proporcional à concentração do reagente. A constante de velocidade de decomposição (k) é calculada pela Equação 1 (LACHMANN *et al.*, 2001):

$$k = 2,303/t (\text{Log } C_0/C) \quad (\text{Eq. 1})$$

onde:

t = tempo final (t_2)

C_0 = concentração no tempo inicial (t_1)

C = concentração no tempo final (t_2)

A equação permite calcular a constante de velocidade de decomposição de uma substância entre qualquer intervalo de tempo ($t_2 - t_1$), desde que a concentração do fármaco seja conhecida para estes dois tempos. A semivida de um fármaco ($t_{0,5}$) é o tempo necessário para que 50 % do fármaco degrade, podendo ser calculado pela Equação 2:

$$t_{0,5} = 2,303/k (\text{Log } C_0/C) = 2,303/k (\text{Log } 100/50) = 2,303/k (\text{Log } 2) = 0,693/k$$

$$t_{0,5} = 0,693/k \quad (\text{Eq. 2})$$

Em produtos farmacêuticos, o tempo necessário para que 10 % do fármaco degrade é um importante parâmetro, pois representa o limite aceitável para a degradação de substâncias ativas; $t_{10\%}$ do fármaco pode ser calculado pela Equação 3:

$$t_{10\%} = 2,303/k (\text{Log } 100/90) = 0,104/k$$

$$t_{10\%} = 0,104/k \text{ ou } t_{10\%} = 0,152 t_{0,5} \quad (\text{Eq. 3})$$

Quando a velocidade da reação depende da concentração de dois reagentes ($A + B = C$ ou $A^2 = C$) a cinética da reação será de segunda ordem ou de pseudo primeira ordem. Quando um dos reagentes encontra-se em grande quantidade, ou está em concentração constante, comparativamente com o outro reagente, a velocidade da reação é determinada por um dos reagentes, mesmo que estejam presentes dois reagentes, porque a concentração da segunda substância não implica numa mudança significativa da concentração do produto durante a reação de degradação (NUDELMANN, 1975, LACHMANN *et al.*, 2001). A constante de velocidade de decomposição (k) para uma reação de segunda ordem é calculada pela Equação 4 (NUDELMANN, 1975):

$$k = 1/t (1/C - 1/C_0) \quad (\text{Eq. 4})$$

A semivida de um fármaco ($t_{0,5}$) pode ser calculada pela Equação 5:

$$C - C_0 = -kt \quad \Rightarrow \quad C_0/2 - C_0 = -kt_{0,5}$$

$$t_{0,5} = C_0/2k \quad (\text{Eq. 5})$$

O tempo necessário para que 10 % do fármaco se degrade $t_{10\%}$ pode ser calculado pela Equação 6:

$$t_{10\%} = 0,9 C_0/k \quad (\text{Eq. 6})$$

Sendo assim, o conhecimento da constante de velocidade “k” permite estimar a quantidade de fármaco que degrada num período de tempo definido levando-se em conta a ordem de reação do mesmo (LACHMANN *et al.*, 2001).

3.5.1 Aspectos legais

A legislação brasileira, por meio da Resolução Específica nº 560, de 2 de abril de 2002, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2002) instituiu as diretrizes para realização de estudos de estabilidade, que define: “O teste de estabilidade tem como finalidade avaliar o comportamento dos fármacos ou medicamentos, que sofrem alterações com o decorrer do tempo, por influência de uma variedade de fatores ambientais, tais como: a temperatura, umidade e a luz”.

Nesta legislação estão contemplados dois tipos de estudos:

- Estudos de estabilidade acelerada

Visam a aumentar a velocidade de degradação química e modificação física das substâncias e/ou alterações de características de forma farmacêutica, usando condições de armazenamento mais drásticas do que as condições ambientais. As reações de degradação são monitoradas permitindo prever o prazo de validade nas condições normais de armazenamento. Devem ser realizados em $40 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ e $75 \pm 5 \%$

de umidade relativa (UR), durante seis meses, com análises em 0, 1, 2, 3 e 6 meses, ou a 50 ± 2 °C e 90 ± 5 % de UR durante três meses, com análises do teor das substâncias de interesse nos tempos 0, 1, 2 e 3 meses.

- Estudos de estabilidade de longa duração

São validações dos experimentos em relação às características físicas, químicas e biológicas do medicamento, durante e depois do prazo de validade esperado. Deve ser realizado em 30 ± 2 °C e $75 \pm 5\%$ de UR, durante o período em que se pretende comprovar a estabilidade do produto. Neste caso, no primeiro ano, as amostras devem ser analisadas nos tempos 0, 6, 9 e 12 meses e, depois deste período, uma vez ao ano.

A Resolução Específica nº 1, de 29 de julho de 2005 (BRASIL, 2005) altera os parâmetros para estudo de estabilidade. Esta preconiza como disposições gerais que o prazo de validade de um produto a ser comercializado no Brasil é determinado por estudo de estabilidade de longa duração, de acordo com os parâmetros definidos. Por ocasião do registro, poderá ser concedido prazo de validade provisório de 24 meses se aprovado o relatório de estudo de estabilidade de longa duração de 12 meses ou relatório de estabilidade acelerado de 6 meses, acompanhado dos resultados preliminares do estudo de longa duração conforme parâmetros definidos na Tabela 1.

Na referida resolução é estipulada, ainda, a freqüência dos testes, conforme o tipo de estudo:

Estudo acelerado (40 ± 2 °C e 75 ± 5 % UR): 0, 3 e 6 meses para doseamento, quantificação de produtos de degradação, dissolução (quando aplicável) e pH (quando aplicável). Para as demais provas, a RE nº 1 (BRASIL, 2005) preconiza a realização de estudo aos 6 meses, comparativo ao momento zero.

Estudo de longa duração (30 ± 2 °C e 75 ± 5 % UR): 0, 3, 6, 9, 12, 18 e 24 meses para doseamento, quantificação de produtos de degradação, dissolução (quando aplicável) e pH (quando aplicável). Para as demais provas, apresentar estudo aos 6 meses comparativo ao momento zero

Tabela 1 – Parâmetros para realização de estudos de estabilidade conforme RE nº 1, de 29 de julho de 2005 (BRASIL, 2005).

Forma Farmacêutica	Condição de armazenamento	Embalagem	Temperatura e umidade Acelerado	Temperatura e umidade Longa Duração
Sólido	15 °C- 30 °C	Semi-permeável	40 °C ± 2 °C / 75% UR ± 5% UR	30 °C ± 2 °C / 75% UR ± 5% UR
Sólido	15 °C- 30 °C	Impermeável	40 °C ± 2 °C	30 °C ± 2 °C
Semi-sólido	15 °C- 30 °C	Semi-permeável	40 °C ± 2 °C / 75% UR ± 5% UR	30 °C ± 2 °C / 75% UR ± 5% UR
Semi-sólido	15 °C- 30 °C	Impermeável	40 °C ± 2 °C	30 °C ± 2 °C
Líquidos	15 °C- 30 °C	Semi-permeável	40 °C ± 2 °C / 75% UR ± 5% UR	30 °C ± 2 °C / 75% UR ± 5% UR
Líquidos	15 °C- 30 °C	Impermeável	40 °C ± 2 °C	30 °C ± 2 °C
Gases	15 °C- 30 °C	Impermeável	40 °C ± 2 °C	30 °C ± 2 °C
Todas as formas farmacêuticas	2° C – 8° C	Impermeável	25 °C ± 2 °C	5 °C ± 3 °C
Todas as formas farmacêuticas	2 °C – 8 °C	Semi-permeável	25 °C ± 2 °C / 60 % UR ± 5% UR	5 °C ± 3 °C
Todas as formas farmacêuticas	-20 °C	Todas	- 20 °C ± 5 °C	- 20 °C ± 5 °C

Para a ICH, Q1A(R2) *Stability Testing of New Drug Substances and Products 2nd revision* (2003) e Q1F *Stability Data Package for Registration Applications in Climatic Zones III and IV* (2006), a avaliação da estabilidade para produtos de zonas climáticas III e IV, onde o Brasil se insere como zona climática IV (quente e úmido), recomendam-se estudos acelerado e de longa duração nas seguintes condições:

Estudo acelerado: 40 ± 2 °C e 75 ± 5 % UR, durante 6 meses.

Estudo de longa duração: 30 ± 2 °C e 75 ± 5 % UR UR, durante 12 meses.

Em relação aos estudos de fotoestabilidade, a ICH (1996) descreve duas opções de fonte luminosa para estudos confirmatórios:

Opção 1: D65 e ID65, em que D65 é internacionalmente reconhecida como padrão para luz externa natural (*daylight*) e ID65 é o equivalente a luz natural indireta (*indoor*).

Opção 2: lâmpada fria fluorescente e UV próximo

Para a indústria farmacêutica, no desenvolvimento de novos medicamentos, radiações com comprimentos de onda presentes na luz natural ou artificial são relevantes para os estudos de fotoestabilidade (BAERTSCHI, 2005).

Os trabalhos que relatam o comportamento fotoquímico dos fármacos utilizam fontes luminosas variadas, seja quanto ao comprimento de onda como quanto à intensidade. São empregadas desde lâmpadas germicidas (254 nm) até lâmpadas que simulam a luz solar (com emissão de UV próximo até IV). Do ponto de vista científico, para conhecimento do comportamento de uma substância, a escolha de qualquer fonte luminosa é válida, desde que a luz emitida seja absorvida (BAERTSCHI, 2005).

A fotodegradação dos produtos farmacêuticos depende, em grande parte, do espectro de distribuição da fonte luminosa. Desta forma, diferentes fontes luminosas acarretam diferenças na avaliação da fotoestabilidade. Portanto, a especificação exata da fonte luminosa revela-se extremamente relevante para determinar em que condições os produtos farmacêuticos deverão ter a sua fotoestabilidade avaliada (YOSHIOKA e STELLA, 2000).

3.5.2 Estabilidade de fitoterápicos

Na legislação brasileira, a RDC nº48 de 16 de março de 2004 (BRASIL, 2004) dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Esta resolução traz parâmetros que deverão ser cumpridos pelo produto, embora, com relação à metodologia a ser adotada reporta procedimentos já estabelecidos para medicamentos em geral: deverão ser apresentados testes de estabilidade do produto, em seu material de acondicionamento original, em três lotes consecutivos, em forma de tabela, informando as condições de temperatura e umidade empregadas, as características físico-químicas e microbiológicas de acordo com a forma farmacêutica apresentada.

Segundo Hefendehl (1987), para a droga bruta, assume-se que o determinante da atividade consiste numa mistura de componentes. Estes componentes podem pertencer a um único grupo de substâncias, por exemplo, óleos voláteis, ou a dois ou mais grupos como óleos voláteis e flavonóides. Segundo o autor, a investigação da estabilidade deve considerar que a quantidade total de componentes de pelo menos um grupo varie de acordo com as especificações, isto é, não fique abaixo de 90 % do valor declarado ou a quantidade mínima estabelecida em farmacopéia. Ao mesmo tempo, deverá ser demonstrado, por meio de técnicas cromatográficas, que a mistura de componentes que contém o grupo de substâncias ativas analisado não sofre grandes alterações. Intencionalmente, o autor não estabelece limite fixo, porque considera que a decisão deverá ser individual para cada caso, baseada nas razões dadas pela aplicação. Testes de estabilidade de fitoterápicos devem demonstrar que as especificações do produto final deverão ser mantidas durante o prazo de validade. A este respeito, fitoterápicos não são diferentes de produtos com constituintes ativos sintéticos (HEFENDEHL, 1987).

Segundo a *European Agency for the Evaluation of Medicinal Products* (EMA, 2001) para um produto fitoterápico contendo uma droga vegetal ou resultante de sua extração, em que os constituintes com atividade terapêutica são conhecidos, a variação do conteúdo durante o prazo de validade proposto não deve exceder $\pm 5\%$ do teor inicial, a menos que justificado. Para produto fitoterápico em que os constituintes com atividade terapêutica não são conhecidos, uma variação de $\pm 10\%$ do teor inicial do conteúdo do grupo marcador durante o prazo de validade proposto, pode ser aceita, se justificada pela aplicação. Este critério é aplicado para teste de estabilidade de substâncias ativas em geral, permanecendo ainda não elucidada a razão de exigência para fitoterápicos contendo substâncias ativas conhecidas, limitado a 5 %.

O número de relatos referentes a estudos de estabilidade de produtos vegetais encontrados na literatura é limitado, sendo, a seguir, sumarizados os considerados de maior relevância para subsidiar o presente trabalho.

Bilia e colaboradores, em 2001, realizaram um estudo utilizando amostras de extrato seco, disponível no mercado de *Hypericum perforatum* (erva-de-são-joão ou hipérico), de amostras de uma mistura deste extrato seco com lactose e estearato de magnésio (53:46:1), constituindo o produto vegetal e desta mistura adicionada de ácido cítrico e ácido ascórbico (200:1), sendo denominado produto vegetal modificado. Com estes produtos foram preparadas cápsulas de gelatina transparente e de diversas cores (branca, laranja, amarela, vermelha, azul e azul clara). Para o estudo da estabilidade térmica, as cápsulas de gelatina transparente foram acondicionadas em frasco de vidro transparente, cobertos com papel alumínio, e submetidos à temperatura de 25 °C/ 60 % UR por três meses e 45 °C/ 75 % UR, por 45 dias. Para o teste da fotoestabilidade, foram utilizadas cápsulas transparentes e coloridas opacas, que foram acondicionadas em frascos de vidro transparente e âmbar, cada um contendo cápsulas transparentes e cápsulas de cada cor, separadamente e submetidas à exposição à luz UV 310-700 nm, durante 7 horas. Para as amostras submetidas à temperatura de 25 °C, foi observada relativa estabilidade para os flavonóides e hiperforinas, ambos chegaram ao final do experimento (3 meses), com teores superiores a 90 % da concentração inicial. Por outro lado, as hipericinas apresentaram comportamento bastante instável, mantendo-se dentro do limite de ± 10 % por apenas 15 dias. No teste de fotoestabilidade foram observadas diferenças entre a cor das cápsulas e a proteção seletiva das substâncias analisadas. Cápsulas brancas e azuis claras, contendo 2 % de dióxido de titânio, foram mais efetivas na proteção das hiperforinas. Cápsulas azuis escuras, contendo alta concentração do pigmento indigotina, mostraram-se mais efetivas na proteção das hipericinas e finalmente as cápsulas de cor laranja, contendo altas concentrações de óxidos de ferro amarelo e vermelho, foram mais eficientes em proteger os flavonóides.

Bilia e colaboradores (2002) analisaram soluções extrativas de *Calendula officinalis*, *Passiflora incarnata* e *Silybum marianum* preparadas com soluções hidroetanólicas 40 e 60 % (v/v). Amostras destas soluções extrativas foram submetidas à temperatura de 25 ± 2 °C / 60 ± 5 % UR, durante 6 meses e em temperaturas de 40 °C, 50 °C e 60 °C, durante 3 meses e avaliando-se os flavonóides presentes. Os extratos mostraram-se estáveis nas condições avaliadas. O extrato mais estável foi o

de passiflora 60 % (v/v), com prazo de validade estimado de 6 meses na temperatura de 25 °C.

Heigl e Franz, em 2003, estudaram o comportamento de alguns flavonóides presentes em matéria-prima vegetal: *Betula pubescens*, *Sambucus nigra*, *Calendula officinalis* e *Passiflora sp.* O material vegetal inteiro, cortado ou pulverizado foi acondicionado em papel ou envelopes impermeáveis e submetido ao teste de longa duração, 30 °C e 60% UR, por mais de 24 meses e ao teste acelerado, 40 °C e 75% UR, por 6 meses. Também, foram realizados testes de estresse em temperaturas de 80 °C e 100 °C. Os resultados demonstraram estabilidade dos flavonóides, presentes nestas matérias-primas, durante o teste de longa duração, permanecendo dentro dos limites de ± 10 % por 27 meses. Entretanto nos testes de estresse observou-se um decréscimo da presença dos flavonóides com aumento de suas respectivas agliconas. Resultados similares foram observados no teste acelerado 40 °C e 75 % UR.

Goppel e Franz, 2004, investigaram a estabilidade de extrato etanólico disponível no mercado e raiz pulverizada de *Valeriana officinalis*. Foram avaliados diferentes materiais de acondicionamento em três diferentes condições de armazenagem: 25 °C/65 % UR, 30 °C/60 % UR ou 40 °C/75 % UR. Alterações na composição dos ácidos valerênicos e das lignanas foram observadas nas diferentes condições de armazenagem e acondicionamento. O ácido hidróxi-valerênico, o pinorresinol e o hidróxi pinorresinol foram identificados como produtos de degradação do material pulverizado da raiz de valeriana, especialmente durante o teste acelerado (40 °C/75 % UR). O extrato etanólico não foi tão sensível à degradação química pelas condições de armazenagem, comparado com a matéria-prima vegetal, não apresentando aumento de agliconas de lignanas. O produto pulverizado apresentou alta sensibilidade às condições de armazenagem, altos teores de umidade nos produtos armazenados em embalagens de polietileno e sem proteção podem estar relacionados a instabilidade destes produtos.

Bilia e colaboradores (2007) analisaram a estabilidade de tinturas-mãe, disponíveis no mercado, de *Crataegus oxyacantha* e de *Hieracium pilosella*, assim como tinturas contendo, respectivamente, 55 % (v/v) ou 60 % (v/v) de etanol. As

amostras foram acondicionadas em frascos de vidro âmbar e submetidas à temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, em estufa, com análises nos tempos 0, 3, 5, 7 e 9 meses. Os flavonóides demonstraram estabilidade, resultando um prazo de validade em torno de 7 meses para ambas as preparações de *Crataegus oxyacantha*. No entanto, as procianidinas apresentaram baixa estabilidade nestas condições, permanecendo dentro dos limites aceitáveis por um período extremamente limitado, inferior a 3 meses. Para *Hieracium pilosella*, a maior estabilidade para os derivados cafeoilquínicos e flavonóides, cerca de 9 meses, foi observada para a tintura preparada com etanol 60 % (v/v), nas condições estudadas.

Sonaglio, em 1987, avaliou a estabilidade de um extrato hidroetanólico resultante da maceração de 7,5 % (m/v) de sumidades floridas de *Achyrocline satureioides* em etanol 80 % (v/v), durante 8 dias. O extrato, acondicionado em frascos de vidro âmbar, foi submetido às temperaturas de $40\text{ }^{\circ}\text{C}$, $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, a estabilidade foi avaliada no período de 2, 4, 8, 16 e 32 dias. Para a avaliação da estabilidade foi utilizado, como parâmetro, o teor de quercetina presente no extrato, avaliado pelo método da cromatografia em papel associada à quantificação por espectroscopia no ultravioleta. Neste estudo foi observado aumento dos teores de quercetina que passou de 12,82 mg % (m/v), no tempo zero, para máximos de 19,25 mg % (m/v) e 18,30 mg % (m/v), nas temperaturas de $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, respectivamente, após 8 dias, e 18,93 mg % (m/v) na temperatura de $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, após 16 dias de armazenamento. Sendo que, não foi possível identificar a causa do aumento no teor da quercetina quando o extrato foi submetido a estes ensaios.

No que refere-se à extratos secos de *Achyrocline satureioides*, não foram encontrados relatos na literatura referente a sua estabilidade.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais e Equipamentos

4.1.1 Equipamentos e Acessórios

- Tanque com agitador de hélice de aço inoxidável, capacidade nominal 75L (Metalúrgica Sulinox Ltda.);
- agitador magnético Fisatom 725 A;
- balança analítica Mettler PM 200;
- balança analítica Sartorius 2402;
- câmara climática Nova Ética mod. 420 CLD;
- câmara espelhada com lâmpada UV-C (Light express LE UV, 254 nm, 30 W);
- coluna cromatográfica de aço inoxidável Shim-pack CLC-ODS (M) RP-18, 5 µm, 250 x 4 mm i.d.;
- concentrador modelo Einsfeld, capacidade nominal 100 L/h (Metalúrgica Sulinox Ltda.);
- cromatofolhas de alumínio 20x20 cm F 254 (Aldrich);
- equipamento de cromatografia a líquido de alta eficiência marca Shimadzu, equipado com bomba LC-10AD, injetor automático SIL-10 A e detector UV/vis SPD-10 A, controlado pelo programa CLASS LC-10;
- equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência marca Waters 2690 detector arranjo de fotodiodos Waters 996 Millenium;
- espectrômetro de massas ionizador por aspensão de elétrons com captura de íons Finnigan LCQ^{DUO};
- espectrômetro de massas ionizador por aspensão de elétrons Micromass Q-ToF (Waters);

- espectrômetro de ressonância nuclear magnética Varian INOVA (300 MHz);
- estufa Biomatic mod. 1305;
- estufa de ar circulante Memmert mod. TV 60 uL;
- estufa Universal WTB Binder mod. 28;
- evaporador rotatório Büchi mod. R 114;
- filtro de velas contendo mangas de feltro (Metalúrgica Sulinox Ltda.);
- membrana para filtração Millipore HVHP 0,45 µm, com 13 mm e 25 mm de diâmetro;
- microscópio eletrônico de varredura (JSM 5800 SEM);
- moinho de martelos Retsch SKI
- percolador de aço inoxidável, capacidade nominal 1000L (Metalúrgica Globo Inox);
- pletismômetro Ugo Basile mod. 7159;
- potenciômetro pH-metro B374 Micronal;
- prensa hidráulica Ralf Winter, capacidade 20L;
- sistema de tratamento de água Milli-Q Plus.
- torre de secagem por aspersão em escala semi-industrial (*Production minor Spray Dryer Plant, NIRO A/S*);

4.1.2 Solventes, reagentes e soluções

- água ultrapura;
- acetato de etila (Merck, p.a.);

- clorofórmio (Nuclear, p.a.);
- metanol (Nuclear, p.a.);
- metanol (Merck, grau CLAE);
- gel de sílica 60 para coluna 63-200 µm (Merck);
- gel de sílica para cromatografia em camada delgada preparativa 60 GF₂₅₄ S22 (Merck);
- solução de ácido fosfórico 0,16 M.

4.1.3 Adjuvantes farmacêuticos

- celulose microcristalina (Avicel PH 101[®], Blanver/SP);
- dióxido de silício coloidal (Aerosil 200[®], Degussa/SP);
- etanol comercial 96° GL;
- polissorbato 80 (Delaware).

4.1.4 Substâncias de referência

- ácido caféico (Sigma C0625 lote 26H2635);
- luteolina (Sigma L9283 lote 125K4041);
- quercetina (Merck 7546)
- quercetina (Sigma Q0125 lote 015K1225).

4.1.5 Materia-prima vegetal

Achyrocline satureioides (Lam.) DC. (material seco) foi adquirido de fornecedor de plantas medicinais de Santo Antônio da Patrulha/RS. As sumidades floridas foram separadas manualmente e submetidas à cominuição, em moinho de martelos, constituindo-se assim a matéria-prima vegetal.

4.2 Métodos

4.2.1 Preparação do extrato concentrado de *Achyrocline satureioides*

A preparação dos extratos concentrados foi realizada segundo a patente de processo (BASSANI *et al.*, 2001), partindo de soluções extrativas, com relação planta:solvente 5,5 % (m/v), utilizando mistura hidroetanólica contendo 40 % (v/v) de etanol para obtenção de solução extrativa SE40 e mistura hidroetanólica contendo 80 % (v/v) de etanol para obtenção de solução extrativa SE80. As soluções extrativas foram concentradas com prévia adição dos adjuvantes de secagem, dióxido de silício coloidal, celulose microcristalina e polissorbato 80 para a obtenção do extrato concentrado 40 (EC40) e dióxido de silício coloidal e polissorbato 80 para obtenção do extrato concentrado 80 (EC80).

4.2.2 Preparação do produto seco de *Achyrocline satureioides*

Os extratos concentrados, EC40 e EC80, foram submetidos à secagem em equipamento *Production Minor Spray Dryer Plant*. Este equipamento de secagem é constituído de um sistema de alimentação, aspensor rotatório, sistema de aquecimento, câmara de secagem, duto condutor, ciclone, recipiente de coleta e duto de exaustão. A alimentação, co-corrente, foi realizada por meio de bomba peristáltica e o líquido disperso pelo rotor aspensor.

As condições operacionais empregadas para a secagem foram as que seguem:

- ✓ temperatura de entrada: 180 ± 10 °C
- ✓ temperatura de saída: 110 ± 10 °C
- ✓ velocidade do rotor: 10400 r.p.m.
- ✓ fluxo de alimentação: 130 ml/min

Os produtos resultantes foram denominados produto seco 40 (PS40) e produto seco 80 (PS80) obtidos, respectivamente, a partir dos extratos concentrados EC40 e EC80.

4.2.3 Estabilidade frente ao calor

Para a avaliação da estabilidade foram selecionados três diferentes tipos de acondicionamento:

- ✓ frascos de vidro âmbar com capacidade nominal de 12 ml, fechados por tampa rosqueada e batoque de polipropileno;
- ✓ frascos de vidro transparente com capacidade nominal de 12 ml, fechados por tampa de borracha lacrada por cinta de alumínio;
- ✓ vidros de relógio.

4.2.3.1 Estabilidade do PS40 frente ao calor

Para o estudo da influência da temperatura e tipo de acondicionamento sobre a estabilidade do PS40, em condições de estresse, o mesmo foi submetido à temperatura de 80 °C, em estufa, por um período de 28 dias. Foram armazenados três frascos para cada dia de avaliação. Amostra de cerca de 1 g de PS40 foram acondicionados em cada um dos 12 frascos de vidro âmbar fechados, e em cada um dos 12 frascos de vidro transparente fechados, e 12 g em vidro de relógio aberto, sendo todos mantidos em estufa, em 80 °C. Foram analisadas amostras nos seguintes intervalos de tempo: 0, 7, 14, 21, e 28 dias.

O mesmo procedimento de armazenagem, exceto para as amostras acondicionadas em vidro de relógio, foi aplicado para avaliação da estabilidade das amostras expostas a condições ambientais, temperatura de 25 ± 2 °C e umidade relativa de 60 ± 5 %, sendo que os intervalos de tempo para avaliação foi de 0, 3, 6, 9 e 12 meses.

Em câmara de climatização foram realizados estudos de estabilidade acelerada, conforme RE nº 560 (BRASIL, 2002), nas seguintes condições: temperatura de 50 ± 2 °C/ 90 ± 5 % UR, com procedimento de armazenagem idêntico ao anterior e avaliações nos seguintes intervalos de tempo 0, 1, 2 e 3 meses.

4.2.3.2 Estabilidade do PS80 frente ao calor

Para o estudo em condições de estresse, o PS80 foi submetido à temperatura de 80 °C, em estufa, por um período de 14 dias. Foram armazenados três frascos para cada dia de avaliação. Amostras de cerca de 1 g de PS80 foram acondicionadas em cada um dos 12 frascos de vidro transparente fechados e 12 g em vidro de relógio aberto, sendo todos mantidos em estufa a 80 °C. Foram analisadas amostras nos seguintes intervalos de tempo: 0, 2, 5, 7, e 14 dias.

Em câmara de climatização foram realizados estudos de estabilidade acelerada, conforme a RE nº 1, de 29 de julho de 2005 (ANVISA), nas seguintes condições: temperatura de 40 ± 2 °C/ 75 ± 5 % UR. Foram armazenados três frascos para cada dia de avaliação. Amostras de cerca de 1 g de PS80 foram acondicionadas em cada um dos 12 frascos de vidro transparente fechados. Foram analisadas amostras nos seguintes intervalos de tempo 0, 3 e 6 meses.

De acordo com a mesma resolução foi realizado estudo da estabilidade de longa duração, 30 ± 2 °C/ 75 ± 5 % UR, com mesmo procedimento de armazenagem descrito anteriormente e com análise das amostras nos seguintes intervalos de tempo 0, 3, 6, 9 e 12 meses.

4.2.4 Estabilidade frente à luz

4.2.4.1 Estabilidade do PS40 frente à luz

Para o estudo da influência da luz sobre a estabilidade do PS40 foram armazenados três frascos para cada intervalo de avaliação. Amostras de cerca de 1 g (por frasco) e 3 g (por vidro de relógio) de PS40 foram acondicionadas em frascos de vidro âmbar fechados, frascos de vidro transparente fechados e em vidro de relógio

aberto. Estas amostras foram colocadas em câmara com 100 x 16 x 16 cm, espelhada internamente e provida de luz (Light express LE UV, 254 nm, 30 W). Foram coletadas amostras para análise nos seguintes intervalos de tempo: 0, 12, 24 e 48 horas.

4.2.4.2 Estabilidade do PS80 frente à luz

Amostras de cerca de 1 g (por frasco) e 3 g (por vidro de relógio) de PS80 foram acondicionados em frascos de vidro âmbar fechados, frascos de vidro transparente fechados e em vidro de relógio aberto. Estas amostras foram colocadas em câmara provida de luz UV-C 254nm, como descrito no item 4.2.4.1. Foram coletadas amostras para análise nos seguintes intervalos de tempo: 0, 12, 24 e 48 horas.

4.2.5 Análise das amostras

As amostras, PS40 e PS80, submetidas aos ensaios de estabilidade frente ao calor e à luz foram analisadas quanto às características sensoriais, perda por dessecação e quanto ao teor de seus compostos fenólicos, principalmente, quercetina, luteolina, 3-O-metilquercetina e ácido caféico,

4.2.5.1 Características sensoriais

As amostras foram avaliadas quanto às características de cor, odor e aparência do pó.

4.2.5.2 Avaliação da perda por dessecação (F. BRAS. IV, 1988).

Foram exatamente pesados cerca de 300 mg de produto seco em pesa filtro previamente tarado e colocados em estufa por 2 horas, em 105 °C. Após resfriamento em dessecador, o pesa filtro foi colocado na estufa por mais 30 minutos. Este procedimento foi repetido até peso constante. Os resultados da perda por dessecação das amostras foram expressos pela média ponderal de três determinações. A perda por dessecação das amostras foi determinada, previamente a todas as análises de quantificação dos marcadores fenólicos durante os estudos de estabilidade.

4.2.5.3 Quantificação dos constituintes fenólicos

As análises foram realizadas em aparelho de cromatografia líquida de alta eficiência, marca Shimadzu, equipado com bomba LC-10AD, injetor automático SIL-10 A e detector UV/vis SPD-10 A controlado pelo programa CLASS LC-10. Também foi empregado aparelho de cromatografia líquida de alta eficiência, marca Waters, equipado com sistema controlador de gradiente 2690 e detector por arranjo de fotodiodos 996 Millennium, para a avaliação dos espectros no ultravioleta. Foi utilizada coluna Shim-pack CLC-ODS (M) RP-18, 5 μm , 250 x 4 mm i.d. e, como fase móvel, uma mistura de metanol:ácido fosfórico 0,16 M (53:47 v/v), previamente filtrada por membrana de 0,45 μm (Millipore HVHP) e degaseificada. O fluxo da fase móvel empregado foi de 0,6 mL/min e detecção em 362 nm. (De SOUZA *et al.*, 2002).

A análise dos constituintes fenólicos foi realizada utilizando o método desenvolvido e validado por De Souza, 2002, mantida a mesma faixa de concentração de 1 a 10 $\mu\text{g/mL}$. Foram realizadas três curvas analíticas em três diferentes dias. As médias das áreas dos picos correspondentes à quercetina, luteolina e ácido caféico e 3-O-metilquercetina foram plotadas em gráfico em função das concentrações. As equações de reta foram calculadas por meio de regressão linear (ICH,1996; SWARTZ, 1998, USP 31, 2008).

Curva analítica

As substâncias de referência quercetina, luteolina e ácido caféico foram dissolvidas numa mistura metanol: água (53:47 v/v) obtendo-se uma solução-mãe 25 $\mu\text{g/mL}$ de cada uma destas, a qual foi diluída para concentrações de 1, 2, 3, 4, 5 e 10 $\mu\text{g/mL}$. As soluções foram filtradas por membrana de 0,45 μm (Millipore HVHP). Foram injetados 20 μL de cada concentração, em triplicata, e a curva analítica foi obtida por regressão linear (De SOUZA *et al.*, 2002).

Teste de exatidão – ácido caféico

Para o ácido caféico foi realizado teste de exatidão, por meio do teste de recuperação, adicionando-se concentrações crescentes de ácido caféico à solução amostra (PS40), os resultados de recuperação obtidos foram expressos em percentagem, calculados conforme a seguinte equação:

$$R\% = [(Cf - Ca)/Cp] \times 100$$

onde:

R% = percentual de recuperação do ácido caféico adicionado à solução de referência;

Cf = concentração do extrato adicionado de substância referência ($\mu\text{g/mL}$);

Ca = concentração do extrato determinado pelo método ($\mu\text{g/mL}$);

Cp = concentração da solução padrão adicionada ($\mu\text{g/mL}$);

Cada diluição foi preparada em triplica e injetada no cromatógrafo, também em triplicata.

Preparação das amostras PS40 e PS80

Para a análise cromatográfica, 500 mg de cada amostra (triplicata), exatamente pesados, descontando-se a perda por dessecação, foram transferidos para erlenmeyer com tampa esmerilhada e extraídos com 50 mL de acetato de etila, durante 2 horas, em agitador magnético. A dispersão resultante foi filtrada e o filtrado recolhido em balão volumétrico de 50 mL, completando-se o volume com o mesmo solvente. Uma alíquota de 25,0 mL desta solução foi evaporada até a secura, o resíduo retomado em metanol e a solução correspondente transferida para balão volumétrico de 25 mL, completando-se o volume com o mesmo solvente. Alíquotas desta solução (2,0 mL PS40 ou 1,0 mL PS80) foram transferidas para balão de 20,0 mL, completando-se o volume com mistura metanol:água (53:47 v/v) respectivamente; cada amostra foi analisada em triplicata. As

soluções foram filtradas por membrana de 0,45 µm (Millipore HVHP) e 20 µL de cada amostra foram injetados no cromatógrafo, em triplicata.

As áreas dos picos correspondentes às substâncias analisadas foram medidas, sendo a concentração das mesmas, calculadas por meio das curvas analíticas respectivas ou em relação à curva analítica da luteolina, no caso das substâncias não identificadas, P1 e P2. Na avaliação do PS40, a substância P3 foi calculada em relação à curva analítica da quercetina. Para o PS80 procedeu-se da mesma forma para as substâncias conhecidas, e as substâncias não identificadas P4, P5ab, P6, P7 e P8 foram calculadas em relação a curva analítica da luteolina.

4.2.6 Microscopia eletrônica de varredura

As fotomicrografias foram realizadas no centro de microscopia eletrônica desta universidade. As amostras de PS40 e PS80 foram previamente tratadas (metalização com ouro) para visualização em microscópio eletrônico de varredura.

4.2.7 Isolamento e identificação de substância presente no PS40

A substância com tempo de retenção em torno de 60 minutos, denominada P3, observado nos estudos prévios de estabilidade (estufa 80 °C), foi isolada com vistas a sua identificação. O isolamento foi realizado, num primeiro momento por cromatografia em coluna de fase normal, utilizando como fase estacionária gel de sílica e como fase móvel, um sistema gradiente entre 100 % clorofórmio e 20 % metanol (HOSTETMANN, 1982; STILL, 1978). A amostra (0,5 g) de PS40 foi extraída com 50 mL de acetato de etila durante 2 h sob agitação. A dispersão foi filtrada e o filtrado levado a resíduo por eliminação do solvente em evaporador rotatório. O resíduo, retomado em 2 mL de clorofórmio, foi aplicado na coluna cromatográfica e após eluição as frações foram monitoradas por cromatografia em camada delgada analítica, utilizando como sistema eluente uma mistura clorofórmio:metanol (90:10). Foram realizadas análises das frações obtidas por cromatografia líquida de alta eficiência, conforme sistema já descrito (4.2.5.3).

4.2.8 Isolamento e identificação de substância presente no PS80

Para a análise de substâncias presentes no PS80 as mesmas foram isoladas utilizando CLAE, conforme descrito em 4.2.5.3, sendo que foi utilizado ácido trifluoracético 0,1 % (TFA) em substituição ao ácido fosfórico 0,16 M na fase móvel. Foram injetadas alíquotas de 100 μ L e o eluato foi monitorado e coletado manualmente junto à saída do detector ultravioleta ($\lambda=362$ nm). As alíquotas coletadas foram evaporadas em centrífuga do tipo *speed-vac* e posteriormente reconstituídas em acetonitrila 50 % e ácido acético 1 %. As amostras foram diretamente aplicadas no espectrômetro de massas com captura de íons. O eluente com fluxo de 10 μ L/min. foi direcionado para a câmara de ionização, na forma de *spray*, permitindo que somente 5 % da amostra penetrem na câmara de ionização (0,5 μ L/min). Trabalhou-se com voltagem entre 1.0 e 2.0 kV e temperatura do capilar 130 °C. Para os experimentos MSⁿ, a fonte de fragmentação operou com energia de colisão de 25-35 V, 35-45 % (unidade arbitrária) de energia de colisão normalizada com banda de varredura ativada. Todos os espectros foram obtidos em modo positivo. Os dados foram processados pelo programa Xcalibur Windows NT PC e os espectros MS/MS foram analisados manualmente.

Visando à obtenção de maior quantidade da substância eluída no tempo de retenção em torno de 60 minutos, P8, para as análises por ressonância nuclear magnética, esta foi isolada por cromatografia em camada delgada preparativa. Foi utilizado como suporte gel de sílica e como eluente mistura de clorofórmio e metanol (90:10). A amostra (1,0 g) de PS80 foi extraída com 50 mL de clorofórmio durante 2 h sob agitação. A dispersão foi filtrada e o filtrado levado a resíduo por eliminação do solvente em evaporador rotatório. O resíduo, retomado em 10 mL de clorofórmio, foi aplicado sobre placa cromatográfica e, após eluição, a região da placa correspondente à substância de interesse foi removida e exaustivamente extraída com mistura clorofórmio:metanol (90:10). Esta solução contendo a substância de interesse foi concentrada e novamente aplicada em mesmo sistema cromatográfico idêntico ao anterior e repetido o processo de extração, obtendo-se desta forma o produto de interesse purificado.

Para identificação do P8 (PS80), foram realizadas análises por espectrofotometria no ultravioleta, espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear de carbono e hidrogênio. Os espectros de RMN ^1H , RMN ^{13}C RMN COSY e RMN HMQC foram obtidos em espectrômetros Varian INOVA (300 MHz), do Instituto de Química da UFRGS. Os deslocamentos químicos (δ) estão relacionados em parte por milhão (ppm) em relação ao tetrametilsilano (TMS, utilizado como padrão interno para os espectros de hidrogênio), CDCl_3 , DMSO d_6 e CD_3OD (para espectros de RMN ^{13}C).

Para a análise por espectrometria de massas do P8 (PS80), foi utilizado equipamento Micromass Q-ToF (Waters), Instituto de Química da UFRGS. Trabalhou-se com voltagem de 2890 V e temperatura de 100 °C, com taxa de injeção de 40 $\mu\text{L}/\text{min}$. Para os experimentos MS/MS, a fonte de fragmentação operou com energia de colisão de 5 % (unidade arbitrária) e os espectros foram obtidos em modo positivo

Todos os resíduos de solventes gerados no decorrer deste trabalho foram tratados de acordo com as normas da Cosat/Far.

4.2.9 Atividade antiinflamatória do PS40 (p.o.)

No presente estudo, foi avaliada a atividade antiinflamatória do PS40, antes e após o mesmo ter sido submetido à degradação pelo calor (estufa 80° C), por um período de sete dias.

A atividade antiedematogênica, foi avaliada em pata de rato, pela metodologia descrita por Winter e colaboradores (1962), que emprega a carragenina como agente flogístico. Foram utilizados ratos *Wistar* machos, pesando de 180-200 g, provenientes do Biotério da Fundação de Produção e Pesquisa em Saúde do Rio Grande do Sul (FEPPS). Os animais foram mantidos com livre acesso à ração e água, no biotério da Faculdade de Farmácia.

Foi administrado, por via oral (v.o.), cerca de 1,0 mL de uma suspensão contendo concentração de 500 mg de produto seco/kg de animal utilizando como veículo salina contendo 1 % (m/v) de polissorbato 80. Este constitui o grupo tratado

(n=8). O mesmo procedimento foi adotado para administração do produto seco, após ter sido submetido à degradação pelo calor (n=8). Para o grupo de animais controle negativo, foi administrado, individualmente 1,0 mL de uma suspensão contendo concentração de 250 mg dos adjuvantes de secagem/kg de animal utilizando como veículo salina contendo 1 % (m/v) de polissorbato 80 (n=8). Como padrão positivo foi utilizada a indometacina, na dose de 10 mg/kg (n=8), disperso em salina.

Os animais foram tratados, por via oral, com auxílio de uma sonda de silicone, uma hora antes da indução do edema. Posteriormente ao tratamento, os animais foram anestesiados, pela administração intraperitoneal de pentobarbital sódico, na dose de 40 mg/kg de peso corporal e foram mantidos sedados durante as medidas. O edema foi induzido na aponevrose subplantar da pata traseira direita dos ratos, pela injeção de 0,1 mL de solução de carragenina em salina (0,5 mg/mL). A pata traseira esquerda dos animais serviu como controle, na qual foi injetado 0,1 mL de solução salina. O volume das patas foi medido após injeção do agente flogístico, nos tempos 1, 2, 3 e 4 horas, em pletismômetro (WINDER *et al.*, 1957). As medidas foram realizadas em triplicata. A atividade antiedematogênica foi expressa em percentual de redução de edema, em relação aos grupos controle.

Após o experimento, os animais foram sacrificados em câmara de CO₂ e foram congelados para posterior recolhimento pelo serviço de coleta de material biológico contaminado realizado pelo Departamento Municipal de Limpeza Urbana (DMLU) da Prefeitura Municipal de Porto Alegre.

A resolução N^o 2003249 emitida pelo comitê de ética em pesquisa, desta universidade, aprovando a execução do experimento encontra-se em anexo (Anexo V).

O PS40 e o PS80 foram obtidos na forma de pó fino de coloração amarelo claro e com o odor característico da matéria-prima vegetal *Achyrocline satureioides* (Figura 2). A observação microscópica (MEV) revela partículas com forma esferoidal, com tamanho médio em torno de 10 μm (Figura 3). O rendimento do processo de secagem para PS40 e PS80 foram, respectivamente, de 70 % e 73 %, denotando que a influência dos diferentes adjuvantes empregados é semelhante, sobre este parâmetro.

No que se refere a perda por dessecação o PS40, que contém celulose microcristalina como adjuvante de secagem além do dióxido de silício coloidal e polissorbato 80 presentes no PS80, apresentou maior perda por dessecação. O PS40 apresentou 4,82 % (m/m) de perda por dessecação e o PS80 2,12 % (m/m).



Figura 2 – Características macroscópicas dos produtos secos de sumidades floridas de *Achyrocline satureioides* obtidos (A) a partir de solução extrativa hidroetanólica contendo 40 % (v/v) de etanol, PS40 e (B) a partir de solução extrativa hidroetanólica contendo 80 % (v/v) de etanol, PS80.

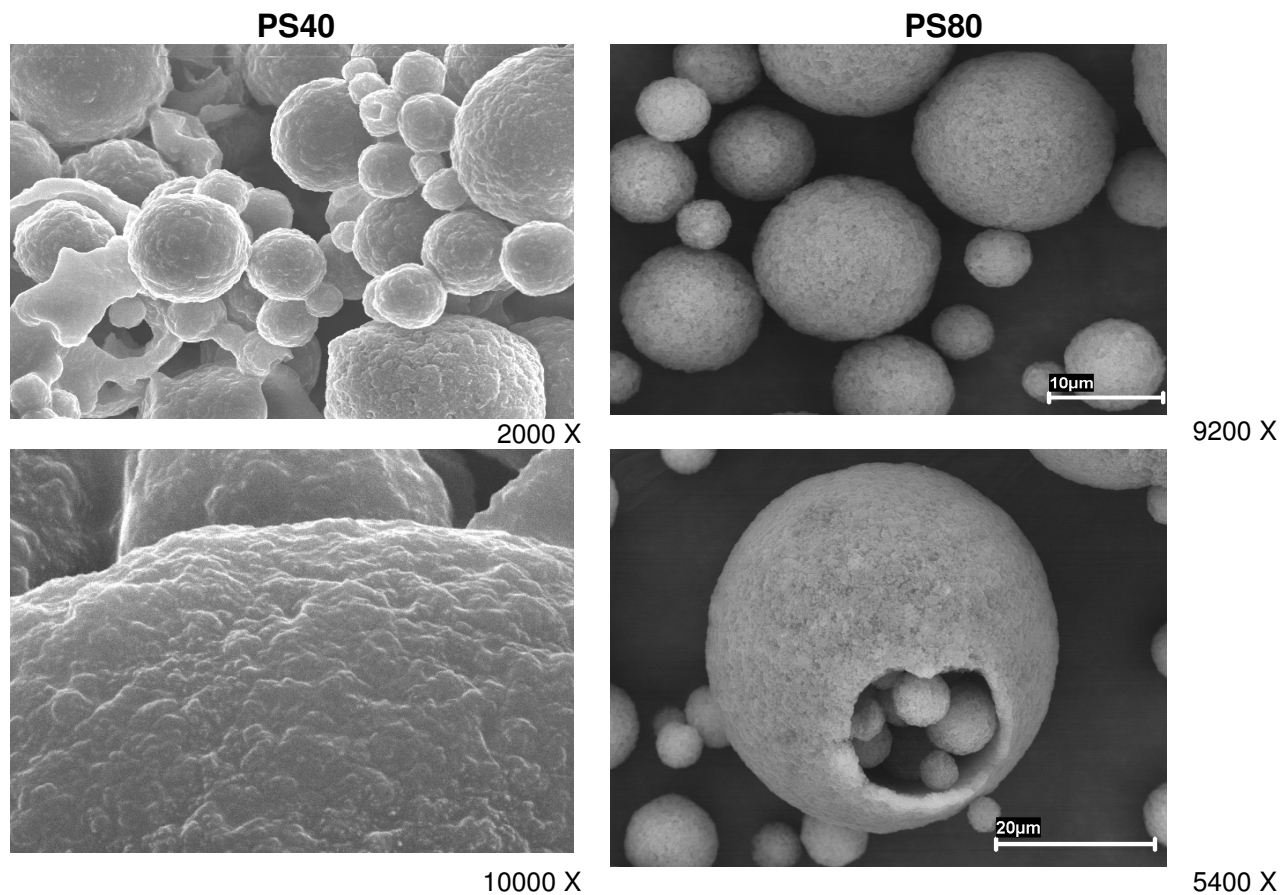


Figura 3 – Características microscópicas (MEV) dos produtos secos de sumidades floridas de *Achyrocline satureioides* obtidos a partir de solução extrativa hidroetanólica contendo 40 % (v/v) de etanol, PS40 e a partir de solução extrativa hidroetanólica contendo 80 % (v/v) de etanol, PS80.

5.1 Avaliação da estabilidade do PS40

5.1.1 Método analítico

A Figura 4 apresenta um cromatograma típico, do PS40 ($\lambda=362$ nm), em que se podem observar os picos de ácido caféico (CAF), quercetina (Q), luteolina (L) e 3-*O*-metilquercetina (3-*O*-MQ), bem como de outras três substâncias não identificadas, denominadas P1, P2, e P3, reproduzindo o perfil cromatográfico descrito por De Souza em 2002.

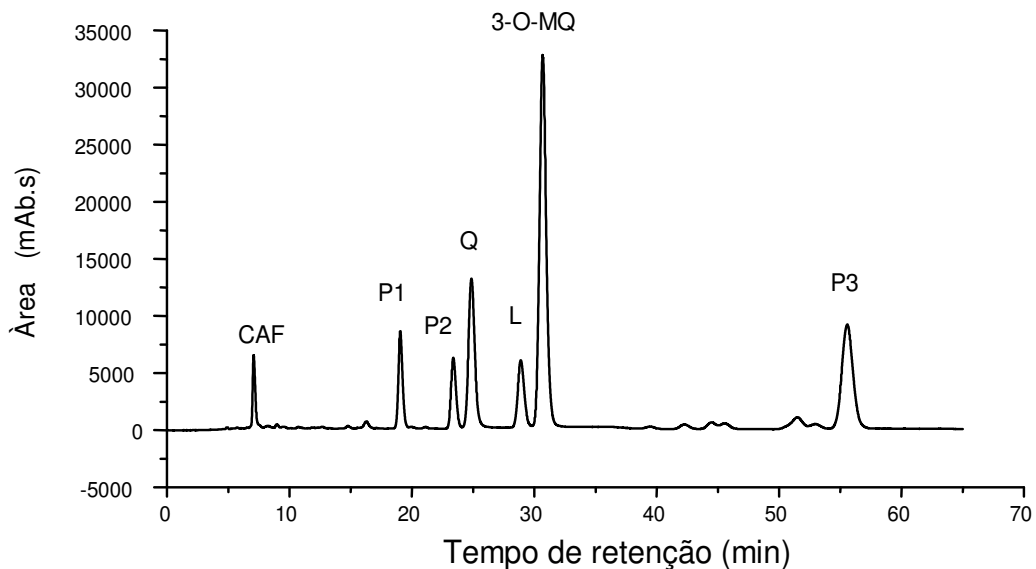


Figura 4 – Cromatograma (CLAE) típico do PS40 (fingerprint), coluna Shim-pack CLC-ODS (M) RP-18, fase móvel metanol:ácido fosfórico 0,16 M (53:47 v:v), fluxo 0,6 mL/min e detecção em 362 nm. CAF=ácido caféico, L = luteolina, Q = quercetina, 3-*O*-MQ = 3-*O*-metilquercetina e P1, P2, e P3 = substâncias não identificadas.

O ácido caféico apresentou tempo de retenção em 7,14 minutos, a quercetina em 25,68 minutos, a luteolina em 29,91 minutos e a 3-*O*-metilquercetina em 31,87 minutos.

Na Tabela 2 são apresentados os resultados das análises por CLAE em equipamento com detector de arranjo de fotodiodos, em que se observa os máximos de absorção, entre 200 e 400 nm, das substâncias estudadas. Os espectros correspondentes podem ser observados na Figura 10.

Tabela 2 – Substâncias presentes no cromatograma do PS40 (fingerprint), seus tempos de retenção, máximos de absorção e concentração inicial (µg/mg).

Substâncias	Tempo de retenção (min)	$\lambda_{\text{máx.}}$ (nm)	Identidade	Concentração Inicial (µg/mg)
CAF	7,14 *	218,8; 242,4; 327,8	Ácido caféico	3,18
P1	19,60	218,8; 242,4; 327,8	não definida	1,51
P2	24,21	218,8; 360,6	não definida	1,12
Q	25,68 *	204,7; 256,6; 374,2	Quercetina	4,09
L	29,91 *	209,4; 256,6; 351,7	Luteolina	1,62
3-O-MQ	31,87 *	204,7; 256,6; 360,6	3-O-metilquercetina	9,19
P3	58,82	369,4	não definida	3,95

Coluna *Shim-pack* CLC-ODS (M) RP-18, fase móvel metanol:ácido fosfórico 0,16 M (53:47 v:v) fluxo 0,6 mL/min e espectro obtido por detecção em arranjo de fotodiodos (Waters Alliance), 200-400 nm.

* substâncias identificadas por co-eluição com padrões de referência.

A identidade dos principais marcadores quercetina, luteolina e 3-O-metilquercetina e ácido caféico foram comprovados por co-eluição com substância química de referência.

As Figuras 5, 6 e 7 apresentam curvas analíticas obtidas para as substâncias químicas de referência quercetina, luteolina e ácido caféico bem como as correspondentes equações das retas obtidas por regressão linear.

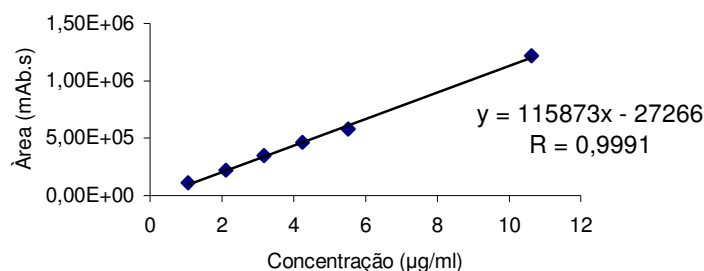


Figura 5 - Curva analítica de quercetina, coluna *Shim-pack* CLC-ODS (M) RP-18, fase móvel metanol:ácido fosfórico 0,16 M (53:47 v:v), fluxo 0,6 mL/min e detecção em 362 nm.

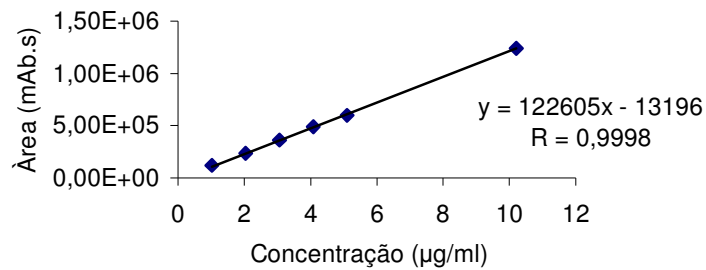


Figura 6 - Curva analítica de luteolina, coluna Shim-pack CLC-ODS (M) RP-18, fase móvel metanol:ácido fosfórico 0,16 M (53:47 v:v), fluxo 0,6 mL/min e detecção em 362 nm.

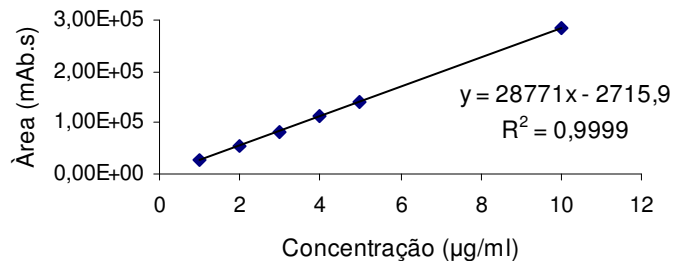


Figura 7 - Curva analítica de ácido cafécico, coluna Shim-pack CLC-ODS (M) RP-18, fase móvel metanol:ácido fosfórico 0,16 M (53:47 v:v), fluxo 0,6 mL/min e detecção em 362 nm.

Os coeficientes de regressão linear obtidos para as curvas analíticas de, quercetina, luteolina e ácido cafécico, respectivamente de 0,9991; 0,9998 e 0,9999, demonstram que o método apresenta linearidade, nas faixas de concentração testadas.

Para comprovar a identidade da substância, com tempo de retenção em 7,14 minutos, como sendo o ácido cafécico procedeu-se ao teste de recuperação da substância de referência em relação ao PS40. O teste de exatidão apresentou uma taxa de recuperação na ordem de 102,73 % (Tabela 3), permitindo comprovar a identidade do ácido cafécico e demonstrando que o método analítico é exato para este analito, que não havia sido descrito por De Souza em 2002.

Tabela 3 – Análise de exatidão para o ácido caféico presente no PS40, medida pelo teste de recuperação.

Amostras	Concentração		Recuperação (%)	Média (%)	DP	DPR %
	Adicionada (µg/mL)	Recuperada (µg/mL)				
PS401	3,07	3,10	102,34	102,73	2,11	2,05
PS402	4,32	4,34	100,84			
PS403	6,82	7,07	105,00			

PS401, PS402 e PS403 representam, respectivamente os níveis inferior, médio e superior de adição padrão (n = 3).

5.1.2 Avaliação da estabilidade do PS40 frente à temperatura

5.1.2.1 Teste de estresse do PS40 – temperatura 80 °C

O PS40 foi submetido à temperatura de 80 °C, em estufa, por um período de 28 dias. Para o estudo, o mesmo foi armazenado em três diferentes condições de acondicionamento, conforme descrito na seção 4.2.3.1. Foram analisadas as características sensoriais, perda por dessecação e teor dos constituintes fenólicos.

As características sensoriais são importantes indicativos da estabilidade dos produtos fitoterápicos. O PS40 constitui-se num pó fino de cor amarelo claro e que, após ser armazenado nas condições de estresse, apresentou diferenças, principalmente em sua coloração e odor (Tabela 4).

Todas as amostras apresentaram, a partir de sete dias, cor mais escura, característica indicativa de processos oxidativos, pois as substâncias orgânicas costumam gerar formas oxidadas com intensa coloração.

O odor, também pode evidenciar processos de degradação na medida em que, com o tempo de exposição ao calor, pode tornar-se mais acético e característico de processos oxidativos. No início da exposição das amostras ao calor (80 °C), evidenciou-se um odor característico de degradação de açúcares pelo calor, lembrando a caramelo.

Tabela 4 – Características sensoriais do PS40, antes e após ter sido submetido à condição de estresse (80 °C/28 dias).

Tempo (dias)	Acondicionamento		
	Frasco âmbar	Frasco Transparente	Vidro de relógio
Início	Pó fino Odor característico Amarelo claro	Pó fino Odor característico Amarelo claro	Pó fino Odor característico Amarelo claro
7	Pó fino Odor intensificado/caramelo Castanho escuro	Pó fino Odor intensificado/caramelo Castanho claro	Pó fino Odor intensificado/caramelo Amarelo escuro
14	Pó fino Odor oxidação/acético Cor café	Pó fino Odor oxidação/ acético Castanho escuro	Pó fino Odor oxidação/caramelo Castanho claro
21	Pó fino Odor caramelo/acético Cor café	Pó fino Odor caramelo/acético Castanho escuro	Pó fino Odor caramelo/acético Castanho claro
28	Pó fino Odor degradado/acético Cor café	Pó fino Odor degradado/acético Castanho escuro	Pó fino Odor degradado/acético Castanho claro

A perda por dessecação foi medida em amostras submetidas ao teste de estabilidade na temperatura de 80 °C, após exposição durante 7, 14, 21, e 28 dias. Os resultados podem ser visualizados na Tabela 5.

Tabela 5 – Perda por dessecação do PS40, antes e após ter sido submetido a condições de estresse (80 °C/28 dias).

Tempo (dias)	Perda por dessecação (% m/m)		
	Frasco âmbar	Frasco Transparente	Vidro de relógio
Início	4,82	4,82	4,82
7	4,74	5,95	0,55
14	2,96	6,16	0,68
21	2,33	4,31	0,68
28	1,67	3,52	0,45

Na Figura 8 e na Tabela 6 são apresentados os teores de quercetina e ácido caféico, calculados pela equação da reta de suas respectivas curvas analíticas (CLAE). As demais substâncias, luteolina, 3-O-metilquercetina, P1 e P2 foram calculados com base na equação da reta da curva padrão da luteolina e a substância P3 com base na equação de reta da quercetina.

Na Figura 8 observa-se uma brusca redução do teor de ácido caféico após o sétimo dia, variando de 35 a 50 %, dependendo do tipo de acondicionamento e sendo que a partir do décimo quarto dia o mesmo não pôde mais ser quantificado.

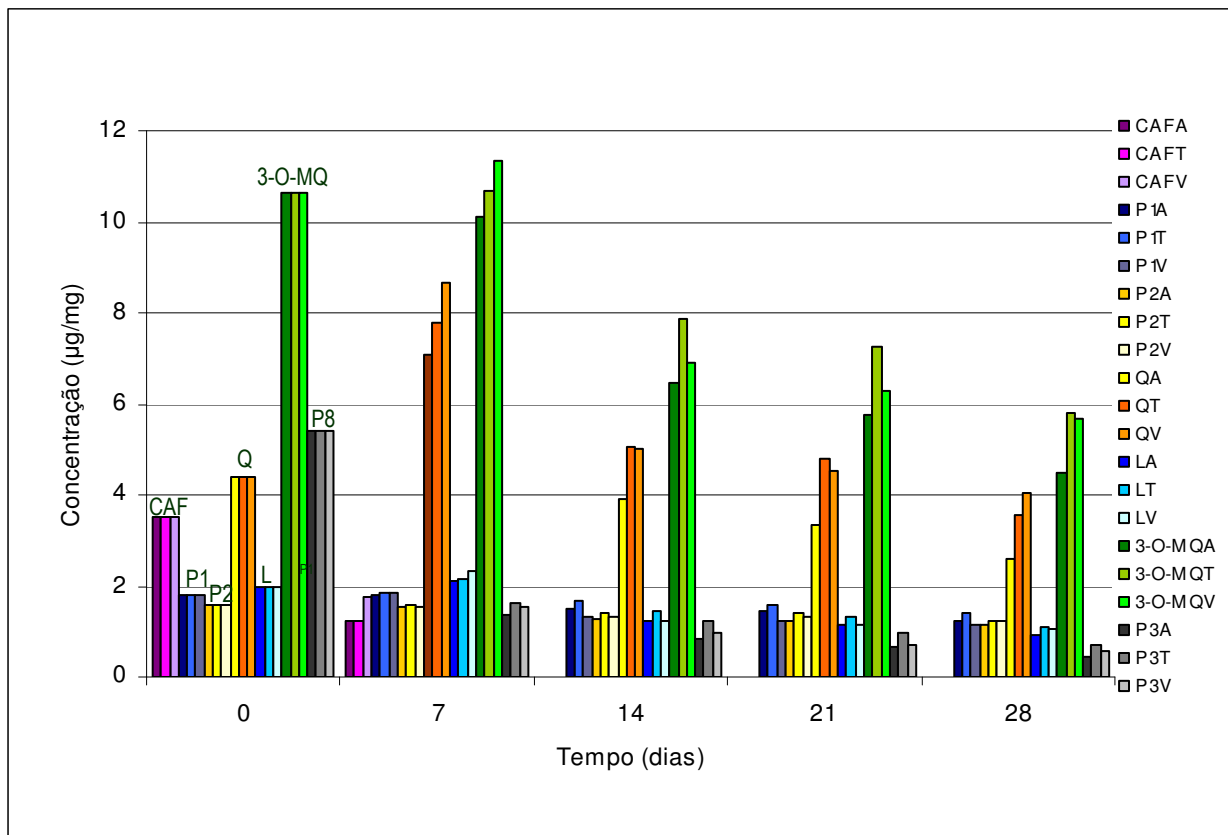


Figura 8 - Constituintes fenólicos de produto seco de *Achyrocline satureioides*, PS40, teste de estresse, temperatura de 80 °C, durante 28 dias. Concentração de Ácido caféico (CAF), Luteolina (L), Quercetina (Q) e 3-O-Metilquercetina (3-O-MQ), substâncias não identificadas P1, P2 e P3. A = frasco âmbar, T = frasco transparente e V= vidro de relógio.

Tabela 6 – Constituintes fenólicos de produto seco de *Achyrocline satureioides*, PS40, em teste de estresse, temperatura de 80 °C, durante 28 dias.

Substância	Tempo (dias)									
	início		7		14		21		28	
	C (µg/mg)	DPR %	C %	DPR %	C %	DPR %	C %	DPR %	C %	DPR %
CAFA	3,18	1,19	34,8	1,18	NQ	-	NQ	-	NQ	-
CAFT	3,18	1,19	35,1	1,19	NQ	-	NQ	-	NQ	-
CAFV	3,18	1,19	49,8	1,69	NQ	-	NQ	-	NQ	-
P1A	1,51	1,69	99,4	4,15	83,3	1,36	79,4	2,50	68,9	1,11
P1T	1,51	1,69	102,2	2,72	93,9	1,59	88,3	1,63	77,8	1,37
P1V	1,51	1,69	101,7	3,88	72,2	2,43	68,9	1,87	63,3	1,85
P2A	1,12	1,58	98,1	1,53	80,3	1,02	79,0	2,33	72,0	0,98
P2T	1,12	1,58	100,0	1,60	89,8	2,07	88,5	1,20	79,6	2,01
P2V	1,12	1,58	99,4	2,67	84,1	1,69	83,4	0,65	79,0	1,85
QA	4,09	2,66	160,8	1,35	88,4	0,84	75,3	2,74	59,0	2,16
QT	4,09	2,66	176,2	2,97	115,0	0,93	108,6	1,83	81,0	0,88
QV	4,09	2,66	195,9	1,56	114,1	0,64	102,5	0,49	91,6	0,55
LA	1,62	1,35	106,1	2,16	61,6	1,47	57,1	2,07	46,5	1,29
LT	1,62	1,35	109,6	3,46	72,7	0,59	67,7	1,35	56,6	1,60
LV	1,62	1,35	118,2	2,81	62,6	1,30	58,6	0,59	53,5	1,00
3-O-MQA	9,19	1,28	95,1	1,23	60,6	0,39	54,1	2,34	42,1	1,16
3-O-MQT	9,19	1,28	100,7	2,10	74,1	0,88	68,2	1,26	54,6	1,05
3-O-MQV	9,19	1,28	106,6	1,59	64,7	0,70	59,3	0,74	53,2	1,31
P3A	3,95	1,35	25,4	1,66	15,4	2,52	12,1	2,94	8,2	6,44
P3T	3,95	1,35	30,4	2,43	22,8	1,49	18,0	1,78	13,2	5,83
P3V	3,95	1,35	28,8	1,72	17,8	1,53	13,4	1,86	10,9	3,81

Concentração inicial (C µg/mg), concentração percentual (C %) e desvio padrão relativo (DPR %) CAF = ác. caféico L = luteolina, Q = quercetina, 3-O-MQ = 3-O-metilquercetina; substâncias não identificadas P1, P2, e P3; NQ = não quantificável, A = frasco âmbar, T = frasco transparente e V = vidro de relógio.

Tal característica pode ser de interesse para a utilização do ácido caféico como um marcador para estudos de estabilidade do PS40. Nestas condições, as substâncias P1 e P2 mantiveram teores de 88 % em relação ao inicial, até o vigésimo primeiro dia, quando acondicionado em frasco de vidro transparente, chegando ao final do experimento com teores de 78 % e 80 %, respectivamente. A luteolina e a 3-O-metilquercetina mantiveram-se dentro dos limites de ± 10 % até o sétimo dia, sendo que tiveram seus teores reduzidos para 73 % e 74 %, respectivamente, no décimo quarto dia, quando acondicionado em frasco de vidro transparente, nas mesmas condições.

Ao analisar os resultados (Figura 8), pode-se observar que após sete dias em estufa a 80 °C houve um aumento do teor de quercetina, nas amostras, chegando a teores de 161 a 196 % em relação ao inicial, dependendo do tipo de acondicionamento.

Concomitantemente, observou-se um decréscimo prporcional correspondente à substância P3, que tem seus teores reduzidos para 8 a 13 % do teor inicial, dependendo do tipo de acondicionamento. A ocorrência desta última substância foi observada em trabalho anterior (DE SOUZA, 2002), quando foi levantada a hipótese de tratar-se de uma chalcona.

A Figura 9 apresenta, detalhadamente, uma comparação entre a evolução de quercetina e da substância P3, corroborando, nos primeiros sete dias uma relação inversa das suas presenças.

Esta observação suscitou o interesse em investigar se a quercetina formada poderia ser um produto de degradação da substância P3. Com o intuito de avaliar a identidade da substância com tempo de retenção em torno de 60 min (P3), o mesmo foi isolado e purificado e sua identificação é descrita na seção 5.5.

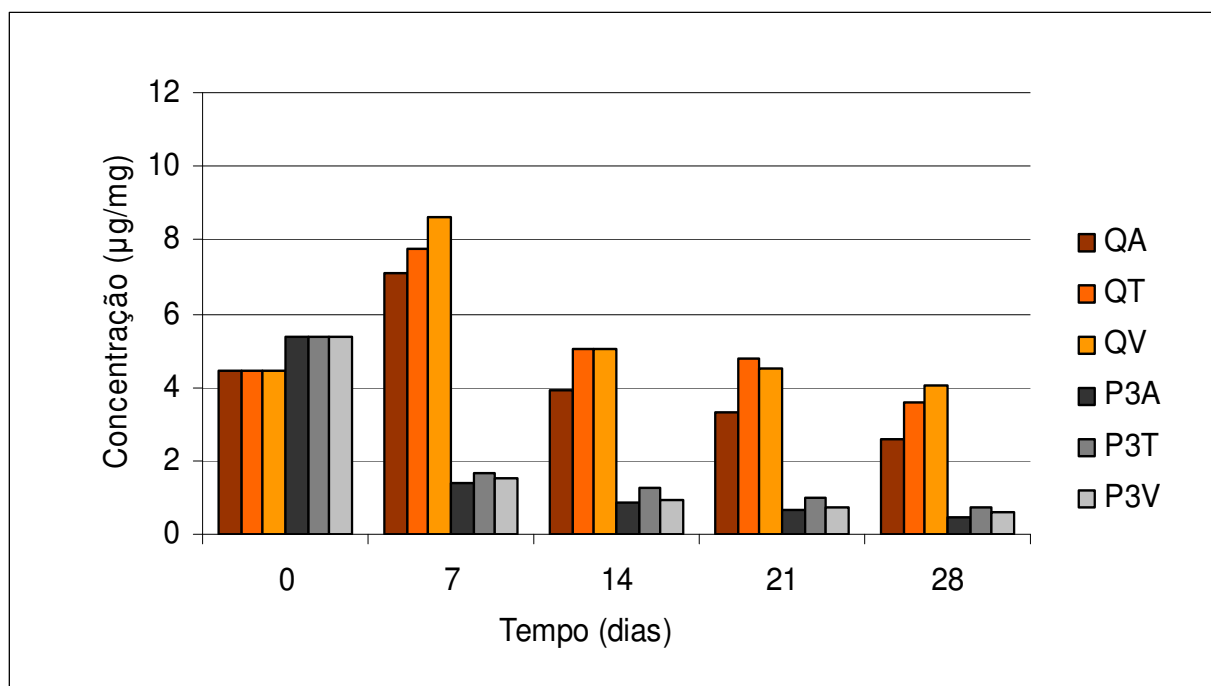


Figura 9 – Histograma comparativo entre as concentrações de quercetina e P3, contidas no PS40, exposto à temperatura de 80 °C. Q = quercetina e P3 = substância não identificada. A = frasco âmbar, T = frasco transparente e V = vidro de relógio.

Após as análises quantitativas, o PS40 foi avaliado por cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando as mesmas condições cromatográficas citadas anteriormente (4.2.5.3), porém com detector de arranjo de fotodiodos. Com estas análises confirmaram-se os espectros correspondentes à luteolina, quercetina e 3-O-metilquercetina, identificadas por De Souza, em 2002, com absorções características das Bandas I e II, referentes aos anéis B e A, respectivamente (Figura 10).

O ácido caféico e a substância P1 apresentaram um espectro de absorção no ultravioleta muito semelhante, apontando para a possibilidade de P1 vir a ser um derivado do ácido caféico. As substâncias P2 e P3 apresentam um espectro característico de chalcona, com predominância da Banda I referente ao anel B (Figura 10).

Na Figura 11, as análises dos espectros ultravioleta das amostras de PS40 submetidas a 80 °C, nos tempos 0 e 7, dias confirmam a autenticidade da quercetina e o aumento da intensidade do pico correspondente, revela o aumento de sua concentração após 7 dias em temperatura de 80 °C. Sendo assim, a possibilidade de um produto de degradação de PS40 apresentar-se sobreponível à quercetina foi descartada, visto que o espectro do pico correspondente à quercetina não sofreu alteração após o aquecimento.

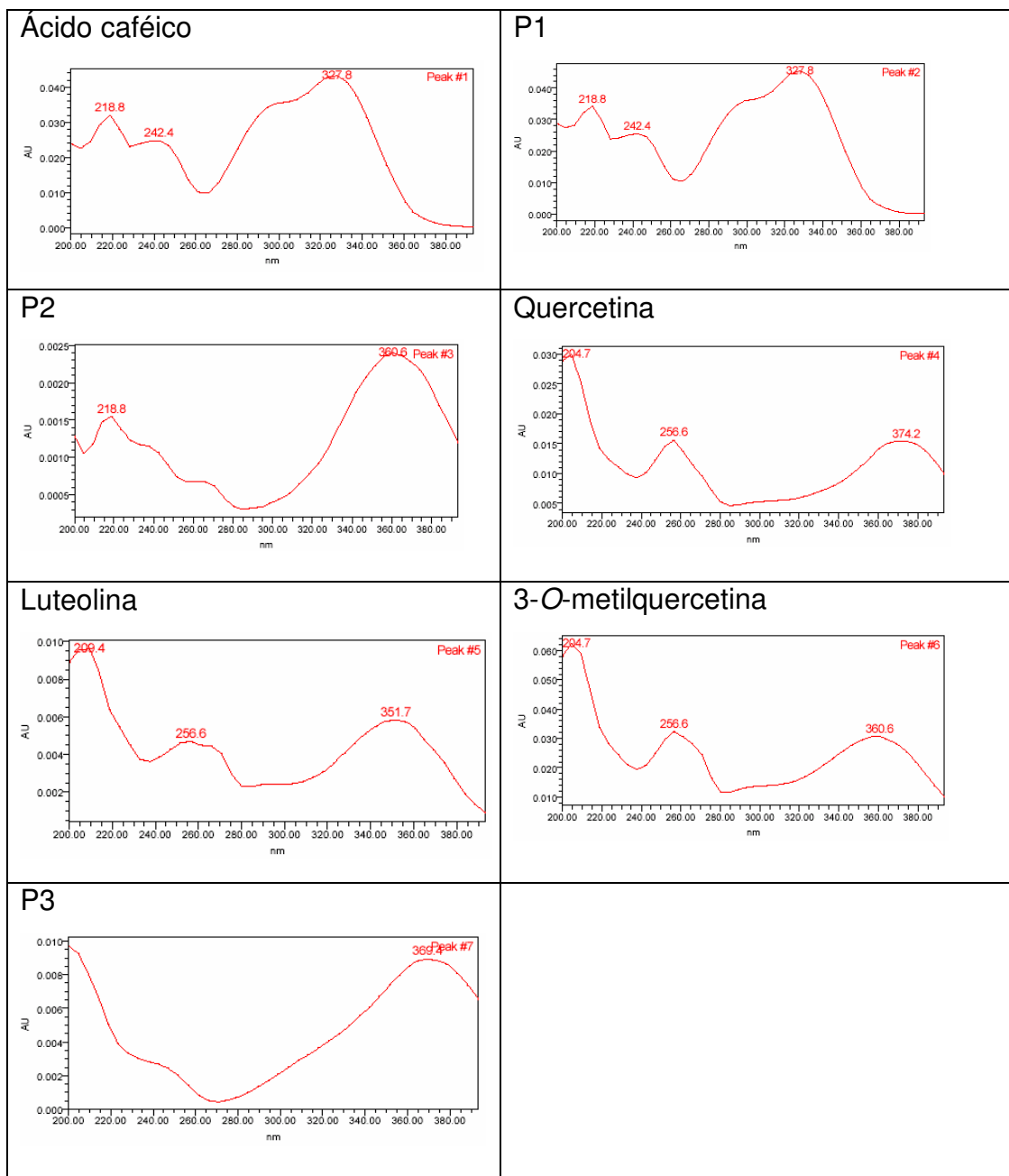


Figura 10 - Espectros de absorção no ultravioleta das substâncias presentes no cromatograma do PS40, seus máximos de absorção. Coluna Shim-pack CLC-ODS (M) RP-18, fase móvel metanol:ácido fosfórico 0,16 M (53:47 v:v) fluxo 0,6 mL/min e espectro obtido por detecção em arranjo de fotodiodos (Waters Alliance), 200-400 nm.

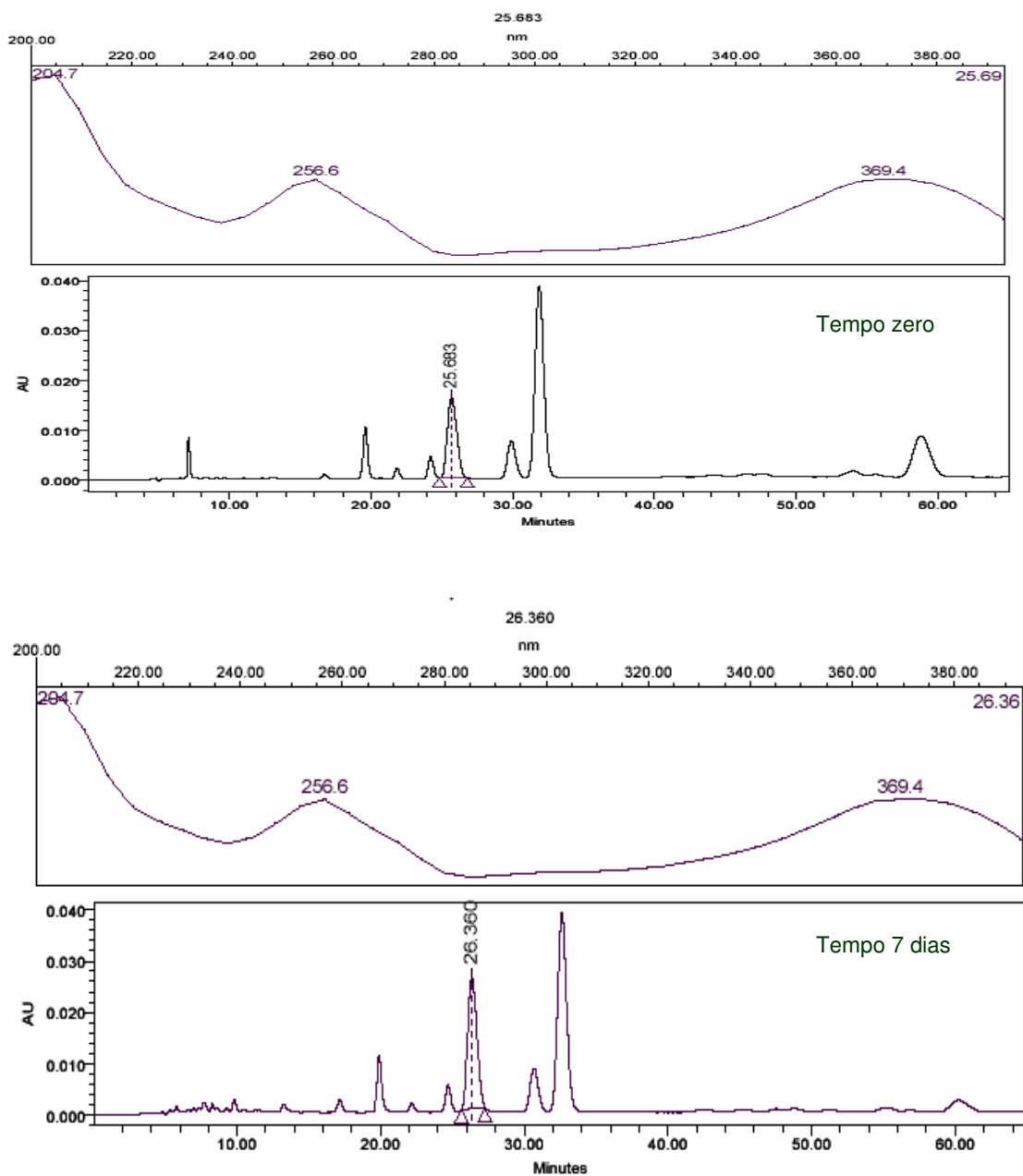


Figura 11 – Comparativo do PS40, tempo zero e tempo 7 dias, evidenciando o aumento no teor de quercetina, quando submetido à temperatura de 80 °C.

Para complementar o estudo de estabilidade na temperatura de 80 °C realizou-se análise mais detalhada visando a detectar, mais precisamente, o momento durante

os primeiros sete dias, em que a quercetina teria seu ponto máximo de concentração. O PS40 foi colocado em estufa na temperatura de 80 °C, em vidro de relógio, e foram analisadas amostras nos tempos 0, 2, 5 e 7 dias, conforme descrito anteriormente.

Observou-se um aumento de concentração já no segundo dia, com decaimento a partir do quinto dia, como pode ser visto na Figura 12.

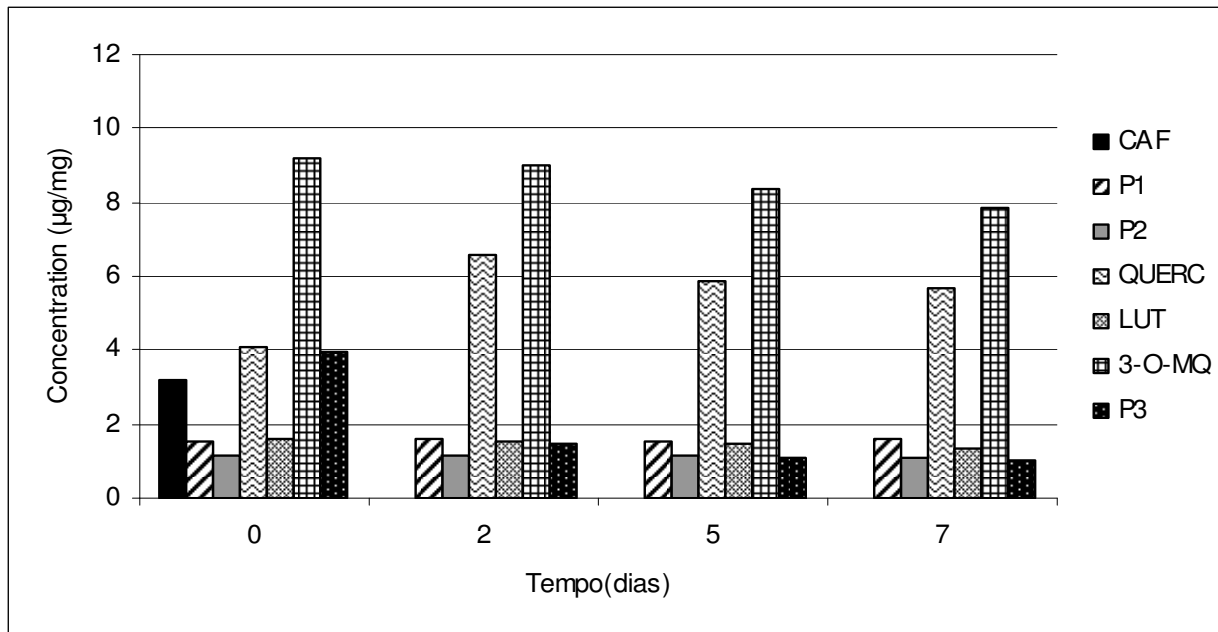


Figura 12 – Constituintes fenólicos detectados no PS40 armazenado em estufa 80 °C durante 7 dias: CAF= ac. caféico, L = luteolina, Q = quercetina, 3-O-MQ = 3-O-metilquercetina; substâncias não identificadas P1, P2, e P3.

Uma nova avaliação nos tempos 0, 2 e 4 foi realizada, corroborando-se o aumento na concentração de quercetina até o segundo dia e observando-se que, a partir do quarto dia, já ocorre redução da sua concentração. Desta forma estipulou-se o tempo de dois dias, na temperatura de 80 °C, como tempo em que se detecta maior concentração de quercetina, como pode ser observado na Figura 13. No entanto, neste intervalo de tempo (2 dias), já se observa a completa degradação do ácido caféico e redução de P3 a concentração inferior a 50 % da originalmente presente em PS40. As demais substâncias não alteraram sua concentração drasticamente. Observando-se pequenos decaimentos.

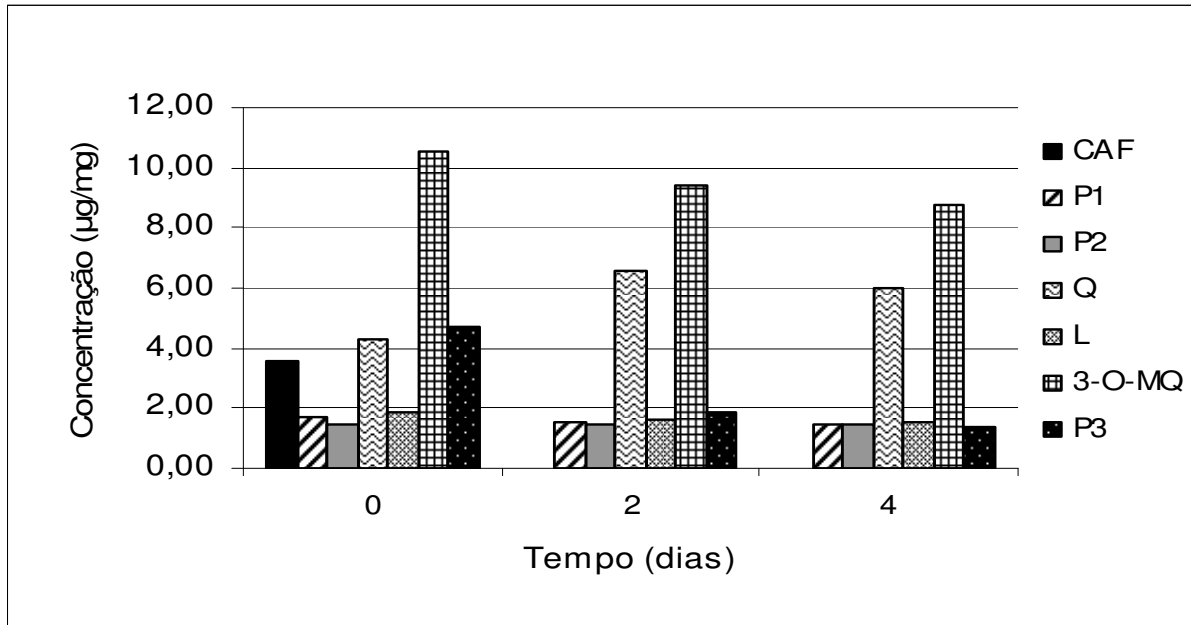


Figura 13 – Constituintes fenólicos detectados no PS40 armazenado em estufa 80 °C durante 4 dias. CAF= ác. caféico, L = luteolina, Q = quercetina, 3-O-MQ = 3-O-metilquercetina; substâncias não identificadas P1, P2, e P3.

A modificação da composição de PS40 pela temperatura, em dois dias, trouxe consigo a dúvida do impacto desta sobre a atividade biológica. Assim, com base nestes resultados, escolheu-se o PS40+, submetido à temperatura de 80 °C durante o tempo de dois dias, para ser testado no ensaio farmacológico, visando a comparar sua atividade antiinflamatória com a do PS40. O resultado deste ensaio está descrito na seção 5.1.5.

5.1.2.2 Teste acelerado de estabilidade do PS40 – 50 ± 2 °C / 90 ± 5 % UR

O teste foi realizado conforme Resolução Específica nº 560, de 2 de abril de 2002 (BRASIL, 2002). A temperatura de 50 ± 2 °C e umidade relativa de 90 ± 5 % foram empregadas durante 3 meses, nas condições descritas na seção 4.2.3.1.

As características sensoriais das amostras submetidas ao teste de estabilidade, sob temperatura de 50 ± 2 °C / 90 ± 5 % UR, no tempo zero e após exposição durante 1, 2, e 3 meses, podem ser visualizadas na Tabela 7.

Durante o teste acelerado foram observadas alterações significativas das características sensoriais do PS40. Após 3 meses, as amostras tornaram-se de coloração castanho escuro, com odor acético.

Tabela 7 – Características sensoriais do PS40, antes e durante o teste de estabilidade acelerado (50 ± 2 °C / 90 ± 5 % UR), durante 3 meses.

Tempo (meses)	Acondicionamento	
	Frasco âmbar	Transparente
Início	Pó fino Odor característico Amarelo claro	Pó fino Odor característico Amarelo claro
1	Pó fino Odor intensificado/ Acético Castanho escuro	Pó fino Odor intensificado/ Acético Castanho claro
2	Pó fino Acético Castanho escuro	Pó fino Acético, menos intenso Castanho escuro
3	Aspecto grumoso (úmido) Acético Castanho escuro	Pó fino Acético, menos intenso Castanho escuro

A perda por dessecação foi medida em amostras submetidas ao teste de estabilidade, sob temperatura de 50 ± 2 °C / 90 ± 5 %, no tempo zero e após exposição durante 1, 2, e 3 meses. Os resultados podem ser visualizados na Tabela 8.

Tabela 8 – Perda por dessecação (%) do PS40, antes e durante o teste de estabilidade acelerado (50 ± 2 °C / 90 ± 5 % UR), durante 3 meses.

Tempo (meses)	Perda por dessecação (% m/m)	
	Frasco âmbar	Frasco Transparente
Início	4,42	4,42
1	5,38	5,22
2	7,02	5,47
3	7,47	5,57

Durante os 3 meses a perda por dessecação variou de 4,42 % a 7,47 % para as amostras acondicionadas em frasco âmbar e de 4,42 % a 5,57 % para as amostras mantidas em frasco transparente. Denotando que o fechamento dos frascos não foi suficiente para proteger as amostras frente à umidade relativa de 90 %.

A Figura 14 e a Tabela 9 apresentam a concentração dos constituintes fenólicos durante os 3 meses de teste de estabilidade acelerado.

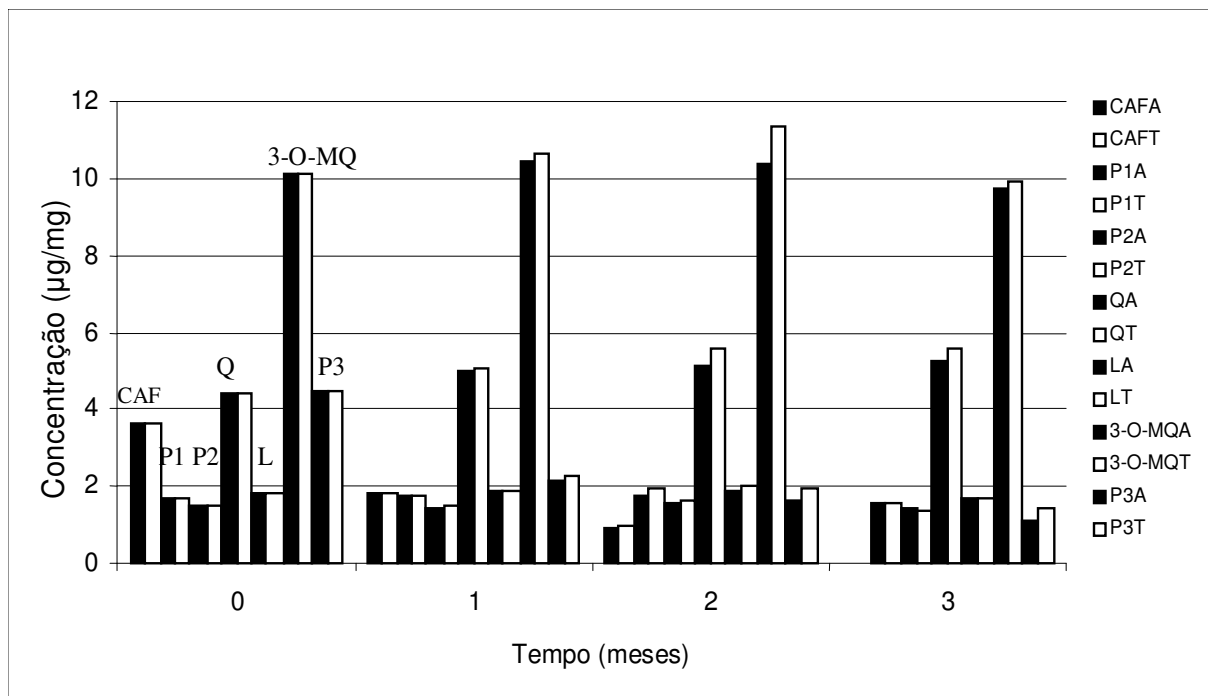


Figura 14 – Constituintes fenólicos de produto seco de *Achyrocline satureioides*, PS40, durante o teste de estabilidade acelerado (50 ± 2 °C / 90 ± 5 % UR por 3 meses). CAF=ác. caféico, L = luteolina, Q = quercetina, 3-O-MQ = 3-O-metilquercetina; substâncias não identificadas P1, P2, e P3. A = frasco âmbar e T = frasco transparente.

Alterações marcantes foram observadas nestas condições, especialmente no que se refere ao ácido caféico, substância P3 e quercetina. Após 3 meses, o ácido caféico não foi mais detectado e a substância P3 teve sua concentração reduzida a 25,3 % (frasco âmbar) e 31,5 % (frasco transparente) comparativamente à concentração inicial. Por outro lado a concentração de quercetina aumentou de $4,41 \pm 0,08$ µg/mg para $5,30 \pm 0,10$ µg/mg quando acondicionada em frasco âmbar e de $4,41 \pm$

0,08 µg/mg para $5,60 \pm 0,05$ µg/mg quando acondicionada em frasco transparente, representando respectivamente, um aumento de 120 % e 127 % da concentração inicial.

Tabela 9 – Constituintes fenólicos de produto seco de *Achyrocline satureioides*, PS40, em teste acelerado de estabilidade (50 ± 2 °C e 90 ± 5 % UR), durante 3 meses.

Substância	Tempo (meses)							
	início		1		2		3	
	C (µg/mg)	DPR %	C %	DPR %	C %	DPR %	C %	DPR %
CAFA	3,18	1,90	48,9	5,29	24,6	3,83	NQ	-
CAFT	3,18	1,90	48,6	6,69	27,3	6,44	NQ	-
P1A	1,51	1,75	104,2	1,60	104,8	2,57	94,0	0,90
P1T	1,51	1,75	105,4	3,20	115,5	5,97	94,0	0,75
P2A	1,12	1,87	97,3	2,42	104,1	2,65	95,2	1,55
P2T	1,12	1,87	100,0	2,52	111,6	6,54	93,9	1,06
QA	4,09	1,99	113,6	1,58	116,3	2,87	120,0	1,96
QT	4,09	1,99	114,8	2,82	126,4	4,42	126,8	1,06
LA	1,62	1,51	103,3	1,88	103,3	2,50	92,8	1,37
LT	1,62	1,51	104,4	2,70	111,6	5,10	92,8	1,00
3-O-MQA	9,19	1,50	103,1	1,47	102,5	2,17	96,1	1,34
3-O-MQT	9,19	1,50	104,7	2,54	112,3	5,56	98,2	0,91
P3A	3,95	1,89	48,5	1,58	36,7	2,98	25,3	2,84
P3T	3,95	1,89	50,1	2,67	43,0	6,28	31,5	2,69

Concentração inicial (C µg/mg), concentração percentual (C %) e desvio padrão relativo percentual(DPR %) de CAF= ác. caféico, L = luteolina, Q = quercetina, 3-O-MQ = 3-O-metilquercetina; substâncias não identificadas P1, P2, e P3; NQ = não quantificável. A = frasco âmbar e T = frasco transparente.

A hipótese deste fenômeno estar relacionado ao proporcional decréscimo da substância P3 durante o primeiro mês, chama a atenção. No entanto, o fato de a concentração de P3 continuar decaindo após o segundo mês, sem o proporcional incremento na concentração de quercetina, fornece indício de eventual degradação de precursores da quercetina, eventualmente presentes. O aprofundamento das investigações é imprescindível para a elucidação deste fenômeno.

As substâncias P1, P2, luteolina e 3-O-metilquercetina mantiveram suas concentrações dentro dos limites de ± 10 %, durante os 3 meses do experimento, independente do tipo de acondicionamento.

5.1.2.3 Teste de estabilidade de longa duração do PS40 - temperatura ambiente (25 ± 2 °C/ 60 ± 5 % UR)

Amostras de PS40, acondicionadas em frascos de vidro âmbar e frascos de vidro transparente fechados, foram expostas a condições ambientais. A temperatura e a umidade foram monitoradas, com auxílio de termômetro e higrômetro. A temperatura manteve-se numa média de 25 ± 2 °C e a umidade em torno de 60 ± 5 % UR. As amostras submetidas estas condições foram analisadas nos seguintes intervalos de tempo: 0, 3, 6, 9 e 12 meses.

As características sensoriais do PS40 submetido à análise de estabilidade em teste de longa duração constam da Tabela 10. O PS40 após ser armazenado nas condições ambientais não apresentou diferenças com relação à coloração e ao odor.

Tabela 10 – Características sensoriais do PS 40, antes e durante ter sido submetido à temperatura ambiente (25 ± 2 °C e 60 ± 5 % UR).

Tempo (meses)	Acondicionamento	
	Frasco âmbar	Transparente
Início	Pó fino Odor característico Amarelo claro	Pó fino Odor característico Amarelo claro
3	Pó fino Odor característico Amarelo claro	Pó fino Odor característico Amarelo claro
6	Pó fino Odor característico Amarelo claro	Pó fino Odor característico Amarelo claro
9	Pó fino Odor característico Amarelo claro	Pó fino Odor característico Amarelo claro
12	Pó fino Odor característico Amarelo claro	Pó fino Odor característico Amarelo claro

Durante os 12 meses a perda por dessecação variou de 4,82 % a 5,85 % para as amostras acondicionadas em frasco âmbar e de 4,82 % a 5,31 % para as amostras mantidas em frasco transparente. Demonstrando, também nesta condição, que o fechamento dos frascos não foi suficiente para proteger as amostras frente a umidade relativa de 60 %.

Os resultados do teste de perda por dessecação das amostras do PS40 submetidas a 25 ± 2 °C e 60 ± 5 % UR são apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 – Perda por dessecação do PS40, após ter sido submetido à temperatura ambiente (25 ± 2 °C e 60 ± 5 % UR).

Tempo (meses)	Perda por dessecação (% m/m)	
	Frasco âmbar	Frasco Transparente
Início	4,82	4,82
3	5,34	5,54
6	4,35	4,41
9	4,83	4,86
12	5,85	5,31

Os resultados da análise dos constituintes fenólicos durante os 12 meses de armazenagem em temperatura ambiente (25 ± 2 °C e 60 ± 5 % UR) estão apresentados na Figura 15 e Tabela 12.

O PS40 submetido ao teste de estabilidade em condições ambientais monitoradas por doze meses, teste de longa duração, apresentou-se relativamente estável. Ao final deste período, observa-se comportamento diverso entre os constituintes. No entanto, os constituintes de referência, ácido caféico, quercetina, luteolina e 3-O-metilquercetina mantiveram-se em concentração superior a 81 %. O constituinte menos estável foi P3 que diminuiu sua concentração até 58 % do valor inicial, seguido do constituinte P2 cuja concentração foi reduzida a 70 % de sua concentração inicial. Os constituintes mais estáveis foram P1 e a 3-O-metilquercetina.

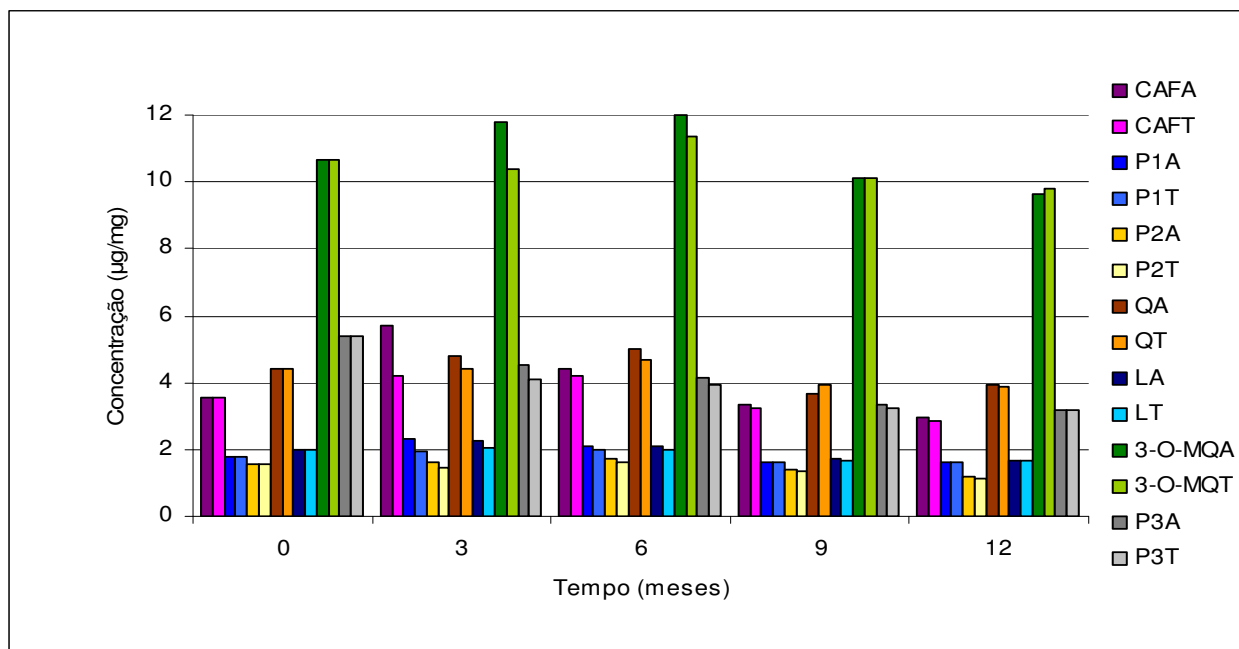


Figura 15 – Constituintes fenólicos de produto seco de *Achyrocline satureioides*, PS40, estabilidade longa duração (25 ± 2 °C e 60 ± 5 % UR.), durante 12 meses. CAF = ácido caféico, L = luteolina, Q = quercetina, 3-O-MQ = 3-O-metilquercetina; substâncias não identificadas P1, P2 e P3; A = frasco âmbar e T = frasco transparente.

Tabela 12 – Constituintes fenólicos de produto seco de *Achyrocline satureioides* PS40 em teste de estabilidade de longa duração (25 ± 2 °C e 60 ± 5 % UR), por 12 meses.

Substância	Tempo (meses)									
	início		3		6		9		12	
	C (µg/mg)	DPR %	C %	DPR %	C %	DPR %	C %	DPR %	C %	DPR %
CAFA	3,18	1,19	161,7	17,46	124,3	13,82	93,7	4,33	83,5	6,11
CAFT	3,18	1,19	118,9	3,48	118,7	11,49	90,9	1,65	81,0	1,49
P1A	1,51	1,69	128,3	15,8	116,7	14,5	88,9	2,02	90,0	0,82
P1T	1,51	1,69	108,9	2,37	110,0	17,66	89,4	0,97	90,6	1,24
P2A	1,12	1,58	104,5	3,59	108,3	14,88	89,8	2,89	75,2	1,27
P2T	1,12	1,58	91,7	3,17	101,3	16,74	84,1	0,84	70,7	1,20
QA	4,09	2,66	108,6	6,54	112,9	9,36	83,4	3,68	88,7	1,45
QT	4,09	2,66	100,5	2,46	106,3	6,00	88,7	2,52	87,5	1,78
LA	1,62	1,35	113,1	9,81	106,6	9,58	86,4	0,86	84,3	1,24
LT	1,62	1,35	104,0	2,60	101,5	9,05	85,4	1,37	85,4	1,75
3-O-MQA	9,19	1,28	111,0	11,36	112,7	10,96	95,1	1,91	90,6	0,62
3-O-MQT	9,19	1,28	97,7	2,40	107,0	12,25	95,4	1,13	92,2	1,93
P3A	3,95	1,35	84,2	8,52	76,6	10,26	62,0	1,79	58,4	2,23
P3T	3,95	1,35	75,9	1,59	73,1	9,42	60,1	0,86	58,4	1,39

Concentração inicial (C µg/mg), concentração percentual (C %) e desvio padrão relativo (DPR %) de CAF = ác. caféico, L = luteolina, Q = quercetina, 3-O-MQ = 3-O-metilquercetina; substâncias não identificadas P1, P2, e P3; A = frasco âmbar, T = frasco transparente.

Muito embora tenham ocorrido variações dos constituintes analisados, de forma diversa, a redução da concentração do conjunto das substâncias avaliadas, isto é, o somatório da concentração de todos os constituintes fenólicos dosados, foi inferior a 10 % da concentração inicial (EMEA, 2001), até nove meses de armazenagem (Figura 16). Não foram observadas diferenças estatísticas (teste-t de *Student* $p > 0,05$) entre o acondicionamento em frasco âmbar ou transparente.

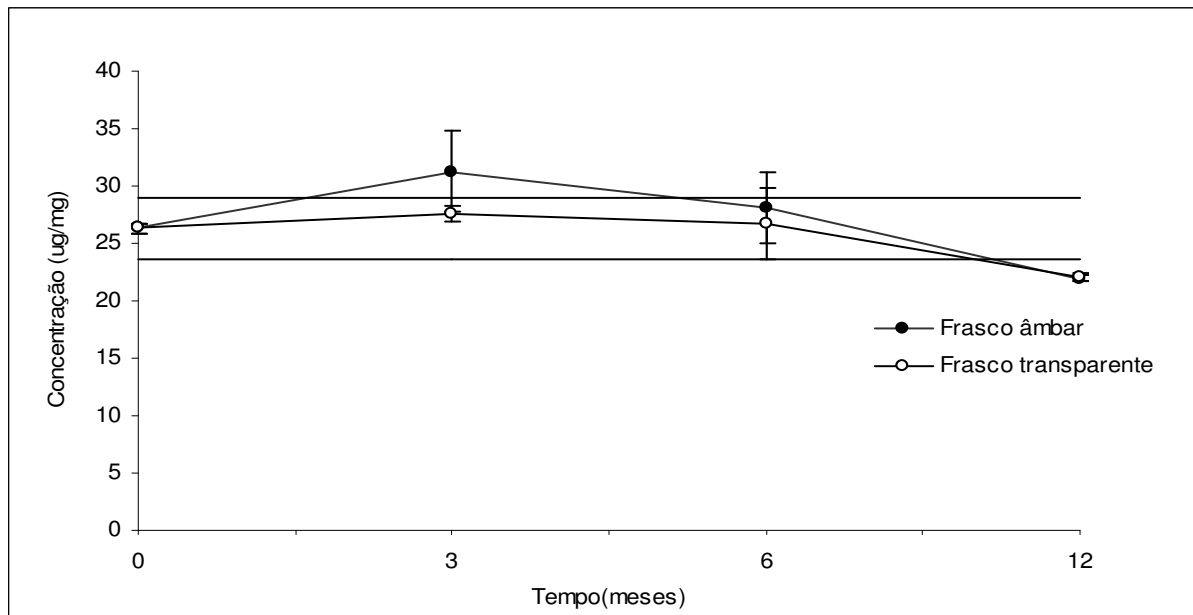


Figura 16 - Concentração total dos constituintes fenólicos de produto seco de *Achyrocline satureioides*, PS40, submetido ao teste de estabilidade de longa duração ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $60\text{ \%} \pm 5\text{ \% UR}$). As linhas paralelas representam $\pm 10\text{ \%}$ da concentração inicial.

De acordo com o guia para avaliação da estabilidade (ICH-Q1E, 2003), o prolongamento da reta obtida pela regressão linear dos pontos, fornece o tempo que pode ser considerado como o de vida útil do produto. Foram obtidas retas de regressão para os pontos referentes ao acondicionamento em frasco âmbar e frasco transparente, obtendo-se para ambos os casos, um coeficiente de correlação em torno de 0,5 ($r = 0,5$). No entanto, este baixo coeficiente de correlação demonstra pouca aplicabilidade deste método ao caso. Sendo assim, para a matriz complexa, os dados da Figura 16 permitem uma previsão de estabilidade de até nove meses, nestas condições de armazenagem, considerando o limite de $\pm 10\text{ \%}$ para a variação do teor inicial do

conjunto de polifenóis presentes em PS40 (EMEA, 2001; HEFENDEHL, 1987; ICH-Q1A, 2003).

Pela análise dos principais marcadores, de forma isolada, constata-se que o método da regressão também não é aplicável, pois, os valores de correlação ficam entre 0,183 e 0,714. No entanto observa-se que três dos marcadores, quercetina, luteolina e 3-*O*-metilquercetina se mantêm dentro do limite de variação de $\pm 10\%$ do teor inicial por, pelo menos, 12 meses, como pode ser visto nas Figuras 17, 18 e 19.

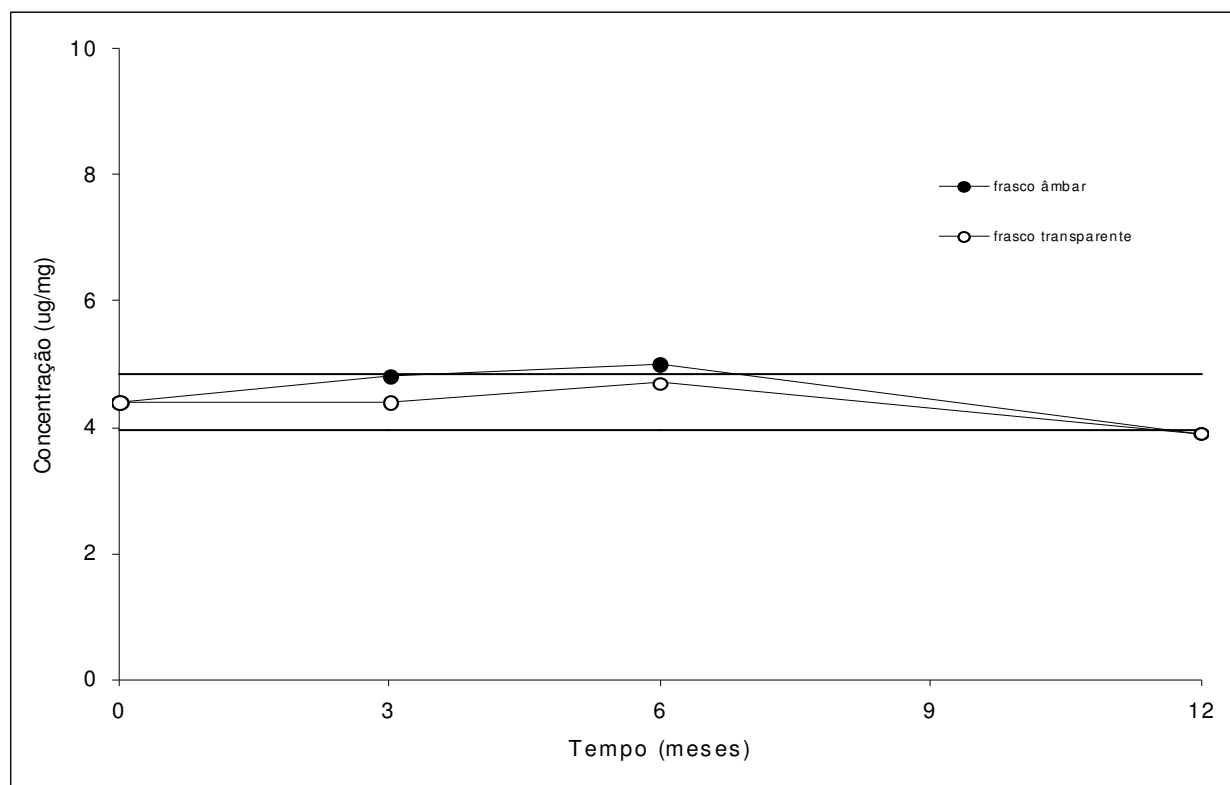


Figura 17 – Variação do teor de quercetina no PS40 durante estudo de estabilidade de longa duração, 12 meses ($25 \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$ e $60 \pm 5\%$ UR). As linhas paralelas representam $\pm 10\%$ da concentração inicial.

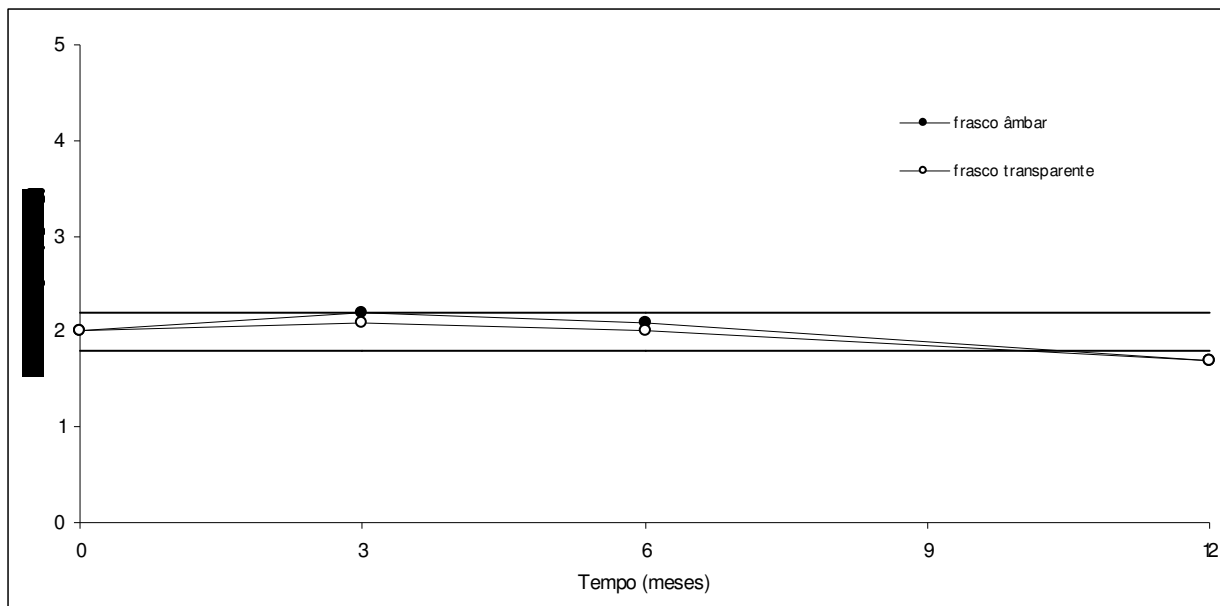


Figura 18 – Variação do teor de luteolina no PS40 durante o estudo de estabilidade de longa duração, 12 meses ($25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ e $60 \pm 5 \text{ \% UR}$). As linhas paralelas representam $\pm 10 \text{ \%}$ da concentração inicial.

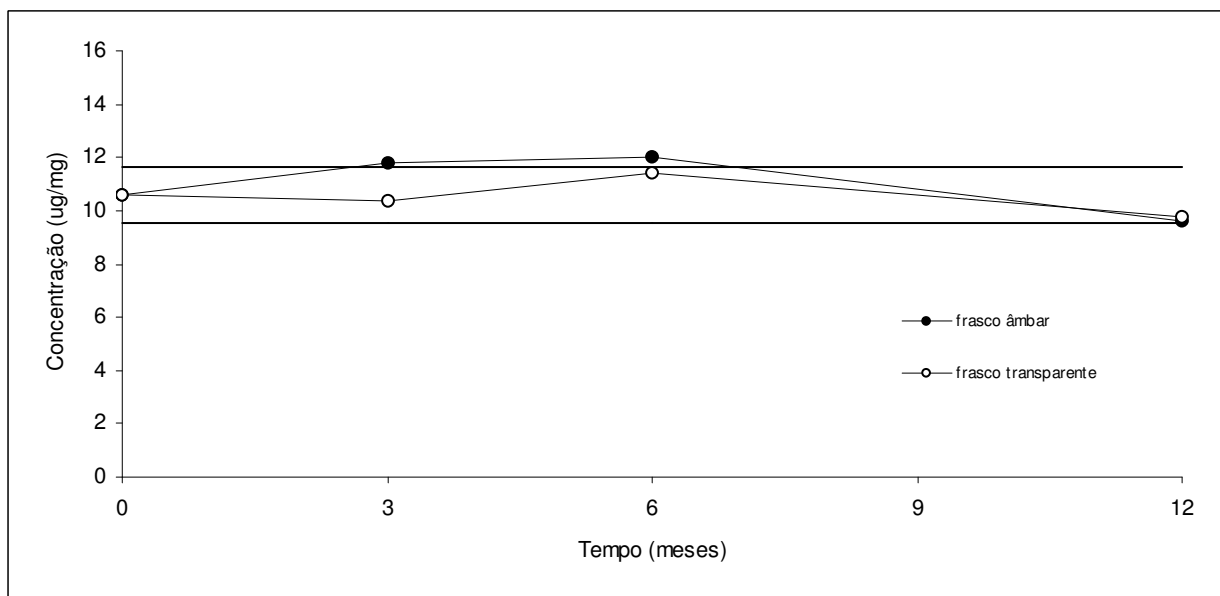


Figura 19 – Variação do teor de 3-O-metilquercetina no PS40 durante o estudo de estabilidade de longa duração, 12 meses ($25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ e $60 \pm 5 \text{ \% UR}$). As linhas paralelas representam $\pm 10 \text{ \%}$ da concentração inicial.

Esta observação corrobora a necessidade de avaliação da eficácia dos produtos fitoterápicos relacionando-a com a sua estabilidade, sendo um importante parâmetro para a definição dos limites de confiança a serem estabelecidos para a determinação do período de vida útil destes produtos. Neste sentido, os ensaios farmacológicos são indispensáveis, sobretudo face à diversidade de comportamento dos constituintes químicos numa matriz complexa.

5.1.3 Estabilidade do PS40 frente à luz UV-C

Para a avaliação da estabilidade do PS40 frente à luz, as amostras foram acondicionadas em frascos de vidro transparente, frascos de vidro âmbar e sobre vidro de relógio e submetidas à radiação UV-C (Light express LE UV, 254 nm, 30 W), durante 48 horas.

As características sensoriais observadas durante o estudo da estabilidade do PS40 frente à luz são apresentadas na Tabela 13.

Tabela 13 – Características sensoriais do PS40, antes e após exposição à radiação UV-C (Light express LE UV, 254 nm, 30 W)

Tempo (horas)	Acondicionamento		
	Frasco âmbar	Frasco Transparente	Vidro de relógio
Início	Pó fino Odor característico Amarelo claro	Pó fino Odor característico Amarelo claro	Pó fino Odor característico Amarelo claro
48 horas	Pó fino Odor característico Amarelo claro	Pó fino Odor característico Amarelo claro	Pó fino Odor característico Amarelo claro

As características sensoriais do PS40 mantiveram-se inalteradas durante todo o período do experimento.

Durante o estudo da estabilidade do PS40 frente à luz foi determinada a perda por dessecação, sendo os resultados apresentados na Tabela 14.

Tabela 14 – Perda por dessecação do PS40, antes e após ter sido submetido à radiação UV-C (Light express LE UV, 254 nm, 30 W).

Tempo (horas)	Perda por dessecação (% m/m)		
	Frasco âmbar	Frasco Transparente	Vidro de relógio
Início	4,71	4,71	4,71
48	4,87	4,57	2,77

Foram observadas alterações na perda por dessecação de acordo com o tipo de acondicionamento. Para as amostras armazenadas em frasco de vidro âmbar observou-se pequena variação, de 4,71 % a 4,87 %, para as amostras em frasco de vidro transparente de 4,71 % a 4,57 % e para as amostras expostas em vidro de relógio a variação foi maior, de 4,71 % a 2,77 %. Estes resultados demonstram que o acondicionamento em frascos de vidro âmbar ou transparente foram eficientes para proteger o produto nas condições descritas.

A concentração dos constituintes fenólicos presentes em PS40 nas amostras acondicionadas em frascos de vidro âmbar ou transparente manteve-se estável durante o tempo de exposição à luz, 48 horas (Figura 20 e Tabela 15).

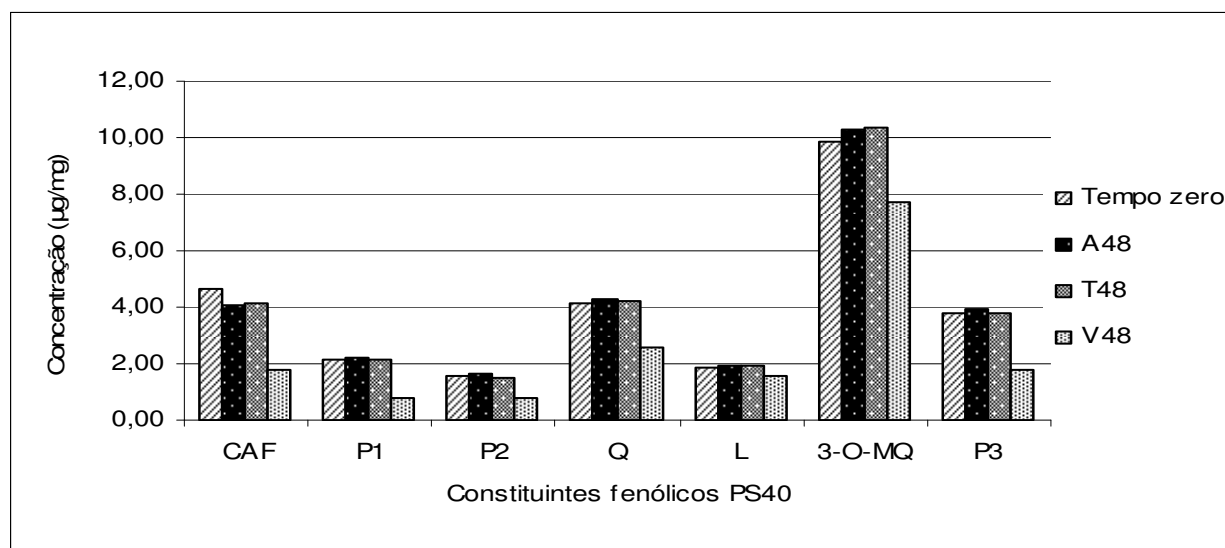


Figura 20 – Constituintes fenólicos de produto seco de *Achyrocline saturoioides*, PS40, antes e após exposição à radiação UV-C (Light express LE UV, 254 nm, 30W) por 48 horas (CAF = ácido caféico; Q = quercetina; L = luteolina; 3-O-MQ = 3-O-metilquercetina; P1, P2 e P3 substâncias não identificadas. A = frasco âmbar, T = frasco transparente e V = vidro de relógio).

Tabela 15 – Constituintes fenólicos do produto seco de *Achyrocline satureioides* PS40 em teste de estabilidade frente à luz UV-C, por 48 horas.

Substância	início		48 h	
	C (ug/mg)	DPR %	C %	DPR %
CAFA	3,18	1,34	88,76	1,76
CAFT	3,18	1,34	90,28	2,06
CAFV	3,18	1,34	38,48	3,93
P1A	1,51	1,10	102,04	0,32
P1T	1,51	1,10	100,47	0,67
P1V	1,51	1,10	35,21	10,33
P2A	1,12	0,37	102,22	2,53
P2T	1,12	0,37	93,52	0,46
P2V	1,12	0,37	50,51	0,99
QA	4,09	0,16	102,54	0,25
QT	4,09	0,16	101,69	0,27
QV	4,09	0,16	61,83	0,16
LA	1,62	0,73	105,80	0,78
LT	1,62	0,73	106,67	0,80
LV	1,62	0,73	85,65	0,18
3-O-MQA	9,19	0,69	104,53	0,35
3-O-MQT	9,19	0,69	104,66	0,58
3-O-MQV	9,19	0,69	78,04	0,04
P3A	3,95	0,68	103,18	0,47
P3T	3,95	0,68	98,95	0,70
P3V	3,95	0,68	47,41	0,45

Concentração inicial (C ug/mg), concentração percentual (C %) e desvio padrão relativo (DPR %) CAF = ác. caféico L = luteolina, Q = quercetina, 3-O-MQ = 3-O-metilquercetina; substâncias não identificadas P1, P2, e P3; A = frasco âmbar, T = frasco transparente e V = vidro de relógio.

Para as amostras expostas à radiação UV-C, em vidro de relógio, observa-se expressiva redução da concentração destes constituintes, especialmente do ácido caféico, P1, P2, quercetina, 3-O-metilquercetina e P3 (Figura 20). A luteolina demonstrou estabilidade frente à luz UV-C.

No entanto, frascos de vidro âmbar ou transparente foram eficientes para proteger todos os constituintes presentes no PS40, durante 48 horas de exposição à luz UV-C.

A Figura 21 apresenta o comportamento individual de cada um dos constituintes fenólicos e os limites de $\pm 10\%$ de sua concentração inicial. À exceção da luteolina, ao final de 48 horas de exposição em vidro de relógio, todos os constituintes tiveram sua concentração reduzida em mais de 10%.

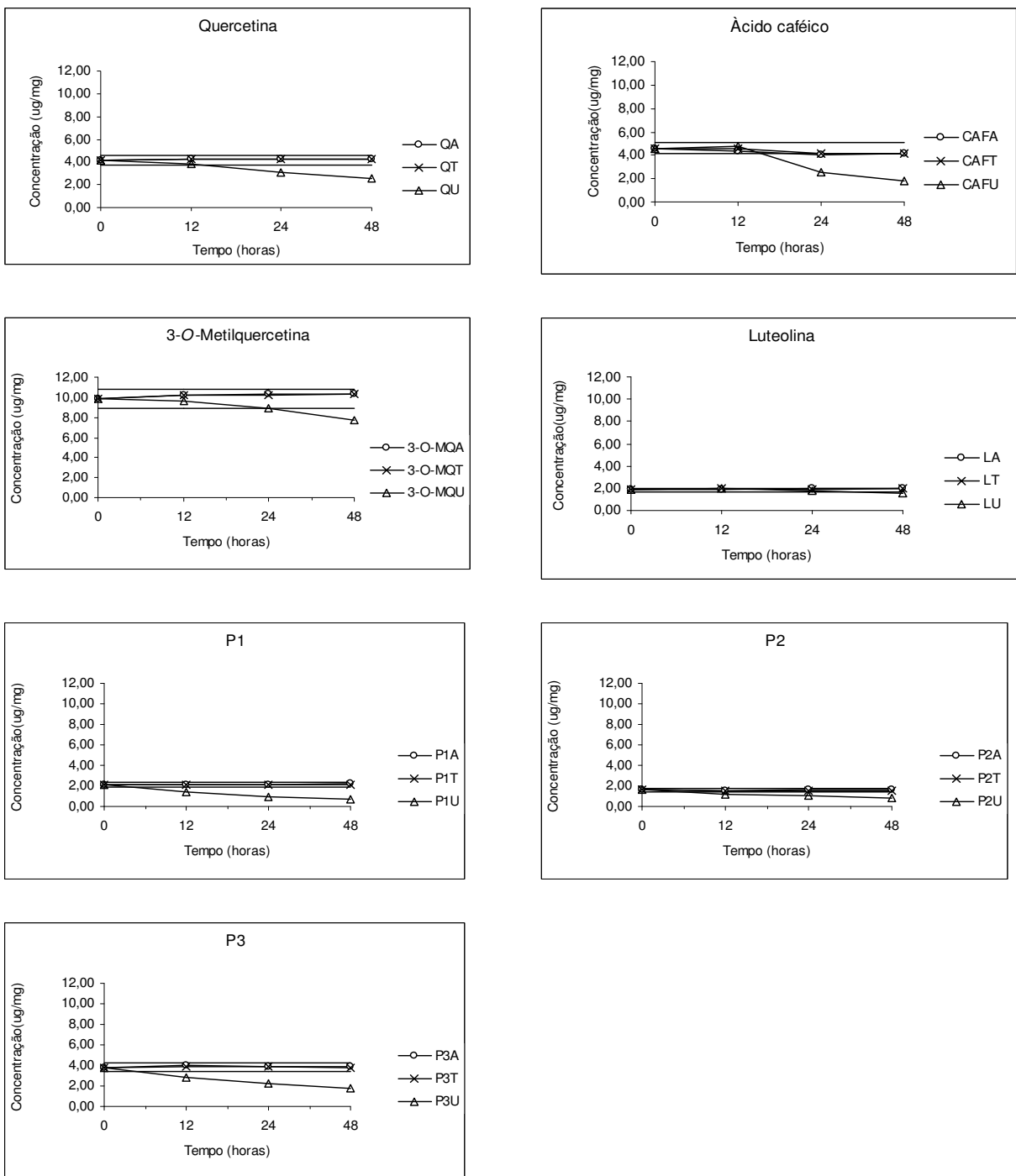


Figura 21 - Constituintes fenólicos de produto seco de *Achyrocline satureioides*, PS40, antes e após ter sido submetido à radiação UV-C (Light express LE UV, 254 nm, 30 W), por 48 horas, (CAF = ácido caféico; Q = quercetina; L = luteolina; 3-O-MQ = 3-O-metilquercetina; P1, P2 and P3 substâncias não identificadas. A = frasco âmbar, T = frasco transparente e U = vidro de relógio).

5.1.4 Avaliação da atividade antiinflamatória - PS40

Diversos estudos demonstram atividade antiedematogênica de *Achyrocline satureioides* pelo método do edema de pata de rato induzido por carragenina (SONAGLIO, 1987; SIMÕES *et al.*, 1988, BASSANI *et al.*, 1990; TEIXEIRA, 1996, De SOUZA *et al.*, 2007).

A atividade antiinflamatória do PS40 foi comparada à apresentada pelo PS40 submetido previamente à temperatura de 80 °C, durante dois dias, o qual foi designado PS40+. A composição de PS40 e PS40+ é apresentada na Tabela 16.

Tabela 16 – Concentração dos constituintes fenólicos presentes em PS40 e PS40+ (80 °C/ 2 dias). CAF= ác. caféico, L = luteolina, Q = quercetina, 3-O-MQ = 3-O-metilquercetina; substâncias não identificadas P1, P2, e P3.

Polifenóis	Concentração (µg/mg)	
	PS40	PS40+
CAF	3,18	0
P1	1,51	1,6
P2	1,12	1,18
Q	4,09	6,55
L	1,62	1,54
3-O-MQ	9,19	9,01
P3	3,95	1,48

PS40 e PS40+ continham respectivamente, 4,09 µg/mg e 6,55 µg/mg de quercetina e foram administrados via oral, na mesma concentração de 500 mg/kg.

Cada grupo experimental de oito animais foi tratado *p.o.* com os dois produtos da seguinte forma: PS40 e PS40+ (500 mg/kg), o grupo controle negativo tratado com produto seco obtido a partir dos adjuvantes de secagem (250 mg/kg) e grupo controle positivo tratado com indometacina, na dose de 10 mg/kg (*p.o.*). A formação e conseqüente inibição do edema foi medida pelo volume de líquido deslocado pela imersão da pata do animal através do método pletismográfico, comparando-se o grupo controle negativo com os demais.

Todos os produtos foram dispersos em solução salina e administrados oralmente. Os resultados estão apresentados na Tabela 17. A análise estatística foi realizada pelo teste “t” de *Student*.

Tabela 17 - Efeito do PS40 e PS40+ (500 mg/kg), sobre o edema de pata de rato induzido por carragenina. Controle negativo, adjuvantes de secagem (250 mg/kg) e controle positivo, indometacina (10 mg/kg).

Tratamento	Formação de edema ± e.p.m. (% inibição).			
	1h	2h	3h	4h
Controle -	0,69 ± 0,11	1,24 ± 0,44	0,99 ± 0,26	1,72 ± 0,11
Controle +	0,49 ± 0,29 (28,99)	0,79 ± 0,29 (36,29)	0,76 ± 0,29 (23,23)	0,69 ± 0,25 (59,88)*
PS 40	0,74 ± 0,23 (-7,25)	0,87 ± 0,27 (29,84)	0,68 ± 0,18 (31,31)	0,68 ± 0,22 (60,47)*
PS 40+	0,39 ± 0,11 (43,48)	0,49 ± 0,15 (60,48)	0,38 ± 0,11 (61,62)**	0,54 ± 0,18 (68,60)*

* p < 0,01 e ** p < 0,05 teste-t de *Student*.

Observa-se que ambos os produtos secos inibiram a formação de edema, sendo que o PS40 apresentou inibição de 29,84 % na segunda hora alcançando 60,47 % na quarta hora, quando demonstra diferença significativa (p < 0,01) em relação ao controle negativo. Por sua vez, o PS40+ apresentou já na primeira hora inibição de 43,48 %, a qual foi crescente, alcançando 68,60 % na quarta hora, sendo que na terceira hora com inibição de 61,62 % demonstrou diferença significativa (p < 0,05) em relação ao controle negativo e também em relação ao controle positivo (Tabela 17).

Na quarta hora, o controle positivo, o grupo tratado PS40 e o grupo tratado PS40+ apresentaram diferença significativa (p < 0,01) em relação ao grupo controle negativo (Tabela 17).

5.2 Avaliação da estabilidade do PS80

5.2.1 Método Analítico

O cromatograma obtido por cromatografia líquida de alta eficiência das amostras de PS80 (Figura 22) demonstrou boa resolução entre os picos, reproduzindo o perfil cromatográfico por De Souza, 2002. Observam-se os picos de Quercetina (Q), Luteolina (L) e 3-O-metilquercetina (3-O-MQ), bem como de outras cinco substâncias, denominadas P4, P5ab, P6, P7 e P8 (Figura 22 e Tabela 18).

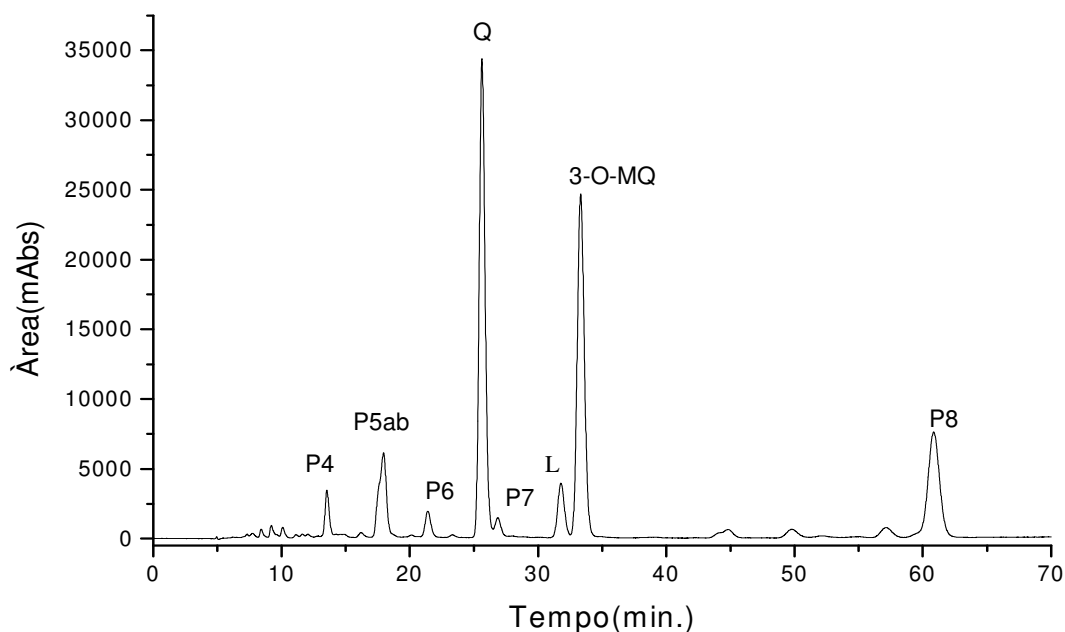


Figura 22 – Cromatograma (CLAE) típico do PS80, coluna Shim-pack CLC-ODS (M) RP-18, fase móvel metanol:ácido fosfórico 0,16 M (53:47 v:v), fluxo 0,6 mL/min e detecção em 362 nm. Q = quercetina, L = luteolina, 3-O-MQ = 3-O-metilquercetina, P4, P5ab, P6, P7 e P8 = substâncias não identificadas.

Os espectros no UV correspondente às substâncias eluídas neste sistema foram obtidos pela detecção em arranjo de fotodiodos, sendo os comprimentos de onda de absorção máximas sumarizados na Tabela 18.

Tabela 18 – Substâncias presentes no cromatograma do PS 80 (fingerprint), seus tempos de retenção, comprimentos de onda de absorção máxima e concentração inicial ($\mu\text{g}/\text{mg}$).

Substâncias	Tempo de retenção (min)	$\lambda_{\text{máx.}}$ (nm)	Identidade	Concentração Inicial ($\mu\text{g}/\text{mg}$)
P4	13,42	209.4;251.8;364.6	não definida	1,94
P5a	17,80	209.4;369.4	não definida	4,82
P5b	17,80	214.1;356.5	não definida	4,82
P6	21,22	209.4;251.8;266.0;351.7	não definida	1,68
Q*	25,37	209.4;256.6;374.2	Quercetina	18,46
P7	26,64	360.6	não definida	1,45
L*	31,41	209.4;256.6;351.7	Luteolina	2,8
3-O-MQ*	32,95	209.4;256.6;360.6	3-O-metilquercetina	42,52
P8	59,76	209.4;369.4	não definida	8,38

Coluna *Shim-pack* CLC-ODS (M) RP-18, fase móvel metanol:ácido fosfórico 0,16 M (53:47 v:v) fluxo 0,6 mL/min e espectro obtido por detecção em arranjo de fotodiodos (Waters Alliance), 200-400 nm.

* substâncias identificadas por co-eluição com substâncias de referência.

A co-eluição com substâncias de referência, bem como a análise dos espectros das substâncias presentes no cromatograma (Figura 22 e Tabela 18), PS80, indicam a presença dos marcadores quercetina com tempo de retenção de 25,37 minutos, luteolina com tempo de retenção de 31,41 e 3-O-metilquercetina com tempo de retenção de 32,95.

Além destes estão presentes as substâncias não identificadas correspondentes aos picos P4, P5ab, P6, P7 e P8. O pico P5 apresentou dois espectros diferenciados, com tempo de retenção de 17,80 minutos, indicando a presença de duas substâncias, que foram nominadas como P5a e P5b e quantificadas de forma conjunta como P5ab, ambos os espectros apresentam característica de chalcona, com predominância da Banda I referente ao anel B. A substância correspondente ao pico P8 ($k'=8,88$) presente no PS80 apresenta, correlação de k' e espectros de absorção no ultravioleta com a substância P3 ($k'=8,75$) presente no PS40 (Anexo I). A análise, em equipamento com detecção por arranjo de fotodiodos, de solução contendo PS40 adicionado de PS80 e de soluções de PS40 e PS80 injetadas concomitantemente revelaram a sobreposição dos picos de P3 (PS40) e P8 (PS80), como pode ser observado na Figura 23.

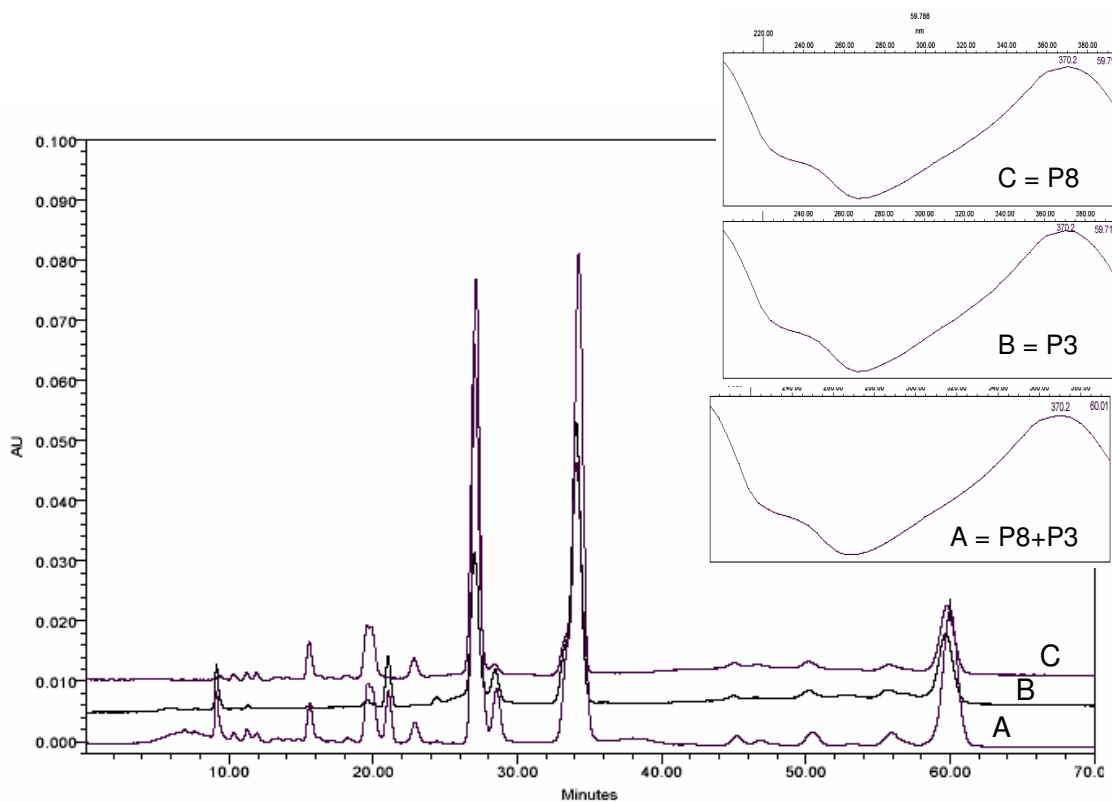


Figura 23 – Cromatogramas de PS40 adicionado de PS80 (A), PS40 (B) e PS80 (C), com respectivos espectros de absorção no ultravioleta das substâncias P3+P8 (PS40+PS80), P3 (PS40) e P8 (PS80). Coluna Shim-pack CLC-ODS (M) RP-18, fase móvel metanol:ácido fosfórico 0,16 M (53:47 v:v) fluxo 0,6 mL/min e espectro obtido por detecção em arranjo de fotodiodos (Waters Alliance), 200-400 nm.

Foram ainda detectados P4 e P6 sem identidade definida, e com espectros característicos de substâncias com núcleo flavonoídico, com presença das Bandas I e II referentes aos anéis B e A, respectivamente. Os espectros correspondentes podem ser observados na Figura 24

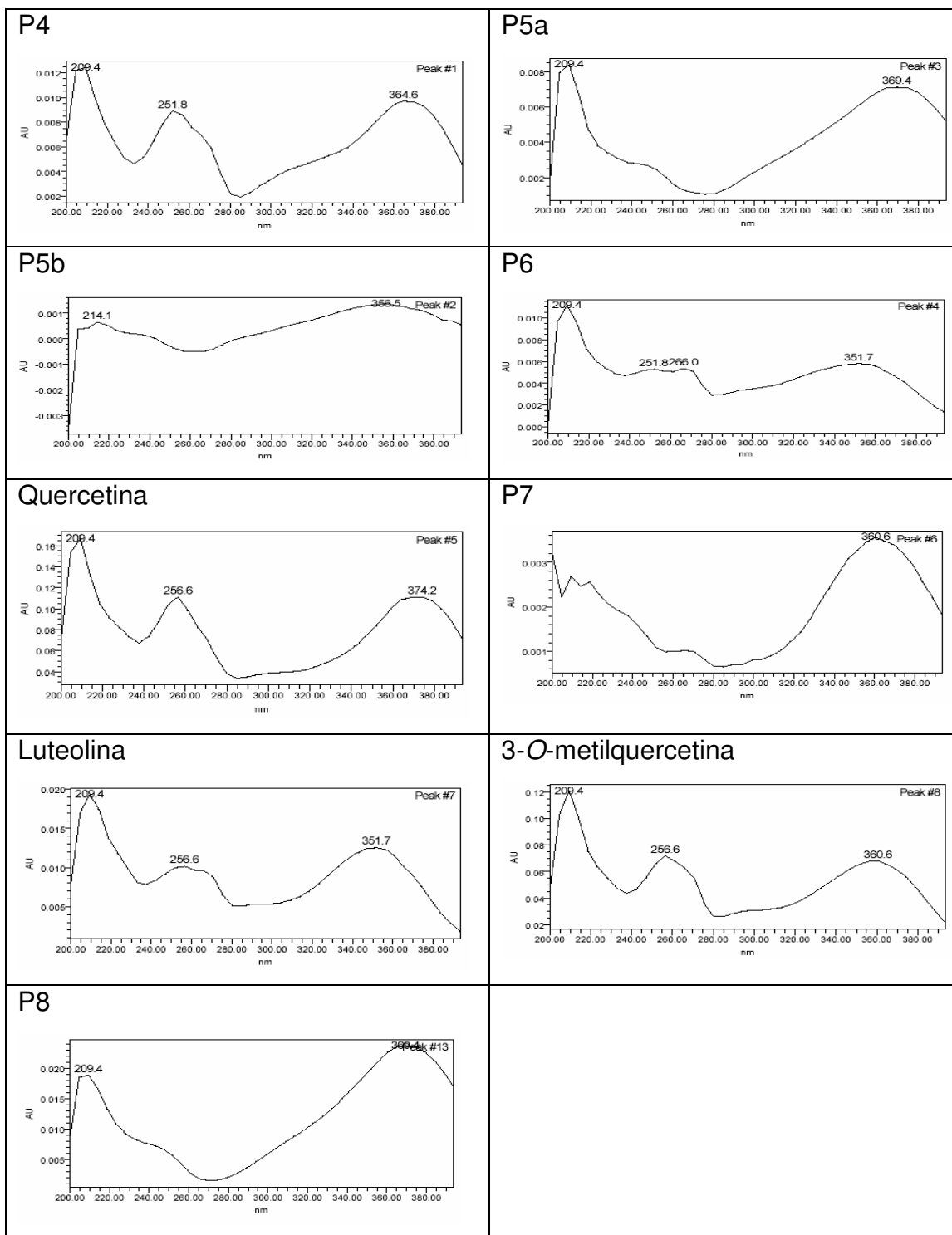


Figura 24 – Espectros de absorção no ultravioleta das substâncias presentes no cromatograma do PS80 e seus máximos de absorção. Coluna Shim-pack CLC-ODS (M) RP-18, fase móvel metanol:ácido fosfórico 0,16 M (53:47 v:v) fluxo 0,6 mL/min e espectro obtido por detecção em arranjo de fotodiodos (Waters Alliance), 200-400 nm.

As Figuras 25, 26 e 27 apresentam as curvas analíticas obtidas para as substâncias químicas de referência quercetina, luteolina e 3-O-metilquercetina bem como as correspondentes equações das retas obtidas por regressão linear.

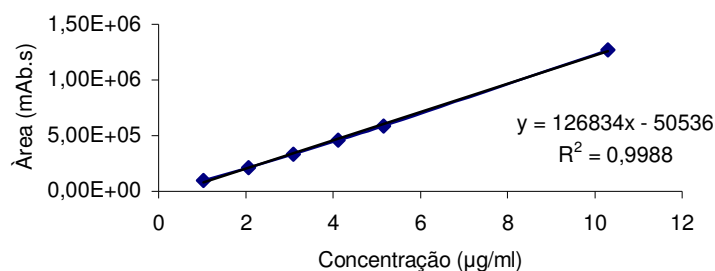


Figura 25 - Curva analítica de quercetina, coluna Shim-pack CLC-ODS (M) RP-18, fase móvel metanol:ácido fosfórico 0,16 M (53:47 v:v), fluxo 0,6 mL/min e detecção em 362 nm.

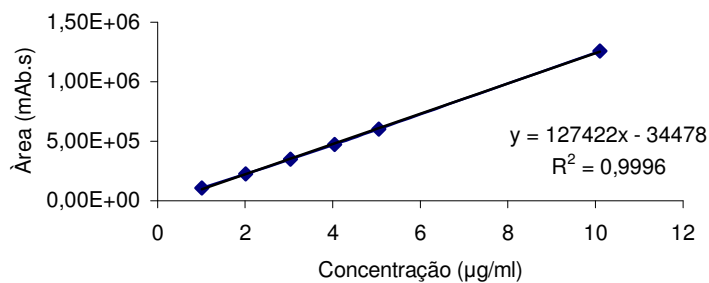


Figura 26 - Curva analítica de luteolina, coluna Shim-pack CLC-ODS (M) RP-18, fase móvel metanol:ácido fosfórico 0,16 M (53:47 v:v), fluxo 0,6 mL/min e detecção em 362 nm.

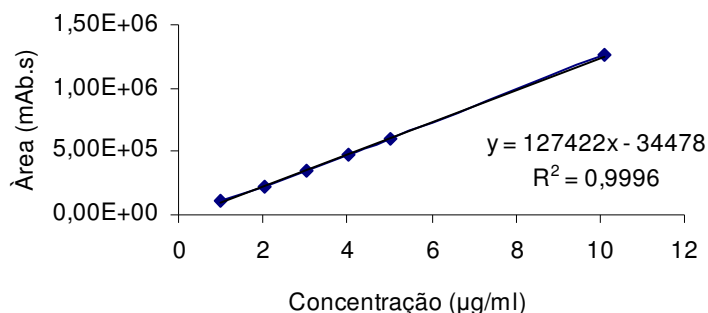


Figura 27 - Curva analítica de 3-O-metilquercetina, coluna Shim-pack CLC-ODS (M) RP-18, fase móvel metanol:ácido fosfórico 0,16 M (53:47 v:v), fluxo 0,6 mL/min e detecção em 362 nm.

Os coeficientes de regressão linear obtidos para as curvas padrão de quercetina, luteolina e 3-O-metilquercetina, respectivamente de 0,9988; 0,9996 e 0,9996 demonstram que o método apresenta relação linear entre as concentrações testadas e as áreas dos picos correspondentes, estando de acordo com a validação realizada por De Souza (2002).

5.2.2 Avaliação da estabilidade frente à temperatura – PS80

5.2.2.1 Teste de estresse do PS80 – temperatura 80 °C

O produto seco PS80, foi submetido à temperatura de 80 °C, em estufa, por um período de 14 dias, o mesmo foi armazenado em duas diferentes condições de acondicionamento, conforme descrito na seção 4.2.3.2.

No que se refere às características sensoriais (Tabela19) o PS80 apresentou-se como pó fino de coloração amarelo claro e odor característico, quando submetido à temperatura de 80 °C, durante 14 dias, acondicionado em frasco de vidro transparente. Para as amostras expostas em vidro de relógio nota-se alteração destas características a partir do sétimo dia, principalmente em relação ao odor que se tornou mais intenso, indicando processos de degradação (Tabela 19).

Tabela 19 – Características sensoriais do PS80, antes e após ter sido submetido à condição de estresse (80 °C/14 dias).

Tempo (dias)	Características sensoriais	
	Frasco Transparente	Vidro de relógio
Início	Pó fino Odor característico Amarelo claro	Pó fino Odor característico Amarelo claro
2 dias	Pó fino Odor característico Amarelo claro	Pó fino Odor característico Amarelo claro
5 dias	Pó fino Odor característico Amarelo claro	Pó fino Odor característico Amarelo claro
7 dias	Pó fino Odor característico Amarelo claro	Pó fino Odor intensificado Amarelo claro
14 dias	Pó fino Odor característico Amarelo claro	Pó fino Odor intensificado Amarelo claro

A perda por dessecação foi medida em amostras submetidas ao teste de estabilidade frente à temperatura de 80 °C, após exposição durante 2, 5, 7, e 14 dias, assim como no início do experimento. Os resultados podem ser visualizados na Tabela 20.

Tabela 20 – Perda por dessecação do PS80, antes e após ter sido submetido a condição de estresse (80 °C/14 dias).

Tempo (dias)	Perda por dessecação (% m/m)	
	Frasco Transparente	Vidro de relógio
Início	2,12	2,12
2	2,05	0,70
5	2,60	0,92
7	2,45	0,37
14	2,54	0,18

Observa-se maior perda de massa nas amostras acondicionadas vidro de relógio durante a exposição a 80 °C, por 14 dias. A perda por dessecação variou de 2,12 % inicial para 2,54 % em frasco transparente e para 0,18 % em vidro de relógio (Tabela 20).

Na figura 28 são apresentados os teores dos flavonóides quercetina, luteolina, 3-O-metilquercetina (calculados por meio das respectivas curvas analíticas), assim como as substâncias não identificadas correspondentes aos picos P4, P5ab, P6, P7 e P8 (calculados por meio da curva analítica da luteolina) medidas nas amostras submetidas à temperatura de 80 °C nos tempos 0,2, 5, 7 e 14 dias. Na tabela 19 são apresentadas as concentrações percentuais nos referidos tempos.

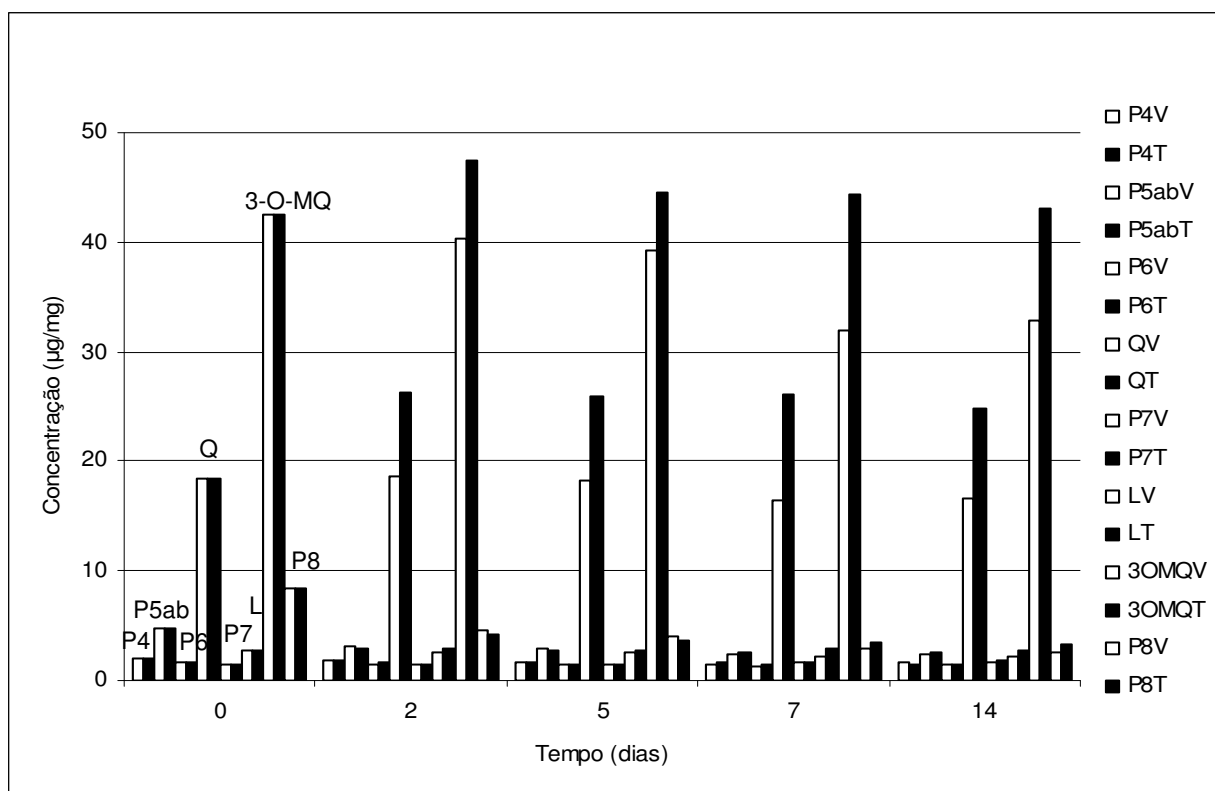


Figura 28 - Constituintes fenólicos de produto seco de *Achyrocline satureioides*, PS80, em teste de estresse em temperatura de 80 °C, durante 14 dias. Q = quercetina, L = luteolina, 3-O-MQ = 3-O-metilquercetina e substâncias não identificadas P4, P5ab, P6, P7, P8; T = frasco transparente e V = vidro de relógio.

A quantificação dos constituintes fenólicos no PS80 demonstrou, de forma geral, que as amostras acondicionadas em frasco de vidro transparente mantiveram-se mais estáveis, quando comparadas às amostras expostas ao calor em vidro de relógio.

Os flavonóides luteolina e 3-O-metilquercetina apresentaram comportamento estável durante os 14 dias do experimento, apresentando, ao final do teste,

respectivamente, teores de 99 % e 101 %, quando acondicionados em frasco de vidro transparente (Tabela 21 e Figura 28).

Tabela 21 – Constituintes fenólicos de produto seco de *Achyrocline satureioides*, PS80 em teste de estresse, temperatura de 80 °C, durante 14 dias.

Substância	Tempo (dias)									
	início		2		5		7		14	
	C % (µg/mg)	DPR %	C %	DPR %	C %	DPR %	C %	DPR %	C %	DPR %
P4V	1,94	1,12	90,83	4,85	87,37	0,85	78,64	7,15	80,33	8,42
P4T	1,94	1,12	90,70	3,20	83,06	0,79	80,90	8,14	76,25	1,38
P5abV	4,82	1,13	64,36	1,82	60,62	1,46	49,03	1,11	49,50	0,77
P5abT	4,82	1,13	61,35	1,69	56,29	1,34	54,54	1,20	52,81	1,49
P6V	1,68	0,67	91,35	1,96	89,16	0,75	80,71	0,80	83,46	3,12
P6T	1,68	0,67	94,78	2,19	89,82	0,74	87,47	0,85	84,56	0,59
QV	18,46	1,07	100,40	1,51	99,02	9,14	89,46	0,52	90,10	2,30
QT	18,46	1,07	142,28	0,96	140,50	12,79	141,18	0,26	134,68	0,33
P7V	1,45	4,68	102,74	5,72	97,73	0,71	116,55	1,53	113,10	1,22
P7T	1,45	4,68	106,39	6,91	101,45	0,73	116,55	7,51	126,21	12,11
LV	2,80	1,55	94,45	1,62	91,88	1,29	77,30	0,90	80,66	0,62
LT	2,80	1,55	106,07	3,83	100,76	1,39	101,28	0,94	99,72	3,80
3-O-MQV	42,52	0,74	94,68	1,75	92,43	7,21	75,00	1,11	77,26	0,19
3-O-MQT	42,52	0,74	111,64	1,94	104,82	8,04	104,21	0,09	101,46	0,56
P8V	8,38	4,23	55,31	2,83	47,81	2,00	34,83	1,89	31,52	1,23
P8T	8,38	4,23	50,85	2,64	43,01	1,78	42,03	0,52	39,00	0,74

Concentração inicial (C µg/mg), concentração percentual (C %) e desvio padrão relativo percentual (DPR %). Q = quercetina L = luteolina, 3-O-MQ = 3-O-metilquercetina, e substâncias não identificadas P4, P5ab, P6, P7, P8; T = frasco transparente e V = vidro de relógio.

De forma semelhante ao observado no PS40, a quercetina, no final do experimento, apresentou seu teor aumentado para 135 % (Tabela 21 e Figura 28). Similar comportamento foi observado para a substância correspondente ao pico P7, que alcançou 126 % da concentração inicial.

As substâncias não identificadas correspondentes aos picos P4, P5ab, P6 e P8 demonstraram comportamentos diversos frente à temperatura de 80 °C, chegando ao final do experimento com teores de 76 %, 53 %, 84 % e 39 % do inicial, respectivamente, quando acondicionadas em frasco transparente. Pode-se considerar P4 e P6 como de estabilidade intermediária e P5ab e P8 instáveis, mesmo quando estas amostras foram acondicionadas em frasco de vidro transparente (Tabela 21 e Figura 28).

5.2.2.2 Teste Acelerado – 40 °C ± 2 °C e 75 % ± 5 % UR – PS80

Este teste foi realizado conforme especificação da RE nº 1 (BRASIL, 2005). A temperatura em 40 ± 2 °C e umidade relativa de 75 ± 5 % foram as condições empregadas durante 6 meses, em câmara climática. O PS80 foi armazenado em frascos de vidro transparente. Foram realizadas análises nos tempos 0, 3 e 6 meses.

No teste acelerado, por 6 meses, o PS80 apresentou estabilidade com relação as suas características sensoriais, mantendo aparência, cor e odor inerentes ao produto no tempo de início do experimento (Tabela 22).

Tabela 22 – Características sensoriais do PS80, antes e durante o teste de estabilidade acelerado (40 °C ± 2 °C e 75 % ± 5 % UR), durante 3 meses.

Tempo (meses)	Características sensoriais
Início	Pó fino Odor característico Amarelo claro
3	Pó fino Odor característico Amarelo claro
6	Pó fino Odor característico Amarelo claro

No que se refere à perda por dessecação um acréscimo de, cerca de, 0,6 % (m/m) foi observado após 6 meses de exposição às condições do teste denotando baixa proteção do frasco ao produto em umidade elevada (75 % UR), Tabela 23.

Tabela 23 – Perda por dessecação do PS 80, antes e durante o teste de estabilidade acelerado ($40 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e $75 \% \pm 5 \% \text{ UR}$), durante 6 meses em frasco transparente.

Tempo (meses)	Perda por dessecação (% m/m)
Início	2,12
3	2,60
6	2,69

O teor dos constituintes fenólicos manteve-se estável para as substâncias de referência quercetina, luteolina e 3-O-metilquercetina que chegaram ao final do experimento com teores de 98 %, 100 % e 99 %, em relação ao inicial, respectivamente. Também as substâncias não identificadas P4, P6 e P7 mantiveram, ao final dos 6 meses, os teores de 100 %, 104 % e 105 %, respectivamente (Figura 29 e Tabela 24). As substâncias mais instáveis P8 e P5ab, chegaram ao final do experimento com 57 % e 62 % do teor inicial, respectivamente (Figura 29 e Tabela 24).

Tabela 24 – Constituintes fenólicos de produto seco de *Achyrocline satureioides*, PS80, em teste acelerado de estabilidade ($40 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e $75 \pm 5 \% \text{ UR}$), durante 6 meses.

Substância	Tempo (meses)					
	início		3		6	
	C ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	DPR %	C %	DPR %	C %	DPR %
P4	1,94	1,12	92,04	2,04	100,89	4,58
P5ab	4,82	1,13	67,83	1,31	61,88	2,63
P6	1,68	0,67	97,23	2,20	104,72	4,62
Q	18,46	1,07	101,44	2,86	98,12	4,16
P7	1,45	4,68	108,55	7,00	105,56	7,60
L	2,80	1,55	101,28	0,99	100,40	3,75
3-O-MQ	42,52	0,74	100,66	1,05	98,97	3,15
P8	8,38	4,23	60,88	3,68	56,84	2,06

Concentração inicial (C $\mu\text{g}/\text{mg}$), concentração percentual (C %) e desvio padrão relativo (DPR %) de Quercetina (Q), Luteolina (L), 3-O-metilquercetina (3-O-MQ) e substâncias não identificadas P4, P5ab, P6, P7, P8.

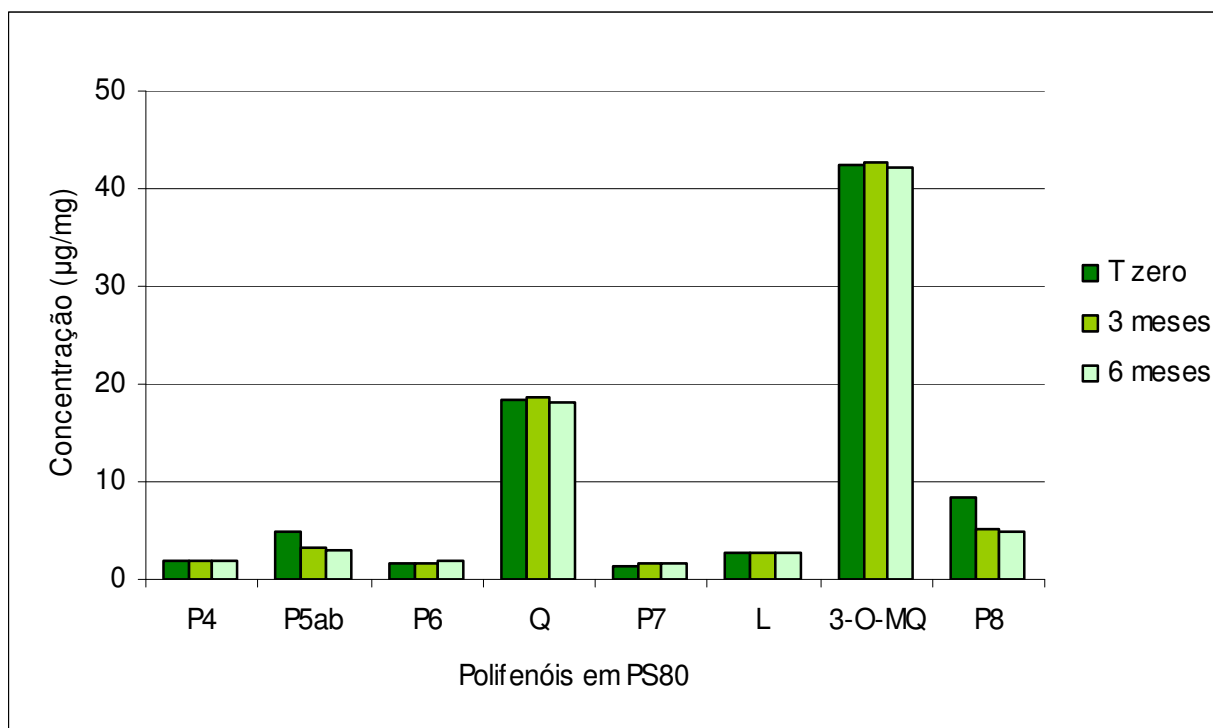


Figura 29 – Constituintes fenólicos de produto seco de *Achyrocline satureioides*, PS80, em teste acelerado de estabilidade ($40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $75\% \pm 5\%$ UR) durante 6 meses. Q = quercetina, L = luteolina, 3-O-MQ = 3-O-metilquercetina, P4, P5ab, P6, P7, P8 = substâncias não identificadas.

5.2.2.3 Teste de longa duração do PS80 – $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $75\% \pm 5\%$ UR

Este teste foi realizado conforme especificações definidas na Resolução – RE nº 1, de 29 de julho de 2005 (BRASIL, 2005). A temperatura em $30 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $75 \pm 5\%$ foram as condições empregadas durante 12 meses, em câmara climática Nova Ética modelo 420 CLD. O PS80 foi armazenado em frascos de vidro transparente. Foram realizadas análises nos tempos 0, 3, 6, 9 e 12 meses.

O PS80, quando submetido ao teste de longa duração, durante 12 meses, acondicionado em frasco de vidro transparente, não mostrou alteração em suas características sensoriais, como aparência cor e odor, mantendo-as idênticas às apresentadas no início do experimento (Tabela 25). O teor de umidade variou entre 2,12 % e 2,32 %, cerca de 0,2 %, demonstrando melhor proteção do tipo de acondicionamento empregado quando a temperatura é mais baixa ($30\text{ }^{\circ}\text{C}$),

comparativamente àquela propiciada pelo mesmo em 40 °C/75 % UR, comentado na seção 5.2.2.2.

Tabela 25 – Características sensoriais do PS80, antes e durante o teste de longa duração (30 ± 2 °C e 75 ± 5 % UR), por 12 meses.

Tempo (meses)	Características sensoriais
	Frasco Transparente
Início	Pó fino Odor característico Amarelo claro
3	Pó fino Odor característico Amarelo claro
6	Pó fino Odor característico Amarelo claro
9	Pó fino Odor característico Amarelo claro
12	Pó fino Odor característico Amarelo claro

Tabela 26 – Perda por dessecação do PS80, após ter sido submetido à temperatura de 30 ± 2 °C e 75 ± 5 % UR de umidade em câmara climática.

Tempo (meses)	Perda por dessecação (%)
	Frasco transparente
Início	2,12
3	2,32
6	3,17
9	2,50
12	2,32

No que se refere ao teor dos constituintes fenólicos (Figura 30) as substâncias de referência quercetina, luteolina e 3-O-metilquercetina mantiveram-se estáveis durante os 12 meses, apresentando ao final do experimento, com teores de 94 %, 99 % e 97 %, do inicial respectivamente. As substâncias não identificadas P4, P6 e P7 mantiveram-se estáveis, apresentando aumento de seus teores ao final do experimento, chegando a 110 %, 111 % e 108 %, respectivamente (Figura 30 e Tabela 27).

A semelhança do comportamento apresentado nos ensaios anteriores, as substâncias não identificadas, correspondentes aos picos P5ab e P8 demonstraram instabilidade chegando ao final do experimento com teores de 78 % e 63 %, respectivamente. Estes resultados estão apresentados na Figura 30 e Tabela 27.

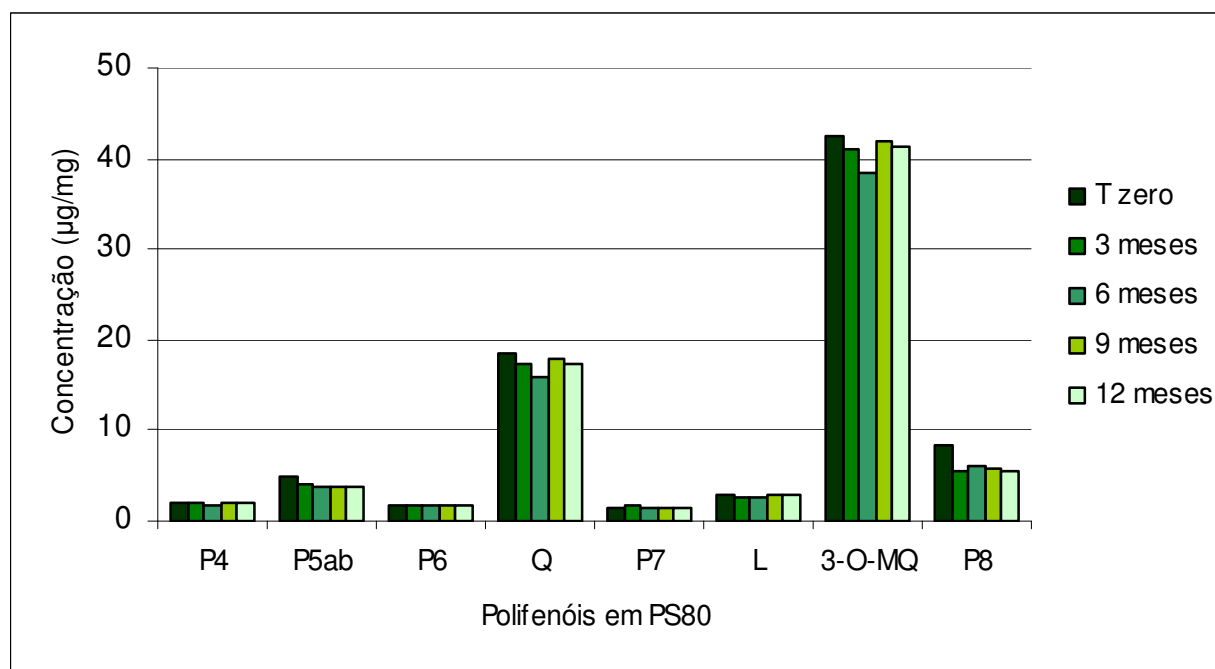


Figura 30 - Constituintes fenólicos de produto seco de *Achyrocline satureioides*, PS80, em teste de estabilidade de longa duração ($30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $75\text{ \%} \pm 5\text{ \% UR}$), por 12 meses. Quercetina (Q), Luteolina (L), 3-O-Metilquercetina (3-O-MQ) e substâncias não identificadas P4, P5ab, P6, P7, P8.

Tabela 27 – Constituintes fenólicos de produto seco de *Achyrocline satureioides*, PS80, em teste de estabilidade de longa duração do PS80 (30 ± 2 °C e 75 ± 5 % UR), por 12 meses.

Substância	Tempo (meses)									
	início		3		6		9		12	
	C ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	DPR %	C %	DPR %	C %	DPR %	C %	DPR %	C %	DPR %
P4	1,94	1,12	101,44	4,73	91,09	11,30	105,36	16,96	110,77	4,51
P5ab	4,82	1,13	84,73	3,06	79,97	7,90	78,90	5,13	78,46	1,90
P6	1,68	0,67	102,13	4,93	95,97	13,36	106,85	8,83	111,67	1,36
Q	18,46	1,07	93,32	0,75	86,77	8,69	96,86	1,61	94,11	1,28
P7	1,45	4,68	110,16	3,79	107,41	10,62	103,93	3,41	108,26	3,79
L	2,80	1,55	97,57	1,40	91,90	9,30	100,50	1,76	99,01	0,70
3-O-MQ	42,52	0,74	96,47	0,92	90,24	8,49	98,31	1,68	97,13	0,72
P8	8,38	4,23	65,91	2,42	71,05	6,26	68,22	2,12	63,98	2,40

Concentração inicial (C $\mu\text{g}/\text{mg}$), concentração percentual (C %) e desvio padrão relativo (DPR %) de Quercetina (Q), Luteolina (L), 3-O-Metilquercetina (3-O-MQ) e substâncias não identificadas P4, P5ab, P6, P7, P8.

5.2.3 Avaliação da estabilidade frente à luz – PS80

Para a avaliação da estabilidade do PS80 frente à luz, as amostras foram acondicionadas em frascos de vidro transparente, frascos de vidro âmbar e em vidro de relógio e submetidas à radiação UV-C durante 48 horas, conforme descrito na seção 4.2.4.2.

As características sensoriais do PS80 (Tabela 28) mantiveram-se inalteradas durante o período do experimento, apresentando suas características originais nas amostras acondicionadas em frascos de vidro âmbar ou transparente. No entanto, as amostras expostas em vidro de relógio apresentaram alterações de odor e, principalmente, de cor tornando-se muito clara.

Tabela 28 – Características sensoriais do PS80, antes e após ter sido submetido à radiação UV-C por 48 horas.

Tempo (horas)	Características sensoriais		
	Frasco âmbar	Frasco Transparente	Vidro de relógio
Início	Pó fino Odor característico Amarelo claro	Pó fino Odor característico Amarelo claro	Pó fino Odor característico Amarelo claro
48	Pó fino Odor característico Amarelo claro	Pó fino Odor característico Amarelo claro	Pó fino Odor degradação Amarelo pálido

Durante o estudo da estabilidade do PS80 frente à luz foi determinada a perda por dessecação. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 29.

Tabela 29 – Perda por dessecação do PS80, antes e após exposição à radiação UV-C, por 48 horas.

Tempo (horas)	Perda por dessecação (% m/m)		
	Frasco âmbar	Frasco Transparente	Vidro de relógio
Início	4,17	4,17	4,17
48	4,41	4,29	6,49

Foram observadas alterações na perda por dessecação de acordo com o tipo de acondicionamento. Para as amostras armazenadas em frasco de vidro âmbar observou-se variação de 4,17 % a 4,41 %, para as amostras em frasco de vidro transparente de 4,17 % a 4,29 % e para as amostras expostas em vidro de relógio a variação foi de 4,17 % a 6,49 % (Tabela 29). Estes resultados demonstram que o acondicionamento em frascos de vidro âmbar ou transparente foram eficientes para proteger o produto frente à umidade, nas condições de armazenagem empregadas.

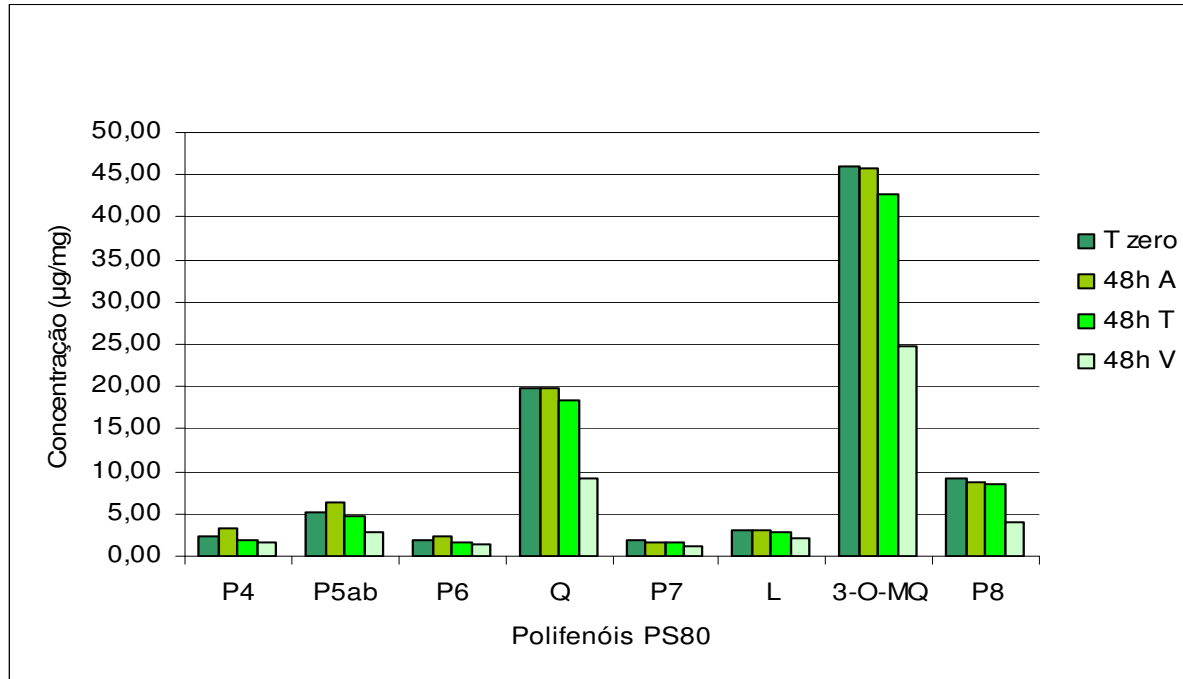


Figura 31 - Constituintes fenólicos de produto seco de *Achyrocline satureioides*, PS80, antes e após ter sido submetido à radiação UV-C (Light express LE UV, 254 nm, 30W) por 48 horas Q = quercetina; L = luteolina; 3-O-MQ = 3-O-metilquercetina; P4, P5ab, P6, P7 e P8 substâncias não identificadas. A = frasco âmbar, T = frasco transparente e VR = vidro de relógio.

No que se refere aos constituintes fenólicos presentes no PS80 nas amostras acondicionadas em frasco de vidro âmbar, a sua concentração manteve-se estável durante o tempo de exposição à luz, 48 horas (Figura 31 e Tabela 30). Em frascos de vidro transparente observa-se ligeira redução destes constituintes, especialmente quercetina, 3-O-metilquercetina, P5ab. Nas amostras expostas em vidro de relógio observa-se redução expressiva da concentração da maioria dos constituintes fenólicos, especialmente da quercetina, 3-O-metilquercetina, P5ab e P8 (Figura 31). A luteolina demonstrou alta estabilidade frente à luz UV-C, confirmando os resultados descritos anteriormente para o PS40. Também as substâncias P4, P6 e P7 apresentaram relativa estabilidade nestas condições.

Tabela 30 – Constituintes fenólicos do produto seco de *Achyrocline satureioides* PS40 em teste de estabilidade frente à luz UV-C, por 48 horas.

Substância	início		48 h	
	C (µg/mg)	DPR %	C %	DPR %
P4A	1,94	1,12	141,41	10,44
P4T	1,94	1,12	86,34	2,44
P4V	1,94	1,12	71,81	22,46
P5abA	4,82	1,13	122,96	0,84
P5abT	4,82	1,13	90,89	0,13
P5abV	4,82	1,13	51,99	1,05
P6A	1,68	0,67	123,44	0,47
P6T	1,68	0,67	90,63	0,41
P6V	1,68	0,67	73,96	0,26
QA	18,46	1,07	100,40	0,52
QT	18,46	1,07	93,39	0,16
QV	18,46	1,07	45,91	1,23
P7A	1,45	4,68	90,27	1,93
P7T	1,45	4,68	94,05	5,81
P7V	1,45	4,68	68,65	1,79
LA	2,80	1,55	100,33	0,47
LT	2,80	1,55	92,43	0,41
LV	2,80	1,55	70,07	0,26
3-O-MQA	42,52	0,74	99,59	0,43
3-O-MQT	42,52	0,74	93,09	0,26
3-O-MQV	42,52	0,74	53,79	0,33
P8A	8,38	4,23	92,98	2,51
P8T	8,38	4,23	91,36	2,33
P8V	8,38	4,23	42,44	1,92

Concentração inicial (C µg/mg), concentração percentual (C %) e desvio padrão relativo (DPR %) de Quercetina (Q), Luteolina (L), 3-O-Metilquercetina (3-O-MQ) e substâncias não identificadas P4, P5ab, P6, P7, P8. A=frasco âmbar, T=frasco transparente e V=vidro de relógio.

Os resultados do teste de fotoestabilidade do PS80 demonstraram que o produto é sensível à radiação UV-C quando exposto em vidro de relógio. No entanto, frascos de vidro âmbar ou transparente foram eficientes para proteger o PS40, durante 48 horas de exposição à luz UV-C.

5.3 Cinética de degradação das substâncias quercetina, luteolina, 3-O-metilquercetina e P8 presentes no PS80

Para avaliar a cinética de degradação dos principais constituintes fenólicos no PS80, quercetina, luteolina, 3-O-metilquercetina e P8, amostras de PS80 foram submetidas à temperatura de 80 °C (condições de estresse), por 49 dias ou à luz UV-C (254 nm), por 96h.

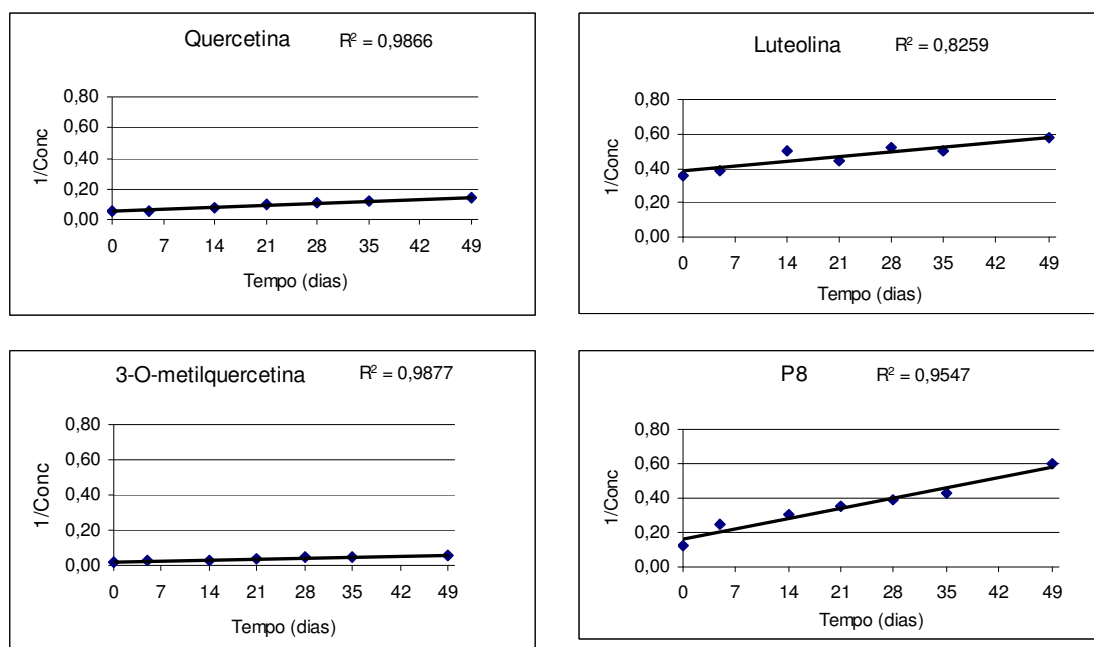


Figura 32 - Cinética de degradação térmica (80 °C) por 49 dias, correlação entre o inverso da concentração e o tempo de exposição de quercetina, luteolina, 3-O-metilquercetina e P8 presentes no PS80 submetido ao ensaio de (reação de segunda ordem).

A melhor correlação para as substâncias quercetina ($R^2 = 0,9866$), luteolina ($R^2 = 0,8259$), 3-*O*-metilquercetina ($R^2 = 0,9877$) e P8 ($R^2 = 0,9547$), foi obtida entre o inverso da concentração e o tempo de exposição ($1/C \times t$), quando o PS80 foi submetido ao ensaio cinético sob condições de estresse térmico (80 °C), por 49 dias indicando que a degradação destas substâncias segue reação de segunda ordem ou pseudo primeira ordem (Figura 32). As demais correlações encontram-se no Anexo II.

Utilizando equações relativas à cinética de degradação de segunda ordem foram calculados os seguintes parâmetros: constante de degradação (k), o tempo de meia-vida ($t_{0,5}$) e o tempo de degradação de 10% ($t_{10\%}$) para estas substâncias, presentes no PS80 (Tabela 31).

Tabela 31 - Parâmetros de cinética de degradação da quercetina, luteolina, 3-*O*-metilquercetina e P8 presentes no PS80, submetido à temperatura de 80 °C, calculados segundo as equações relativas a reação de segunda ordem.

Parâmetros de cinética de degradação			
Substâncias	k	$t_{0,5}$	$t_{10\%}$
Quercetina	$1,78 \times 10^{-3} \text{ d}^{-1}$	15,2 d	3,04 d
Luteolina	$4,42 \times 10^{-3} \text{ d}^{-1}$	40,34 d	8,06 d
3- <i>O</i> -metilquercetina	$6,61 \times 10^{-4} \text{ d}^{-1}$	17,79 d	3,55 d
P8	$9,81 \times 10^{-3} \text{ d}^{-1}$	6,07 d	1,21 d

*d = dia

Na avaliação da cinética de degradação do PS80 submetido ao ensaio cinético sob a radiação UV-C, por 96 horas, a melhor correlação para quercetina ($R^2 = 0,9640$), luteolina ($R^2 = 0,9672$), 3-*O*-metilquercetina ($R^2 = 0,9670$) e P8 ($R^2 = 0,9163$) em SDP80, foi obtida entre o logaritmo da concentração e o tempo de exposição ($\text{Log } C \times t$), indicando um perfil de reação de primeira ordem (Figura 33). As demais correlações encontram-se no Anexo II. Com equações relativas à cinética de degradação de primeira ordem foram calculados os seguintes parâmetros: constante de degradação (k), o tempo da meia-vida ($t_{0,5}$) e o tempo de degradação de 10% ($t_{10\%}$) para as substâncias presentes no PS80 (Tabela 32).

Tabela 32 - Parâmetros de cinética de degradação da quercetina, luteolina, 3-O-metilquercetina e P8 presentes no PS80, submetido à radiação UV-C por 96 horas, calculados segundo as equações relativas a reação de degradação de primeira ordem.

Parâmetros de cinética de degradação			
Substâncias	k	t _{0,5}	t _{10%}
Quercetina	$1,80 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$	38,36 h	5,75 h
Luteolina	$8,93 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$	77,59 h	11,64 h
3-O-metilquercetina	$1,49 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$	46,35 h	6,95 h
P8	$1,55 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$	44,54 h	6,68 h

* h = horas

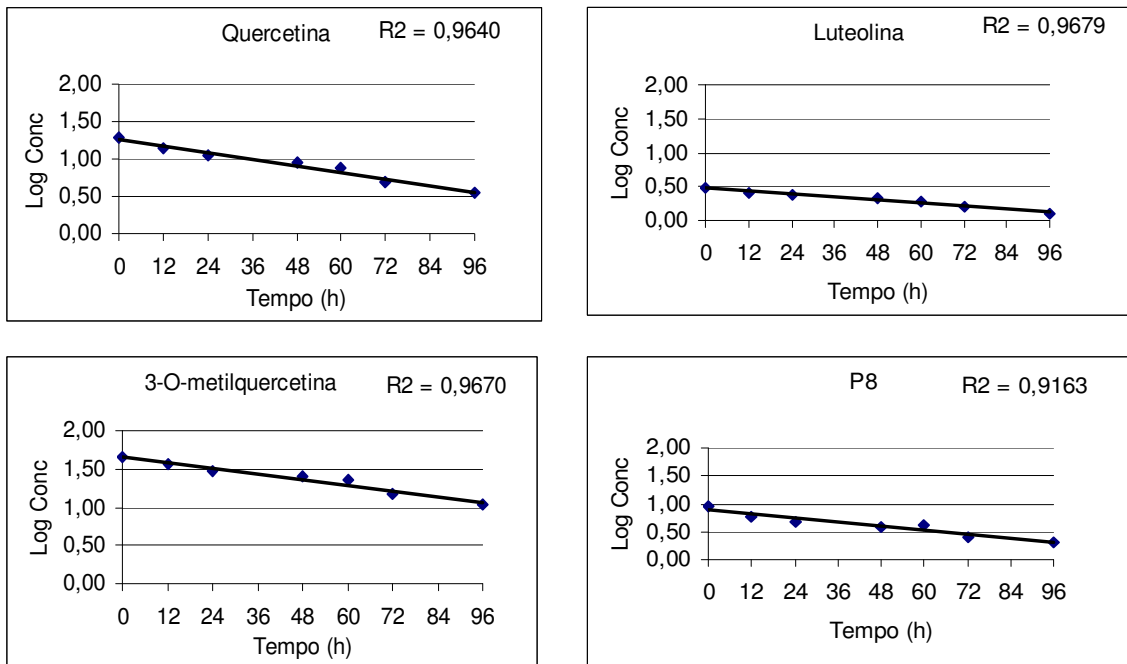


Figura 33 - Cinética de degradação sob radiação UV-C por 96 horas, correlação entre o logaritmo da concentração e o tempo de exposição de quercetina, luteolina, 3-O-metilquercetina e P8 presentes no PS80 submetido ao ensaio (reação de primeira ordem).

5. 4 Isolamento de substâncias fenólicas presentes em PS40 (P3, P1, P2 e 3-O-metilquercetina)

A observação, nos testes de estabilidade do PS40 a 80 °C, de que o aumento inicial da concentração de quercetina correspondia a um decréscimo na concentração da substância correspondente ao pico P3, sugeriu a investigação da identidade, desta última.

Baseado em seu tempo de retenção, em torno de 60 minutos, no sistema de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa, empregado na etapa analítica, optou-se por um sistema para cromatografia em coluna em fase normal, para seu isolamento. A substância nominada P3 foi eluída nas primeiras frações e na análise por cromatografia em camada delgada apresentou um $R_f=0,8$ com coloração amarelo vivo à luz natural e azul escuro no ultravioleta ($\lambda= 365 \text{ nm}$). Partindo-se de 0,5 g de PS40, obteve-se 8,5 mg do produto isolado, caracterizando um rendimento de 1,7 % (m/m). O mesmo foi analisado por CLAE, e sua pureza, verificada situando-se em torno de 97 %, Figura 34.

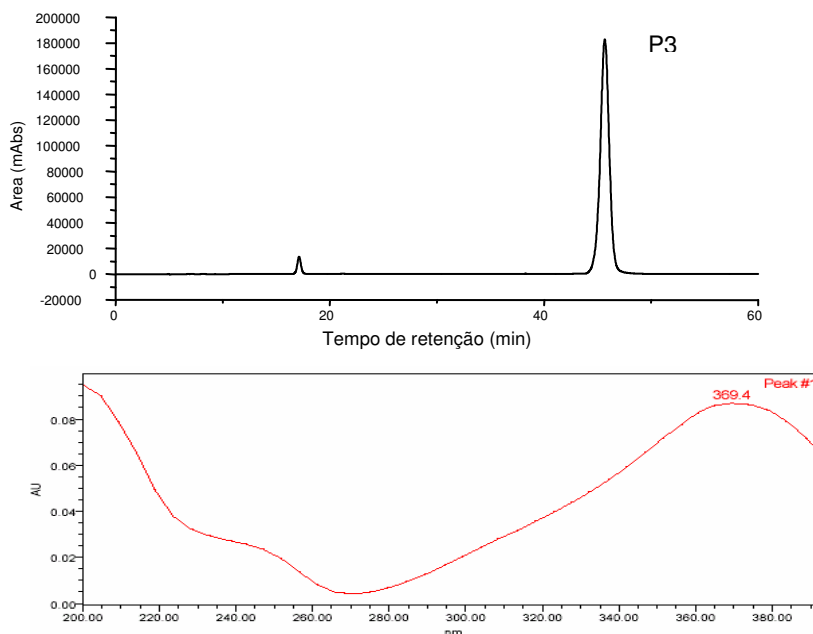


Figura 34 - Cromatograma (CLAE) da fração contendo a substância P3, obtida a partir de PS40. Coluna Shim-pack CLC-ODS (M) RP-18, fase móvel metanol:ácido fosfórico 0,16 M (53:47 v:v) fluxo 0,6 mL/min e espectro obtido por detecção no UV com arranjo de fotodiodos (Waters Alliance).

A identificação da 3-O-metilquercetina (Figura 37) foi feita por CLAE, conforme descrito em 4.2.5.3, utilizando equipamento com detecção por arranjo de fotodiodos e comparação do espectro com dados da literatura (De SOUZA *et al.*, 2002). As substâncias isoladas P1 e P2 (Figuras 35 e 36), foram também analisadas em aparelho de cromatografia líquida de alta eficiência equipado com detector por arranjo de fotodiodos. Os espectros no ultravioleta foram comparados aos espectros no ultravioleta das substâncias presentes no cromatograma do PS40 (Figura 10, seção 5.1.2.1), sendo coincidentes.

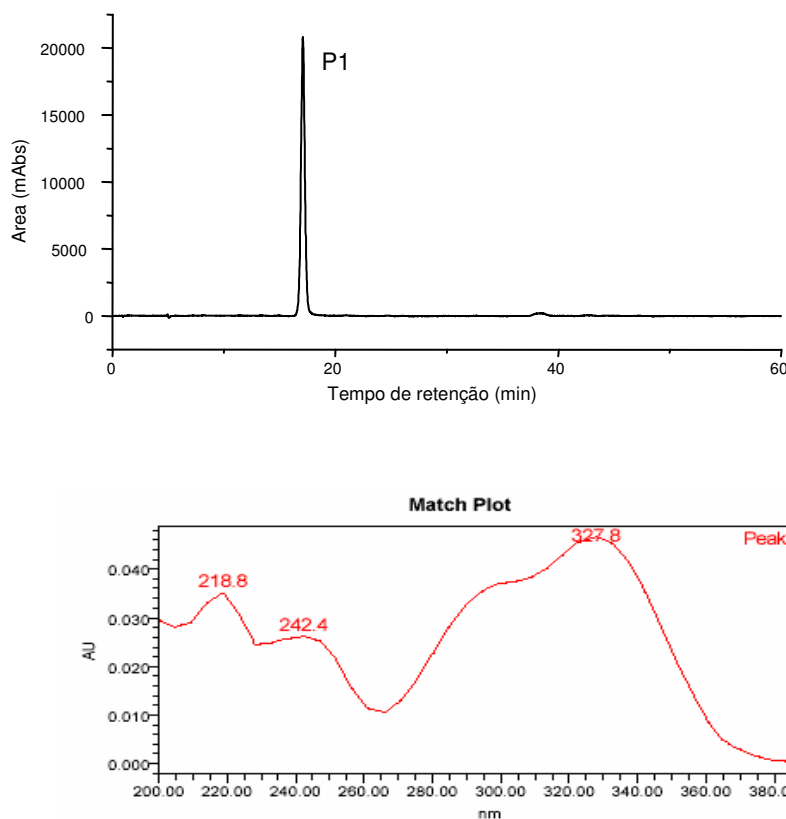


Figura 35 - Cromatograma (CLAE) da fração contendo a substância P1, obtida a partir de PS40. Coluna Shim-pack CLC-ODS (M) RP-18, fase móvel metanol:ácido fosfórico 0,16 M (53:47 v:v) fluxo 0,6 mL/min e espectro obtido por detecção no UV com arranjo de fotodiodos (Waters Alliance).

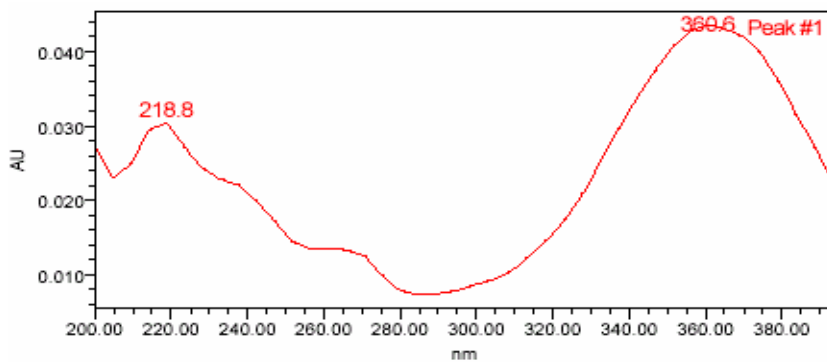
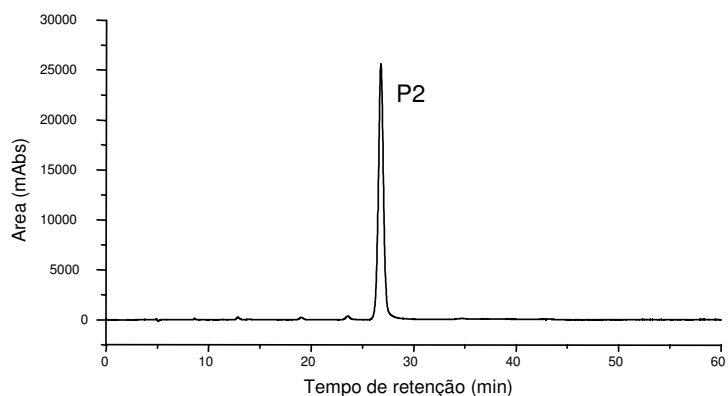


Figura 36 - Cromatograma (CLAE) da fração contendo a substância P2, obtida a partir de PS40. Coluna Shim-pack CLC-ODS (M) RP-18, fase móvel metanol:ácido fosfórico 0,16 M (53:47 v:v) fluxo 0,6 mL/min e espectro obtido por detecção no UV com arranjo de fotodiodos (Waters Alliance).

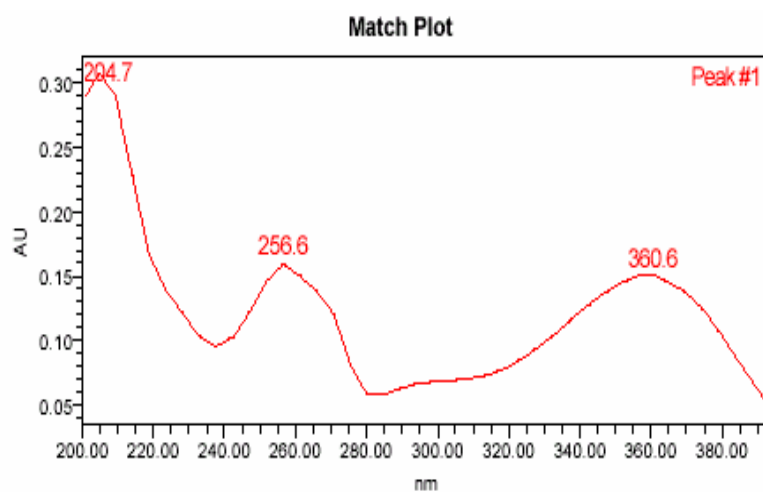
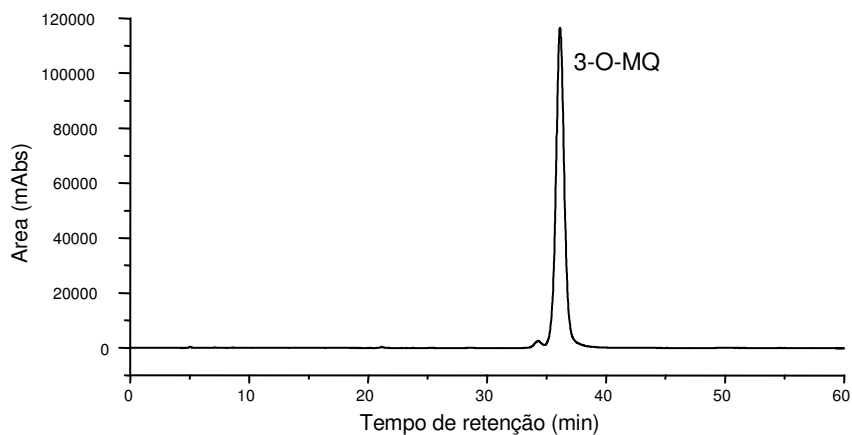


Figura 37 - Cromatograma (CLAE) da fração contendo a 3-O-metilquercetina, obtida a partir de PS40. Coluna Shim-pack CLC-ODS (M) RP-18, fase móvel metanol:ácido fosfórico 0,16 M (53:47 v:v) fluxo 0,6 mL/min e espectro obtido por detecção no UV em arranjo de fotodiodos (Waters Alliance).

O isolamento dos constituintes não identificados P1, P2 e P3 representa um primeiro passo para sua identificação, aspecto de interesse para o controle de qualidade de produtos tecnologicamente obtidos, bem como da matéria-prima

Achyrocline satureioides, além de contribuir de forma expressiva para o aprofundamento dos estudos da estabilidade.

5.5 Isolamento e identificação substâncias presentes no PS80

Esta parte do trabalho foi realizada na Unidade de Proteômica, do Instituto de Biotecnologia, da Universidade Nacional Autônoma do México, Campus Cuernavaca, México, em colaboração com os professores Dr. César V. F. Batista e Dr. Lourival Possani.

A técnica de análise de compostos naturais por espectrometria de massas tem sido uma ferramenta muito útil no auxílio à identificação dos mesmos, especialmente quando associada à cromatografia líquida de alta eficiência. Para a análise dos compostos presentes no PS80 os mesmos foram isolados por CLAE conforme descrito em 4.2.5.3, utilizando ácido trifluoracético 0,1 % (TFA), em substituição ao ácido fosfórico 0,16 M na fase móvel. As amostras foram diretamente aplicadas no espectrômetro de massas com captura de íons Finnigan LCQ^{DUO} (San Jose, CA) com sistema controlador de solvente Surveyor MS, conforme descrito na seção 4.2.7. Os espectros de massas obtidos a partir das substâncias isoladas do PS80, quercetina, luteolina e 3-O-metilquercetina são apresentados, nas Figuras 38, 39 e 40, respectivamente.

O espectro de massas relativo à quercetina (Figura 38) apresenta fragmentação característica da substância, onde se observa o íon molecular m/z 303 $[M+H]^+$ referente à massa molecular da substância, o pico base m/z 229 representando a perda de $C_4=O$ e C_3-OH fragmento m/z 247, associado à saída de H_2O fragmento m/z 285, demonstrando a presença de hidroxilas vicinais no anel B, que também aparece no fragmento m/z 257 quando a perda de H_2O está associada à saída de $C_4=O$. Outros fragmentos como m/z 165, m/z 153 e m/z 137 caracterizam as rupturas que ocorrem no anel C (WU *et al.* 2004; ES-SAFI *et al.*, 2005; MARCH *et al.*, 2006).

A luteolina apresenta em seu espectro (Figura 39) além do íon molecular m/z 287 $[M+H]^+$, referente à massa molecular da substância, o pico base m/z 167 que

caracteriza um tipo de rearranjo retro-Diels-Alder (RDA) que ocorre no anel C também são observados os fragmentos m/z 153 e m/z 137 referentes a outras rupturas que ocorrem no anel C. O fragmento m/z 259 refere-se à perda de $C_4=O$ e o fragmento m/z 178 à ruptura entre os anéis B e C e o fragmento m/z 217 pode ser atribuído à ruptura do anel A (WU *et al.* 2004; ES-SAFI *et al.*, 2005)

O espectro de massas da 3-O-metilquercetina (Figura 40) evidencia a substância com o íon molecular m/z 317 $[M+H]^+$ e o pico base m/z 302 representando a perda de $-CH_3$ característica da estrutura. O fragmento m/z 285 associa à perda de $-CH_3$ a saída de H_2O do anel B. Já o fragmento m/z 274 pode estar associado à saída de C_3-O-CH_3 .

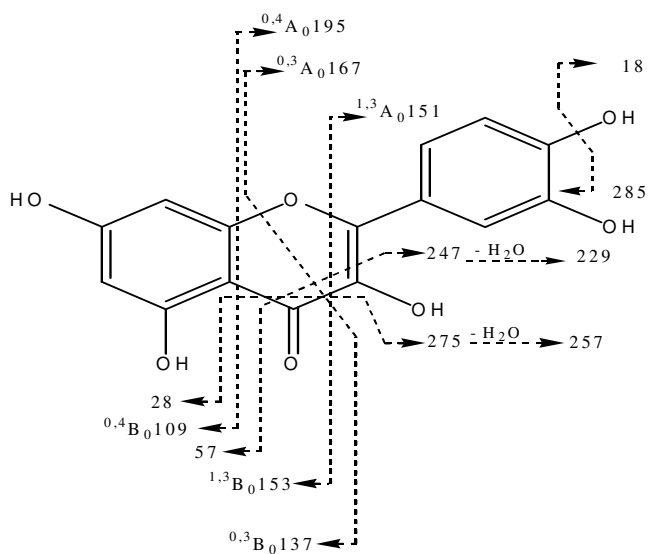
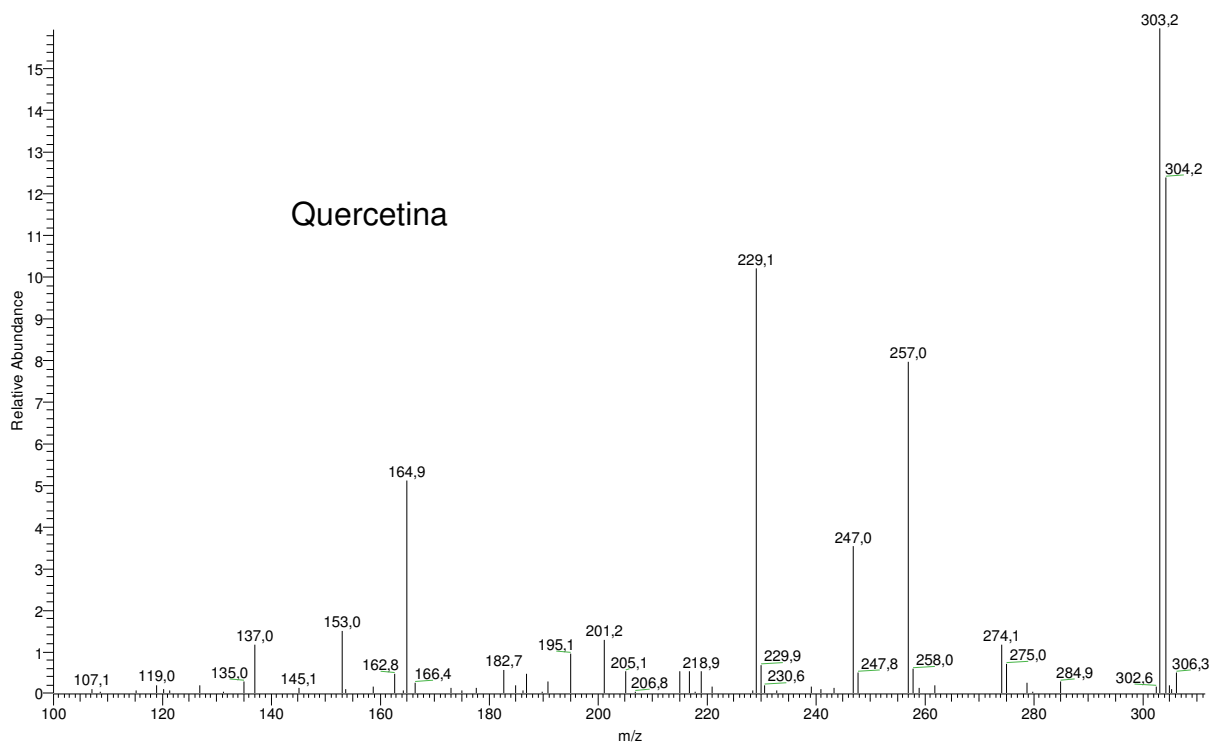


Figura 38 – Espectro de massas do pico correspondente à quercetina, isolada de PS80, obtido por sistema de espectrometria de massas – ionização por spray de elétrons e principais fragmentações.

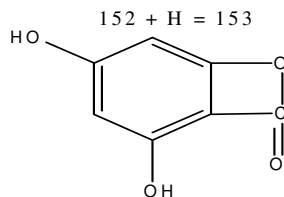
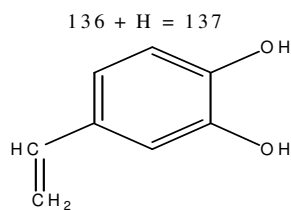
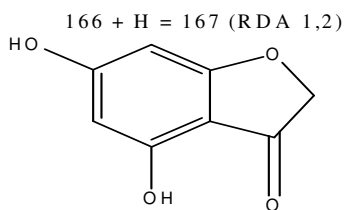
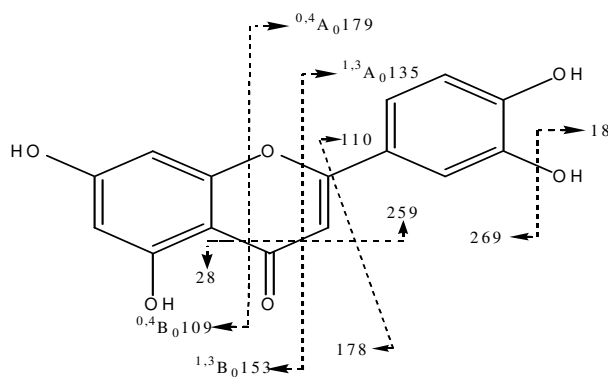
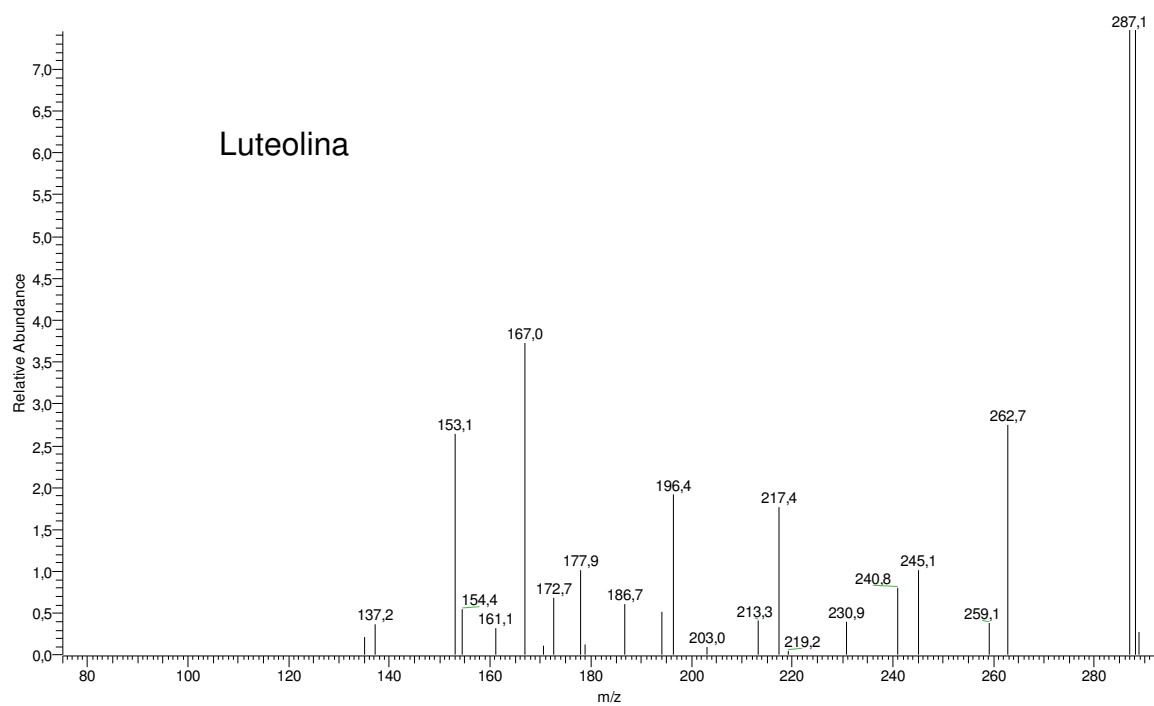


Figura 39 – Espectro de massas do pico correspondente à luteolina, isolada de PS80, obtido por sistema de espectrometria de massas – ionização por spray de elétrons e principais fragmentações.

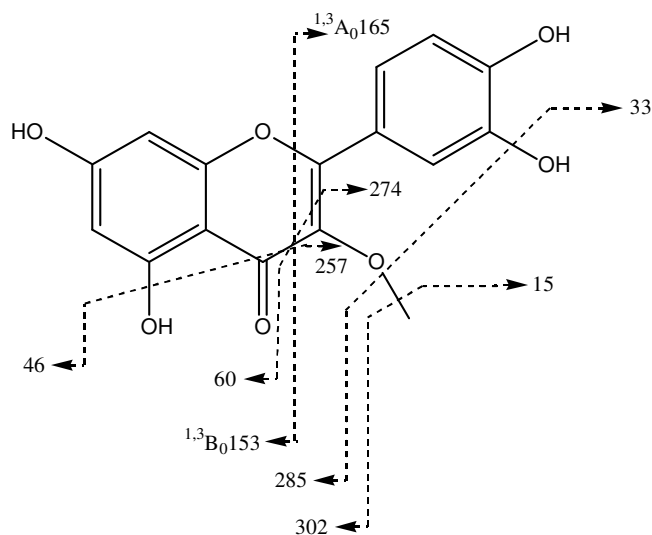
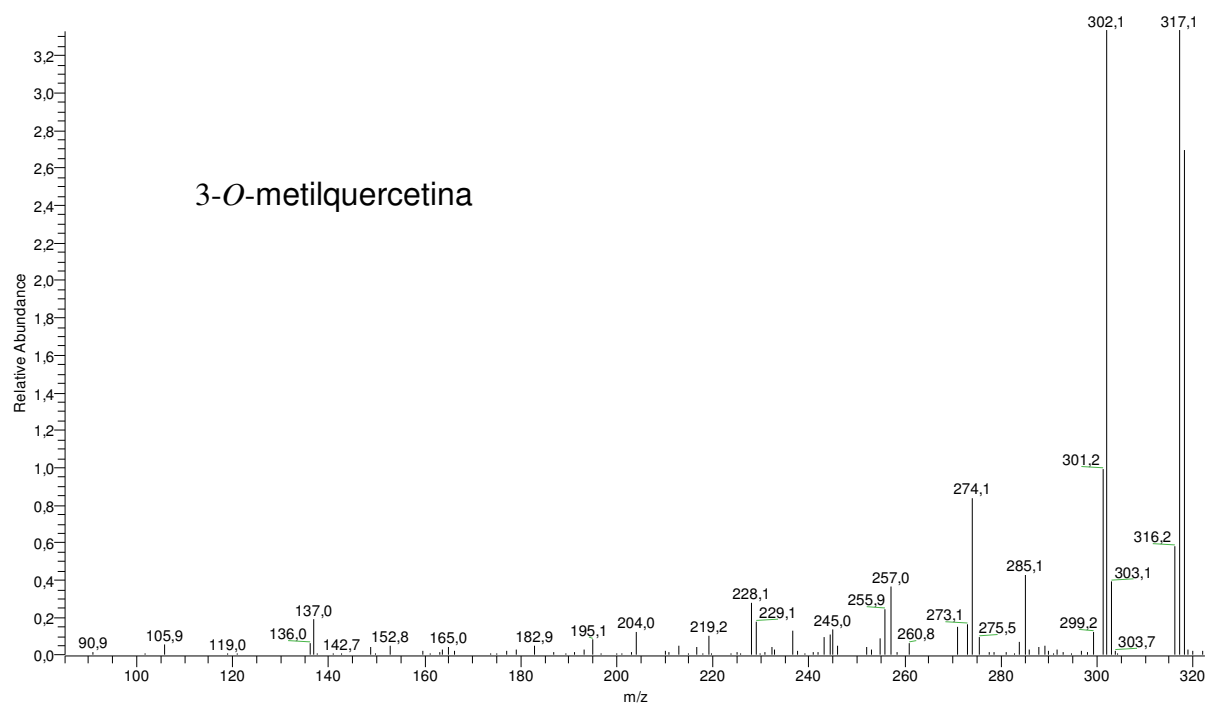


Figura 40 – Espectro de massas do pico referente a 3-O-metilquercetina, isolada de PS80, obtido por sistema de espectrometria de massas – ionização por spray de elétrons e principais fragmentações.

A substância P8, com tempo de retenção em torno de 60 minutos no cromatograma do PS80 (Figura 22), após ter sido isolada e purificada, conforme descrito na seção 4.2.8, apresentou aspecto oleoso e coloração amarela, com odor característico da espécie *Achyrocline satureioides*. Partindo-se de 1 g de PS80, obteve-se 55 mg de P8, caracterizando um rendimento de 5,5 %. A substância foi analisada por CLAE, associada a detector com arranjo de fotodiodos para determinação de seu espectro no ultravioleta, por espectrometria de massas para determinação de seu peso molecular e por ressonância magnética nuclear para completa elucidação de sua estrutura molecular.

O espectro de absorção na região do ultravioleta apresentou máximos de absorção de 209 e 369 nm, característico de chalconas (MASESANE *et al.*, 2000; MDEE *et al.*, 2003).

A Figura 41 apresenta o espectro de massas da substância P8, onde pode-se observar o íon molecular m/z 593 $[M+K]^+$ condizente com seu peso molecular associado ao íon potássio e tem como pico base o fragmento m/z 308 $[M+K -285]$. Também, pode-se destacar como associados a esta molécula, os fragmentos m/z 455 $[M+K -138]$, m/z 225 $[M+K -368]$ e m/z 157 $[M+K -436]$. Pela diferença de massa molecular destes fragmentos em relação ao íon molecular foram deduzidas as principais fragmentações que ocorreram durante a análise e estas estão apresentadas na Figura 41. Com base no peso molecular determinado para a substância P8 de 554 $[M+H]^+$, foi deduzida a seguinte fórmula molecular $C_{32}H_{26}O_9$.

Os valores de deslocamentos químicos (ppm) e atribuição dos carbonos do espectro RMN de ^{13}C da substância P8 (Figura 42) estão detalhados na Tabela 33. A observação de que o espectro RMN de ^{13}C apresenta apenas 14 sinais de carbono, quando a análise de massas indica para a presença de 32 carbonos, gera a hipótese de tratar-se de um dímero, sendo que a sobreposição dos sinais pode ser atribuída à simetria da molécula.

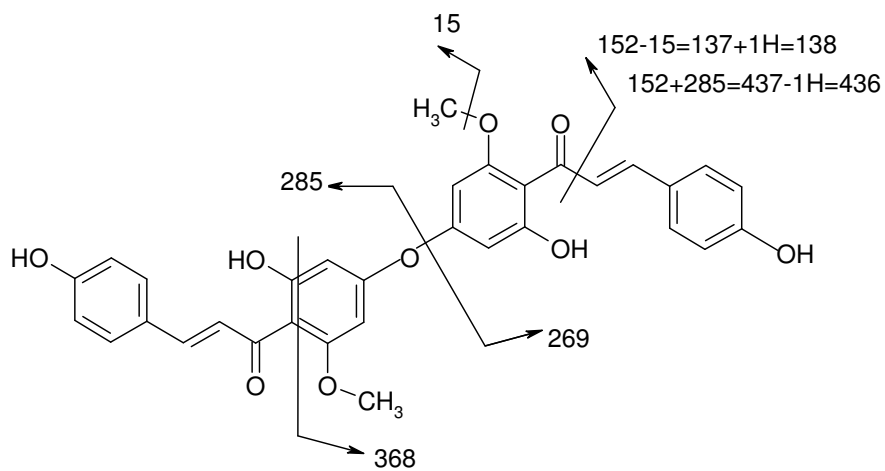
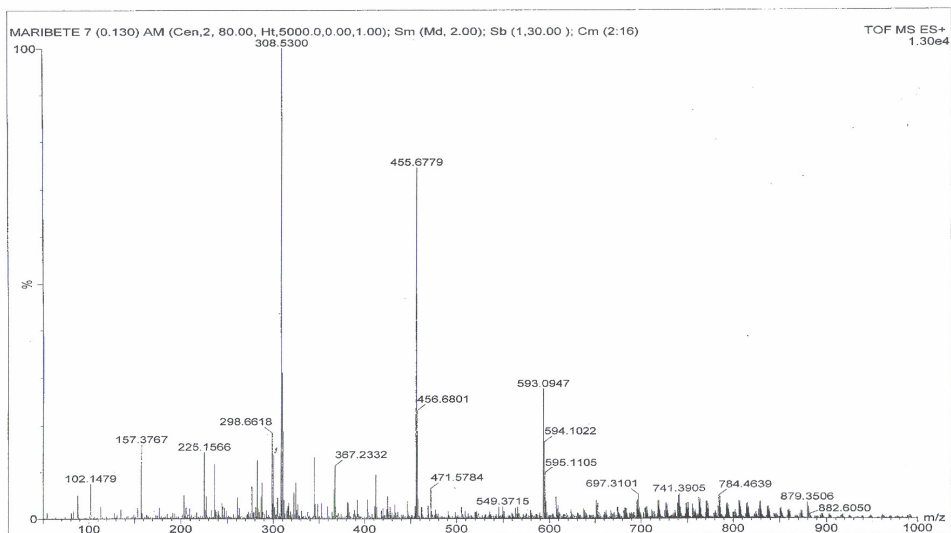


Figura 41 – Espectro de massas da substância P8 (PS80) com íon molecular m/z 593[M+K]⁺ e principais fragmentações.

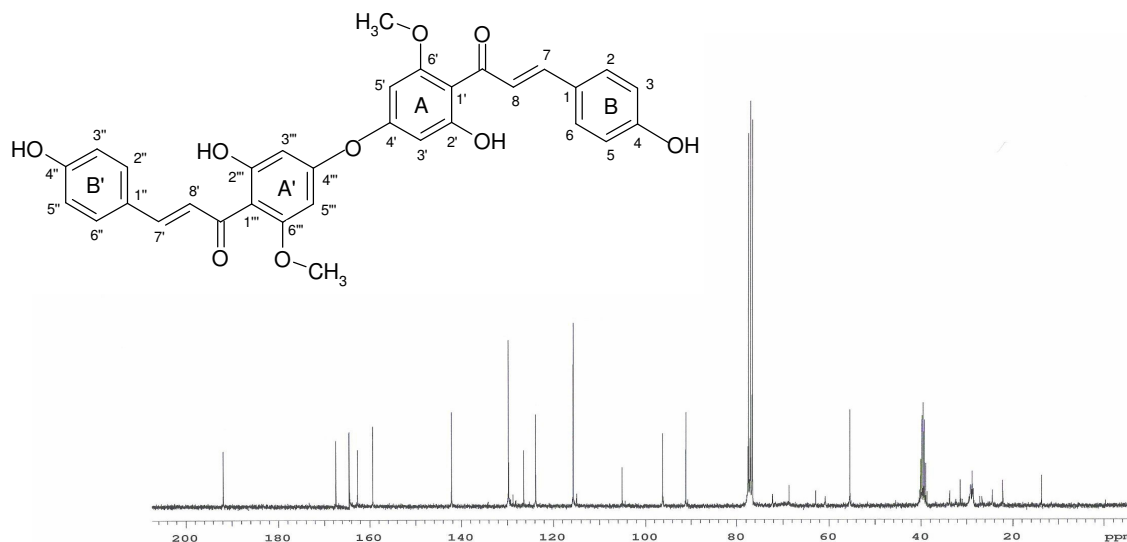


Figura 42 – Espectro RMN de ^{13}C da substância P8 (PS80) obtido em espectrômetro Varian INOVA (300 MHz), utilizando mistura clorofórmio deuterado e DMSO como solvente e TMS como referência interna.

Tabela 33 – Valores de deslocamentos químicos (ppm) e atribuição dos carbonos a partir do espectro RMN de ^{13}C da substância P8 (PS80) obtido em espectrômetro Varian INOVA (300 MHz), utilizando mistura clorofórmio e DMSO deuterados como solvente e TMS como referência interna.

Carbono	Deslocamentos químicos (δ) ppm
$2\times\text{CH}_3$	55,33
$\text{C}5'$ e $\text{C}5'''$	91,10
$\text{C}3'$ e $\text{C}3'''$	96,17
$\text{C}1'$ e $\text{C}1'''$	105,05
$\text{C}3$ e $\text{C}3''$ / $\text{C}5$ e $\text{C}5''$	115,66
$\text{C}7$ e $\text{C}7'$	123,77
$\text{C}1$ e $\text{C}1''$	126,40
$\text{C}2$ e $\text{C}2''$ / $\text{C}6$ e $\text{C}6''$	129,75
$\text{C}8$ e $\text{C}8'$	142,17
$\text{C}4$ e $\text{C}4''$	159,28
$\text{C}2'$ e $\text{C}2'''$	162,59
$\text{C}6'$ e $\text{C}6'''$	164,39
$\text{C}4'$ e $\text{C}4'''$	167,41
$2\times\text{C}=\text{O}$	191,82

Tabela 34 – Valores de deslocamentos químicos (ppm), multiplicidade, constante de acoplamento (J) e atribuição dos hidrogênios a partir do espectro RMN de ^1H da substância P8 (PS80) obtido em espectrômetro Varian INOVA (300 MHz), correlação COSY ^1H - ^1H e HMQC.

Deslocamentos químicos (δ) ppm	Multiplicidade (J)	Número de hidrogênios	Atribuição (Figura 45)	COSY ^1H - ^1H	HMQC (ppm)
3,91	s	6	O-CH ₃ e O-CH ₃ '		55,33
4,95	s	4	-OH (4)		-
5,96	d (1,81 Hz)	2	H3' e H3'''		96,17
6,04	d (2,01 Hz)	2	H5' e H5'''		91,10
6,88	d (8,45 Hz)	4	H3 e H3'' H5 e H5''	H2 e H2'' H6 e H6''	115,66
7,46	d (8,65 Hz)	4	H2 e H2'' H6 e H6''	H3 e H3'' H5 e H5''	129,75
7,70	d (15,7 Hz)	2	H7' e H8'		123,77;142,17
7,77	d (15,5 Hz)	2	H7 e H8		123,77;142,17

O espectro RMN de ^1H da substância P8 (Figura 43), tem os valores de deslocamentos químicos (ppm) multiplicidade, constante de acoplamento (J), atribuição dos hidrogênios e correlação COSY ^1H - ^1H e HMQC apresentados na Tabela 34. O simpleto com sinal em δ 3,91, foi atribuído às metoxilas nas posições C6' e C6''' e o simpleto com sinal em δ 4,95, foi atribuído às hidroxilas nas posições C4, C2', C4'' e C2'''. Os dupletos com sinais em δ 5,96 (2H $J=1,81$ Hz) e δ 6,04 (2H $J=2,01$ Hz) foram atribuídos aos hidrogênios nas posições C3' e C3''' e C5' e C5''', respectivamente, nos anéis A e A', cujas constantes de acoplamento são características de acoplamento em *meta*. O duplete com sinal em δ 6,88 (4H $J=8,45$ Hz) foi atribuído aos hidrogênios substituintes em C3 e C5, no anel B, e C3'' e C5'' no anel B', cujas constantes de acoplamento são características de acoplamento em *orto*. O duplete com sinal em δ 7,46 (4H $J=8,65$ Hz) foi atribuído aos hidrogênios substituintes em C2 e C6, no anel B, e C2'' e C6'' no anel B'.

O duplete em δ 7,70 (2H J=15,7 Hz) e outro duplete em δ 7,77(2H J=15,5 Hz) foram atribuídos aos hidrogênios substituintes nos C7'/C8' e C7 /C8, respectivamente. Esses hidrogênios apresentam constantes de acoplamento correspondente a hidrogênios na dupla ligação em posição *trans*. Semelhante a estrutura de bichalcona descrita por Masesane e colaboradores, 2000.

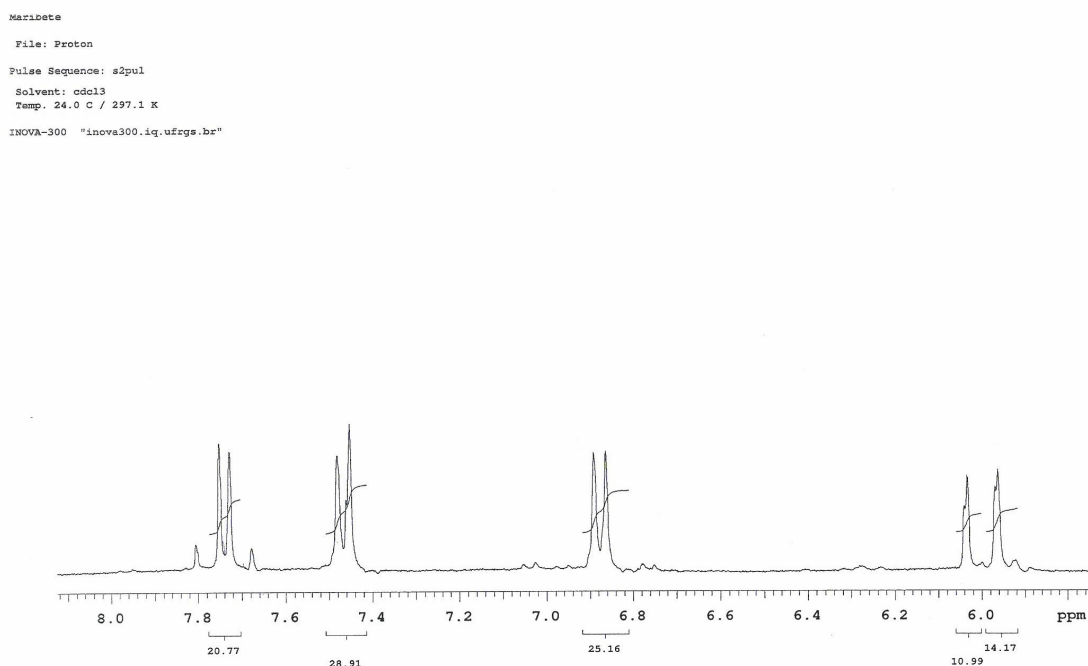


Figura 43 – Espectro parcial RMN de ^1H da substância P8 (PS80) obtido em espectrômetro Varian INOVA (300 MHz), utilizando clorofórmio deuterado como solvente e TMS como referência interna, está apresentado na região entre 6,0 e 8,0 ppm.

Maribete
File: Cosy
Pulse Sequence: COSY
Solvent: cdcl3
Temp. 24.0 C / 297.1 K
INOVA-300 "inova300.iq.ufrgs.br"

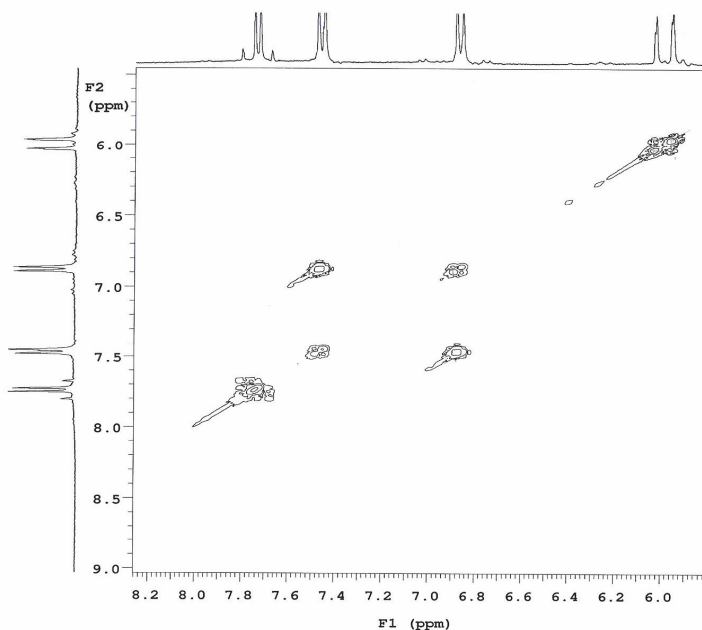


Figura 44 – Espectro de COSY ^1H - ^1H da substância P8 (PS80) obtido em espectrômetro Varian INOVA (300 MHz), utilizando clorofórmio deuterado como solvente e TMS como referência interna, está apresentado na região entre 6,0 e 8,0 ppm.

O espectro de correlação COSY ^1H - ^1H (Figura 44) apresenta claramente as correlações entre os hidrogênios (H2/H3 e H5/H6) dos anéis aromáticos B e B', caracterizando a presença do substituinte na posição *para* destes anéis.

Este conjunto de características leva à proposta de estrutura química molecular para a substância P8 como sendo a 4,2',4'',2'''-tetraidróxi-6',6'''-dimetóxi- 4'-O- 4'''-bichalcona (Figura 45). Esta substância é pela primeira descrita para a espécie *Achyrocline satureioides* e, até o momento, não foram encontrados relatos da ocorrência desta substância em outras espécies vegetais.

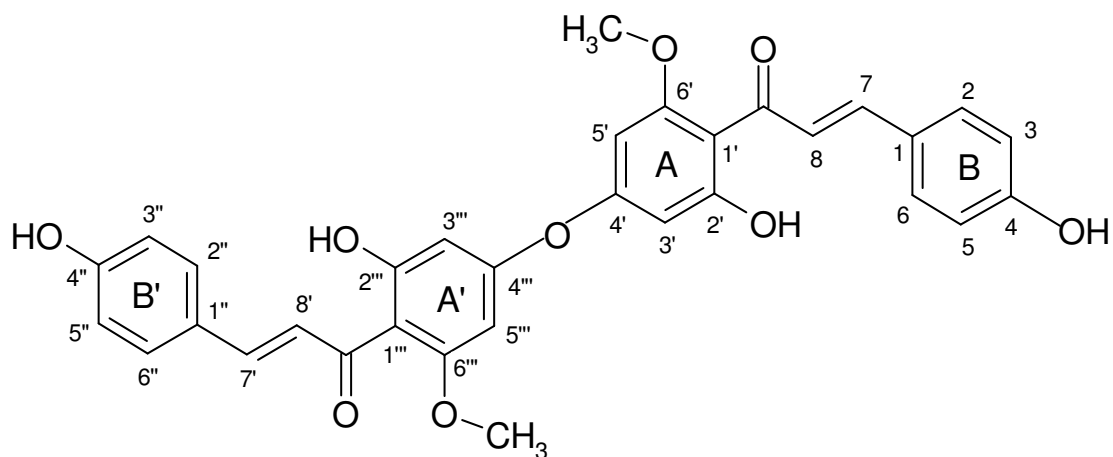


Figura 45 – 4,2',4'',2'''-tetraidróxi-6',6'''-dimetóxi- 4'-O- 4'''-bichalcona

A demanda por medicamentos fitoterápicos vem crescendo mundialmente. A ampliação do consumo levou à normatização do setor com implementação e constante revisão das normas técnicas para a sua produção e comercialização. Atualmente, os medicamentos fitoterápicos devem atender as mesmas exigências oficiais que os medicamentos de origem sintética no que diz respeito à qualidade, eficácia e segurança (BRASIL, 2004).

Dentre as diversas etapas de desenvolvimento de um medicamento fitoterápico destacam-se os estudos de estabilidade. Estes devem ser aplicados a todas as etapas em que ocorra armazenagem, seja da matéria-prima, produto intermediário ou produto final em sua embalagem de comercialização. Nos estudos iniciais, diversos tipos de embalagens podem ser testados, procurando-se o material com melhor relação custo benefício, adequado para a manutenção das condições de estabilidade do produto.

Na maioria dos casos, não existem informações sobre a estabilidade das substâncias marcadoras ou farmacologicamente ativas nas monografias dos produtos de origem vegetal.

Constituintes fenólicos são substâncias químicas encontradas num grande e variado número de espécies vegetais e apresentam uma diversidade de ações biológicas e farmacológicas. O interesse por esse grupo de substâncias tem crescido significativamente nos últimos anos (HEIGL e FRANZ, 2003). No entanto os estudos relacionados à estabilidade dessas substâncias, em preparações fitoterápicas ou matéria prima vegetal, são incipientes (BILIA *et al.*, 2001; BILIA *et al.*; 2002; HEIGL e FRANZ, 2003; BILIA *et al.*, 2007; HOLZSCHUH *et al.*, 2007).

A utilização de técnicas como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) constitui uma importante ferramenta para o acompanhamento da estabilidade destas substâncias, na medida em que permitem identificar, num mesmo cromatograma, substâncias mais polares como os heterosídeos, bem como as menos polares como as agliconas e os correspondentes produtos de degradação. Geralmente as análises por CLAE são realizadas com detectores na região UV-VIS (HEIGL e FRANZ, 2003), no entanto, maiores informações podem ser obtidas quando a CLAE é associada a

detectores com arranjo de fotodiodos ou espectrometria de massas (BILIA *et al.*, 2001; BILIA *et al.*, 2002; BILIA *et al.*, 2007). As análises por ressonância nuclear magnética podem complementar os estudos auxiliando na identificação de novas substâncias formadas (GOPPEL e FRANZ, 2004).

As soluções extrativas, obtidas a partir de matérias-primas vegetais, geralmente aquosas ou hidroetanólicas, apresentam, frequentemente, baixa estabilidade. Os produtos secos obtidos a partir dessas soluções extrativas visam, entre outras vantagens, a apresentar uma melhoria na estabilidade das preparações fitoterápicas.

Para a produção do PS40 foram utilizados como adjuvantes de secagem o dióxido de silício coloidal e a celulose microcristalina, sendo que para a produção do PS80 utilizou-se somente o dióxido de silício coloidal. A presença da celulose microcristalina, por suas características físico-químicas, propiciou um maior teor de umidade residual inicial ao PS40 (4,82 %) ao passo que o PS80, contendo apenas dióxido de silício coloidal, apresentou umidade residual inicial mais baixa (2,12 %). TEIXEIRA (1996) demonstrou que a redução do teor de dióxido de silício coloidal em substituição por celulose microcristalina conferia aos produtos secos de *Achyrocline satureioides* maior higroscopia, o que também pode ser comprovado no presente estudo.

Os estudos de estabilidade do PS40 foram realizados de acordo com as especificações preconizadas pela RE nº 560 de 2002, legislação em vigor na etapa inicial do presente trabalho. Posteriormente, em 2005, houve a substituição pela RE nº 1 de 2005, que foi a guia utilizada para definir as condições do estudo da estabilidade do PS80. As alterações estão relacionadas ao teste acelerado, em que foi substituído o ensaio na temperatura de 50 °C com 90 % de umidade relativa, durante 3 meses pelo ensaio 40 °C com 75 % de umidade relativa, durante 6 meses. Também foi alterada a condição de umidade para o teste de longa duração, que passou de 65 % para 75 % de umidade relativa, mantendo-se a temperatura de 30 °C por um período de até 24 meses. Desta forma, a atual legislação (RE nº 1, 2005) está harmonizada com os códigos internacionais (ICH 2003, USP 31).

Para a avaliação de PS40 e PS80, foram utilizados diferentes tipos de acondicionamento, frasco de vidro transparente hermético, frasco de vidro âmbar não hermético ou sem proteção em vidro de relógio. As diferenças entre os frascos de vidro previam avaliar a proteção oferecida ao produto seco, por um frasco transparente ou âmbar hermeticamente fechado ou não, frente à temperatura, umidade, oxigênio do ar e à luz. Embora o estudo de estabilidade de longa duração do PS40 não tenha evidenciado diferenças significativas entre o acondicionamento em frasco âmbar (tampa de rosca e batoque) ou transparente (tampa de borracha lacrada com cinta metálica), em condições de estabilidade acelerada observou-se que o frasco transparente protegeu melhor o produto. Desta forma o frasco transparente foi a escolha de acondicionamento para os estudos de estabilidade do PS80 frente à temperatura. Para os estudos de estabilidade frente à luz foram utilizados frascos âmbar e transparente como forma de acondicionamento para os produtos PS40 e PS80 e estes protegeram os produtos frente à luz, quando comparados com as amostras expostas em vidro de relógio.

Os resultados dos testes de estabilidade em condições de estresse revelaram a fragilidade de algumas substâncias, como do ácido caféico e da substância não identificada P3, presentes em PS40, além da substância designada P8, presente em PS80. A análise por CLAE, avaliando tempo de retenção, k' , espectros no ultravioleta e co-eluição de PS40 e PS80 (Figura 23) revelam que as substâncias P3 e P8, detectadas, respectivamente no PS40 e PS80, correspondam à mesma entidade química. A quercetina apresentou comportamento anômalo, na medida em que foi observado aumento de seu teor pela exposição ao calor. O aumento da concentração de quercetina, em produtos fitoterápicos, após armazenagem em alta temperatura foi previamente descrito (SONAGLIO, 1987; HEIGL e FRANZ, 2003) e explicada como possivelmente originária da degradação de seus heterosídeos. Para a espécie *Achyrocline satureioides*, foi relatada a presença do heterosídeo 7-O-glicosídeo da 3-O-metilquercetina (SIMÕES, 1984), mas até o presente momento não foi relatada a presença de heterosídeos com o núcleo quercetina.

Embora, o sistema cromatográfico apresentasse a possibilidade de detectar substâncias correlatas à quercetina, como seus heterosídeos, estes não foram detectados, pelo menos em concentrações que pudessem gerar a quantidade de quercetina produzida com o aumento da temperatura. Assim sendo, no presente estudo, a correlação entre o aumento de quercetina e o proporcional decréscimo de P3 no PS40 ou P8 no PS80 foi a primeira hipótese aventada.

Para a verificação desta hipótese, a identificação da substância P3/P8 foi realizada, iniciando por seu isolamento, pelo método por cromatografia em coluna e, posteriormente, empregando cromatografia em camada delgada preparativa. O método por cromatografia em coluna permitiu isolar, a partir do PS40, não somente P3, mas também as substâncias P1, P2 bem como a 3-*O*-metilquercetina. O isolamento de 3-*O*-metilquercetina com alto grau de pureza serviu de matéria-prima para trabalhos que se desenvolveram paralelamente a esse (FASOLO *et al.*, 2007; SCHWINGEL, 2007). Por outro lado, o método por cromatografia em camada delgada preparativa apresentou-se mais eficiente, com menor consumo de solvente e melhor rendimento para obtenção de P8 com quantidade e pureza adequadas para as análises por espectrometria de massas e ressonância nuclear magnética.

Para as análises do PS80 por espectrometria de massas, o isolamento das substâncias foi realizado diretamente por CLAE. No presente trabalho, pela primeira vez, foram descritos os espectros de massas com as respectivas fragmentações para os principais marcadores da *Achyrocline satureioides* presentes no PS80, quercetina, luteolina e 3-*O*-metilquercetina.

Ainda relacionado ao aumento do teor de quercetina nos testes de estabilidade, principalmente em condições de estresse para o PS40, surgiu o interesse em avaliar a atividade antiinflamatória do produto contendo maior teor de quercetina, denominado PS40+, mesmo que apresentando ausência de ácido caféico, diminuição de P3 e mantendo os demais constituintes fenólicos em concentrações idênticas às apresentadas pelo PS40.

O produto PS40+ demonstrou atividade anti-edematogênica significativa na terceira e quarta horas, corroborando os estudos que demonstraram que a atividade antiinflamatória relacionada ao flavonóide quercetina ocorre principalmente entre a terceira e quinta hora na formação do edema na fase aguda, empregando como modelo experimental o edema em pata de rato induzido por carragenina (TEIXEIRA, 1996; PELZER *et al*, 1998; GUARDIA *et al*, 2001, ROTELLI *et al*, 2003; De SOUZA, 2007). Esta ação pode estar relacionada à inibição da síntese de prostaglandinas, pois estas são liberadas na última fase do edema induzido pela carragenina, em torno de 3 horas (Di ROSA *et al*, 1971).

No entanto, altas concentrações de quercetina poderiam representar potencial toxicidade. Estudos avaliando diversas preparações, obtidas a partir de *Achyrocline satureioides*, sobre a toxicidade celular são contraditórios (POLYDORO *et al.*, 2004; RIVERA *et al.*, 2004; ARREDONDO *et al.*, 2004). Destes estudos, somente o realizado por Rivera e colaboradores (2004) relata a avaliação da toxicidade aguda por via oral. Foram administrados até 5 g/kg do liofilizado obtido da infusão aquosa de *Achyrocline satureioides* (1 g/50 ml), num período de 4 h. Não foram relatadas diferenças significativas, entre grupo controle e tratados, para os teores de fosfatase alcalina, glutamato-oxalato-transaminase e glutamato-piruvato-transaminase no plasma sanguíneo, assim como para os diversos órgãos analisados (rins, fígado, esôfago, estômago, duodeno e intestino).

Os resultados da atividade antiinflamatória observados para PS40 e PS40+, apesar de preliminares e realizado com um pequeno número de animais, demonstram percentuais variados de redução do edema. No entanto, os elevados desvios padrões não permitiram evidenciar diferenças significativas, pelo teste *t* de Student ($p < 0,05$), entre os produtos PS40 e PS40+. Contudo, pode-se observar uma tendência do PS40+ em ser mais efetivo na inibição da formação do edema, sugerindo relação deste efeito com o maior teor de quercetina.

O estudo acelerado da estabilidade do PS40 (50° C/ 90 % UR) durante 3 meses revelou instabilidade do ácido caféico e da substância P3 semelhantemente à apresentada por estes constituintes no estudo em condições de estresse (80 ° C),

assim como, o aumento do teor de quercetina a partir do primeiro mês e até o final do experimento. As demais substâncias variaram suas concentrações dentro do limite de $\pm 10\%$, nestas condições.

O estudo acelerado da estabilidade do PS80 ($40^\circ\text{C}/75\%$ UR) revelou que ao final de 6 meses, somente as substâncias P5ab e P8 apresentaram comportamento instável sendo que as demais substâncias, inclusive a quercetina, mantiveram-se dentro dos limites preconizados ($\pm 10\%$). No entanto, de forma idêntica ao observado no estudo acelerado de estabilidade do PS40, observou-se um aumento no teor de quercetina no terceiro mês de exposição, sem, no entanto, ultrapassar o limite de $\pm 10\%$ da concentração inicial.

Os estudos de estabilidade de longa duração ($25 \pm 2^\circ\text{C}$ e $60 \pm 5\%$ UR, para PS40 e $30 \pm 2^\circ\text{C}$ e $75 \pm 5\%$ UR, para PS80, por 12 meses) revelaram a manutenção da concentração das substâncias presentes nos produtos secos PS40 e PS80, respectivamente, por nove e doze meses, quando estes foram armazenados em frasco de vidro transparente, hermeticamente fechado.

A avaliação da fotoestabilidade frente à radiação UVC (Light express LE UV, 254 nm, 30 W), de PS40 e PS80 demonstrou que o acondicionamento em frascos de vidro âmbar ou transparente foram eficientes em proteger o produto, durante as 48 horas de exposição. No entanto quando exposto à luz e ao ar, em vidro de relógio, as substâncias apresentaram-se instáveis, especialmente o ácido caféico, P1, P2, e P3 no PS40 e P5ab e P8 no PS80, assim como a quercetina e a 3-*O*-metilquercetina em ambos os produtos. A luteolina apresentou maior estabilidade, corroborando os resultados de Smith e colaboradores (2000), que relataram sua maior estabilidade quando comparada à quercetina. Os autores relacionaram a menor estabilidade da quercetina à presença de substituinte na posição C3. Por analogia, pode-se inferir sobre a menor estabilidade da 3-*O*-metilquercetina observada nos resultados do presente trabalho, à presença de substituinte metoxila nesta posição.

Complementando os estudos de estabilidade, foi realizado o estudo da cinética de degradação das substâncias majoritárias quercetina, luteolina, 3-*O*-metilquercetina e

do P8, presentes no PS80. A cinética de degradação destas substâncias foi avaliada frente à temperatura de 80 °C durante 49 dias e frente à radiação UV-C (Light express LE UV, 254 nm, 30 W), durante 96 horas.

Quando o PS80 foi submetido ao teste, sob condições de estresse térmico (80 °C), a melhor correlação para as substâncias quercetina , luteolina , 3-*O*-metilquercetina e P8, foi obtida entre o inverso da concentração e o tempo de exposição ($1/C \times t$). Desta forma, pode-se dizer que a degradação destas substâncias ocorre por reação de segunda ordem ou pseudo primeira ordem. Na avaliação da cinética de degradação do PS80 submetido ao teste por exposição à radiação UV-C, a melhor correlação para quercetina , luteolina , 3-*O*-metilquercetina e P8 em PS80, foi obtida entre o logaritmo da concentração e o tempo de exposição ($\text{Log } C \times t$), indicando reação de primeira ordem (NUDELMANN, 1975; LACHMANN *et al.*, 2001).

As chalconas caracterizam uma família de substâncias que possuem núcleo fundamental 1,3-diarilpropano. Estas substâncias são encontradas em diferentes órgãos vegetais, sobretudo nas flores. Em famílias como Asteraceae as chalconas contribuem significativamente para a pigmentação amarela da corola. As primeiras chalconas identificadas foram comparadas às acetofenonas, sendo assim, o núcleo *A* é numerado com números ordinários seguidos de (') e o núcleo *B* com números ordinários, contrariamente ao utilizado na maioria dos flavonóides (ZUANAZZI, 2007). Para a espécie *Achyrocline flaccida* foi descrita a presença da chalcona identificada como 4,2',4'-triidróxi-6'-metóxicalcona (BROUSSALIS *et al.*, 1988).

No presente trabalho, a substância P8 foi identificada como sendo 4,2',4'',2'''-tetraidróxi-6',6'''-dimetóxi- 4'-*O*- 4'''-bichalcona. Constituindo-se um dímero da chalcona presente em *Achyrocline flaccida* descrita por Broussalis e colaboradores em 1988.

Substância semelhante a esta foi isolada de *Rhus pyroides* (2',4'',2'''-triidróxi-4',4'''-dimetóxi-4-*O*-5'''-bichalcona), denominada Ruschalcona-I (MASESANE *et al.*, 2000). Em 2003, Mdee e colaboradores, isolaram desta mesma espécie outras cinco bichalconas. Estas substâncias foram testadas *in vitro*, quanto a sua toxicidade frente a diferentes linhagens de células tumorais, sendo que, dentre estas, a substância

identificada como Ruschalcona-IV (4,2',4'',2'''-tetraidróxi-4''''-metóxi-4'-O-5''''-bichalcona) foi a que demonstrou ser mais potente frente as linhagens de células de câncer de cólon, especialmente HT-29 e HCT-116 (ED₅₀=25) e demonstrando atividade similar frente a linhagens de células de melanoma (LC50=4,8; 4,6 e 4,6 para SK-MEL-5, SK-MEL-28 e VACC-62, respectivamente).

A similaridade estrutural da bichalcona isolada de *Achyrocline satureioides* à Ruschalcona-I e IV sugere que a mesma seja testada quanto a sua potencial atividade antitumoral. A elucidação estrutural permitirá comprovar, ou não, a hipótese inicial de que a substância P8 incide no aumento do teor de quercetina.

O estudo realizado reveste-se de caráter inédito, na medida em que, não foram encontrados relatos na literatura disponível sobre este tipo de estudo para constituintes presentes em preparações extrativas vegetais, incluindo os polifenóis presentes no produto seco de *Achyrocline satureioides*. Assim estes resultados representam um avanço significativo para os estudos de estabilidade de preparações fitoterápicas, condição imprescindível para a manutenção da sua qualidade, segurança e eficácia.

7. CONCLUSÕES

- Os constituintes fenólicos do PS40, em seu conjunto, demonstraram comportamento estável, por pelo menos 9 meses, quando acondicionados em frasco de vidro âmbar ou transparente na temperatura de 25 ± 2 °C e umidade 60 ± 5 %, simulando condições ambientais de armazenamento. Individualmente, a quercetina, a luteolina e a 3-*O*-metilquercetina mantiveram-se estáveis durante 12 meses, nas mesmas condições;
- O PS80 demonstrou comportamento estável, quando acondicionado em frasco de vidro transparente na temperatura de 30 ± 2 °C e umidade 75 ± 5 %, por 12 meses, no estudo de longa duração;
- O estudo do PS40 e PS80, em condições de estresse (80 °C), revelou aumento do teor de quercetina a partir do segundo dia até 7 dias, mas com redução dos constituintes ácido caféico e P3 no PS40 e P5ab e P8 no PS80;
- No ensaio da atividade antiedematogênica, não houve diferença significativa entre a atividade observada para PS40 e PS40+, contendo maior teor de quercetina;
- Todos os constituintes fenólicos do PS40 e do PS80, acondicionado em frasco de vidro âmbar ou transparente, apresentaram-se estáveis quando submetidos à radiação UVC 254 nm por um período de 48 horas, e demonstraram instabilidade quando expostos em vidro de relógio;
- O estudo de cinética de degradação do PS80 demonstrou que as substâncias estudadas: quercetina, luteolina, 3-*O*-metilquercetina e P8 seguem cinética de segunda ordem, quando submetidas à temperatura de 80 °C e por sua vez quando submetidas à radiação UV-C seguem cinética de primeira ordem;

- Por comparação com substância de referência e pelo teste de recuperação, foi possível identificar a presença de ácido caféico no PS40;
- O método que utiliza cromatografia em coluna permitiu isolar a 3-*O*-metilquercetina e as substâncias não identificadas P1, P2 e P3 presentes no PS40;
- As análises por espectrometria de massas permitiram confirmar as estruturas das substâncias quercetina, luteolina e 3-*O*-metilquercetina presentes tanto no PS80 quanto no PS40;
- Um novo método por cromatografia em camada delgada preparativa mostrou ser adequado para o isolamento e purificação do P8 presente no PS80, com vistas a sua elucidação estrutural;
- A análise por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector com arranjo de foto-diodos, revelou que as substâncias P8 (isolada do PS80) e P3 (presente no PS40) apresentam idênticos tempos de retenção e espectro no ultravioleta, indicando similaridade estrutural.
- A elucidação estrutural da substância P8 revelou tratar-se da 4,2',4'',2'''-tetraidróxi-6',6'''-dimetóxi- 4'-*O*- 4'''- bichalcona, substância de estrutura inédita, até o presente momento.

8. REFERÊNCIAS

AKISUE, M. K. Análise do óleo essencial de *Achyrocline satureioides* D.C. Compositae. **Revista de Farmácia Bioquímica da Universidade de São Paulo**, v. 9, n. 1, p. 107-114, 1971.

ANESINI, C.; PEREZ, C. Screening of plants used in Argentine folk medicine for antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 39, p. 119-128, 1993.

ARREDONDO, M. F.; BLASINA, F.; ECHEVERRY, C.; MORQUIO, A.; FERREIRA, M.; ABIN-CARRIQUIRY, J. A.; LAFON, L.; DAJAS, F. Cytoprotection by *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. and some of its main flavonoids against oxidative stress. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 91, p. 13-20, 2004.

BAERTSCHI, S. W. (ed.). **Pharmaceutical Stress Testing – Predicting Drug Degradation**. New York: Informa Healthcare, 2005. cap. 2 e 10.

BASSANI, V. L. **Valorisation de formes galéniques végétales desalcoolisation et concentration de solutions extraitives sur membrane d'osmose inverse**. 1990. 261 p. Tese (Doutorado em Farmácia) – Faculte de Pharmacie, Montpellier, 1990.

BASSANI, V. L.; TEIXEIRA, H. F.; GONZALES ORTEGA, G.; LEMOS SENNA, E.; SIMÕES, C. M. O.; SONAGLIO, D.; PETROVICK, P. R. Processo para obtenção de extratos de *Achyrocline satureioides* e produto obtido. **PI 103468-5**, INPI, 12 de julho de 2001.

BAUER, L.; SILVA, G. A. A. B.; SIQUEIRA, N. C. S.; BACHA, C. T. M.; SANT'ANA, B. M. S. Contribuição à análise dos óleos essenciais de *Eupatorium ligulifolium* H.A . e *Achyrocline satureioides* D.C. do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 60, n. 7/9, p. 97-100, 1979.

BETTEGA, J. M. R.; TEIXEIRA, H. F.; BASSANI, V. L.; BARARDI, C. R. M. SIMÕES, C. M. O. Evaluation of antihyperthermic activity of standardized extracts of *Achyrocline satureioides*. **Phytotherapy Research**, v. 18, p. 819-823, 2004.

BILIA, A. R.; BERGONZI, M. C.; MAZZI, G.; VINCIERI, F.F. Evaluation of chemical stability of St. John's wort commercial extract and some preparations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 213, p. 199-208, 2001.

BILIA, A. R.; BERGONZI, M. C.; MORGENNI, F.; GALLORI, S.; VINCIERI, F.F. Stability of the constituents of Calendula, Milk-thistle and Passionflower tinctures by LC-DAD and LC-MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 30, p. 613-624, 2002.

BILIA, A. R.; ETERNO, F.; BERGONZI, M. C.; MAZZI, G.; VINCIERI, F.F. Evaluation of the content and stability of the constituents of the mother tinctures and tinctures : The

case of *Crataegus oxyacantha* L. and *Hieracium pilosella* L. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 44, p. 70-78, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE nº 560, de 2 de abril de 2002. Guia para realização de estudos de estabilidade – 2/2002. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 03 de abril de 2002. <http://anvisa.gov.br>

BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 48 de 16 de março de 2004. Revoga a resolução RDC nº 17 de 24/02/2000 e regulamenta o registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 18 de março de 2004. <http://anvisa.gov.br>

BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RE nº 1, de 29 de julho de 2005. Guia para realização de estudos de estabilidade. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 01 de agosto de 2005. <http://anvisa.gov.br>

BRITISH Pharmacopoeia 2008. London: The Stationary office, 2008. 4v.

BROADHEAD, J.; EDMOND ROUAN, S. K.; RHODES, C. T. The spray drying of pharmaceuticals. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 18, n. 11&12, p. 1169-1206, 1992.

BROUSSALIS, A. M.; FERRARO, G. E.; GURNI, A. A.; COUSSIO, J. D. Phenolic constituents of four *Achyrocline satureioides*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 16, n. 4, p. 401-402, 1988.

BROUSSALIS, A. M.; FERRARO, G. E.; GURNI, A. A.; COUSSIO, J. D. Aspectos fitoquímicos de espécies argentinas del género *Achyrocline*. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 8, n. 1, p. 11-16, 1989.

CARNEY, J. R.; KRENISKY, J. M.; WILLIAMSON, R. T.; LUO, J. Achyrofuran, a New Antihyperglycemic Dibenzofuran from the South American Medicinal Plant *Achyrocline satureioides*. **Journal of Natural Products**, v. 65, p. 203-205, 2002.

CARSTENSEN, J. T.; RHODES, C.T. **Drug Stability – Principles and Practices**. New York: Marcel Dekker, 2000.

CASADEBAIG, J.L. **Realization d'extraits secs nebulisés. Optimization de formes galéniques de origine végétale a activité diurétique**. 1987. Tese (Doutorado em Farmácia) – Faculte de Pharmacie, Montpellier, 1987.

CONSENTINO, M.; BOMBELLI, R.; CARCANO, E.; LUINI, A.; FRANCA, M.; CREMA, F.; DAJAS, F.; LECCHINI, S. Immunomodulatory properties of *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. infusion: a study on human leukocytes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, p. 501-507, 2008.

DE PAULA, I. C. **Desenvolvimento tecnológico da forma farmacêutica plástica, contendo extrato seco nebulizado de *Achyrocline satureioides* (LAM.) D.C. Compositae (Marcela)**. 1996. 193 p. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1996.

DESMARCHELIER, C.; COUSSIO, J.; CICCIA, G. Antioxidant and free radical scavenging effects in extracts of the medicinal herb *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. (“marcela”). **Brazilian Journal of Biological Research**, v. 31, p. 1163-1170, 1998.

DE SOUZA, K. C. B.; SCHAPOVAL, E. E. S.; BASSANI, V. L. LC determination of flavonoids: separation of quercetin, luteolin and 3-O-methylquercetin in *Achyrocline satureioides* preparations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 28, p. 771-777, 2002.

DE SOUZA, K. C. B.; BASSANI, V. L.; SCHAPOVAL, E. E. S. Influence of excipients and technological process on anti-inflammatory activity of quercetin and *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. extracts by oral route. **Phytomedicine**, v. 14, p. 102-108, 2007.

Di ROSA, M.; GIROUD, J. P.; WILLOUGHBY, D. A. Studies of the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. **Journal of Pathology**, v. 104, p. 15-29, 1971.

EMA – The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. **Note for Guidance on Quality of Herbal Medicinal Products** (formerly EMA/HMPWP/9/99). London, 2001. p. 1-7. <http://emea.europa.eu/>

ES-SAFI, N. E.; KERHOAS, L.; DUCROT, P. H. Application of positive and negative electrospray ionization collision-induced dissociation and tandem mass spectrometry to a study of the fragmentation of 6-hydroxyluteolin 7-O-glucoside and 7-O-glucosyl-(1-3)-glucoside. **Rapid Communications on Mass Spectrometry**, v. 19, p. 2734-2742, 2005.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA 4^a ed. São Paulo: Atheneu, 1988.

FASOLO, D.; SCHWINGEL, L.; HOLZSCHUH, M.; BASSANI, V.; TEIXEIRA, H. Validation of an isocratic LC method for determination of quercetin and methylquercetin in topical nanoemulsions. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 44, p. 1174-1177, 2007.

FERRARO, G. E.; NORBEDO, C.; COUSSIO, J. D. Polyphenols from *Achyrocline satureioides*. **Phytochemistry**, v. 20, n. 8, p. 2053-2054, 1981.

GAUDY, D.; PUECH, A.; JACOB, M. Rôle de l'adjuvant dans l'optimisation de la production d'un extrait de Noix vomique. **Pharmaceutica Acta Helvetica**, v. 66, n. 1, p. 5-10, 1991.

GOPPEL, F.; FRANZ, G. Stability control of valerian ground material and extracts: a new HPLC-method for the routine quantification of valerianic acids and lignans. **Pharmazie**, v. 59, n. 6, p. 446-452, 2004.

GUGLIUCCI, A.; MENINI, T. Three different pathways for human LDL oxidation inhibited in vitro by water extracts of the medicinal herb *Achyrocline satureioides*. **Life Sciences**, v. 71, p. 693-705, 2002.

GUGLIUCCI, A.; MENINI, T. The botanical extracts of *Achyrocline satureioides* and *Ilex paraguariensis* prevent methylglyoxal-induced inhibition of plasminogen and antithrombin III. **Life Sciences**, v. 72, p. 279-292, 2002a.

GUPTA, M. P. 270 **Plantas Medicinales Iberoamericanas**. Santa Fé de Bogotá: Andrés Bello, 1995.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 11 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. cap. 33, p. 429-437.

HARBONE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v. 55, p. 481-504, 2000.

HEIGL, D.; FRANZ, G. Stability testing on typical flavonoid containing herbal drugs. **Pharmazie**, v. 58, n. 12, p. 881-885, 2003.

HEFENDEHL, F. W. Requirements of the Licensing Authority of Federal Republic of Germany concerning the Stability Testing of Drug Products, with special reference to Phytopharmaceuticals. In: **Stability Testing of Drug Products**. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 1987. p. 104-112.

HIRSCHMANN, G. S. The constituents of *Achyrocline satureioides* D.C. **Revista Latinoamericana de Química**, v. 15, n. 3, p. 134-135, 1984.

HNATYZYN, O.; MOSCATELLI, V.; RONDINA, R.; COSTA, M.; ARRANZ, C.; BALASZCZUCK, A.; COUSSIO, J.; FERRARO, G. Flavonoids from *Achyrocline satureioides* with relaxant effects on the smooth muscle of guinea pig corpus cavernosum. **Phytomedicine**, v. 11, p. 366-369, 2004.

HOLZSCHUH, M. H., SILVA, D. M., SCHAPOVAL, E. E. S., BASSANI, V. L. Thermal and photo stability of phenolic constituents in spray-dried powder from *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. **Pharmazie**, v. 62, p. 902-906, 2007.

HOSTETTMANN, K.; HOSTETTMAN, M. Isolation Techniques for Flavonoids. In: HARBORNE, I.; MABRY, T. (ed.) **The Flavonoids: advances in Research**. London: Chapman and Hall, 1982. Cap. 1, p. 1-18.

ICH–International Conference on the Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) **Q2 (R1): Validation of analytical procedures: Text and Methodology**, 1996. <http://www.ich.org/cache/compo/276-254-1.html>, acesso em 16/08/2008.

ICH–International Conference on the Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) **Q1B: Stability testing: Photostability of new drug substances and products**, 1996. <http://www.ich.org/cache/compo/276-254-1.html>, acesso em 16/08/2008.

ICH–International Conference on the Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) **Q1A (R2): Stability testing of new drug substances and products**, 2003. <http://www.ich.org/cache/compo/276-254-1.html>, acesso em 16/08/2008.

ICH–International Conference on the Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) **Q1E: Evaluation for stability data**, 2003. <http://www.ich.org/cache/compo/276-254-1.html>, acesso em 16/08/2008.

ICH–International Conference on the Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) **Q1F: Stability data package for registration applications in climatic zones III and IV**, 2006. <http://www.ich.org/cache/compo/276-254-1.html>, acesso em 16/08/2008.

ICS-UNIDO **International Center for Science and High Technology – United Nations Industrial Development Organization**, acesso em 23/06/2008. http://www.ics.trieste.it/MAPs/MedicinalPlants_Plant.aspx?id=571&family=0&country=all

JACOB, M.; SOEDIRO-SOERTANO; PUECH, A.; DURU, C.; CAVAILLES, L.; PELLECUER, J. Contribution à l'étude de la stabilité de divers extraits végétaux secs. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 59, n. 12, p. 335-338, 1984.

KADARIAN, C.; BROUSSALIS, A. M.; MINO J.; LOPEZ, P.; GORZALCZANY, S.; FERRARO, G.; ACEVEDO, C. Hepatoprotective activity of *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. **Pharmacological Research**, v. 45, p. 57-61, 2002.

KALOGA, M.; HÄNSEL, R.; CYBULSKI, E. M. Isolierung eines Kawapyrons aus *Achyrocline satureioides*. **Planta Medica**, v. 48, p. 103-104, 1983.

KOMMANABOYNA, B.; RHODES, C. T. Trends in Stability Testing, with Emphasis on Stability During Distribution and Storage. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 25, n. 7, p. 857-868, 1999.

LABUCKAS, D. O.; MAESTRI, D. M.; GROSSO, N. R.; ZYGADLO, J. A. Essential oils of *Achyrocline satureioides*, *Achyrocline alata* and *Achyrocline tomentosa*. **Planta Medica**, v. 65, p. 184-186, 1999.

LACHMAN, L.; DE LUCA, P.; AKERS, M. J. Testes de estabilidade e fundamentos de cinética química. In: LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. (ed.) **Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica**. Lisboa: Calouste Gulbenkian, 2001. v. 2, p. 1277-1355.

LAMATY, G.; MENUT, C.; BESSIÉRE, J. M.; SCHENKEL, E. P.; BASSANI, V. The chemical composition of some *Achyrocline satureioides* and *Achyrocline alata* oils from Brazil. **Journal of Essential Oil Research**, v. 3, p. 317-321, 1991.

LANGELOH, A. ; SCHENKEL, E. P. Atividade antiespasmódica do extrato hidroalcoólico de marcela (*A. satureioides* Lam. DC.) compositae, sobre a musculatura lisa genital de ratos. **Caderno de Farmácia**, v. 1, n. 1, p. 38-44, 1985.

LARSEN, G. L.; HENSON, P. M. Mediators of inflammation. **Annual Review of Immunology**, v. 1, p. 335-359, 1983.

LEMOS-SENNA, E. M. T. **Desenvolvimento de extratos secos nebulizados de *Achyrocline satureioides* (LAM) D.C. Compositae (Marcela)**. 1993. 140 p. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1993.

LEMOS-SENNA, E.; PETROVICK, P. R.; GONZÁLES ORTEGA, G.; BASSANI, V. L. Preparation and characterization of spray-dried powders from *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC extracts. **Phytotherapy Research**, v. 11, p. 123-127, 1997.

LEY, K. Molecular mechanisms of leukocyte recruitment in inflammatory process. **Cardiovascular Research**, v. 32 (4), p. 733-742, 1996.

LIST, P. H.; SCHMIDT, P. C. **Phytopharmaceutical Technology**. London: Heyden, 1989. 374 p.

LORENZO, D.; ATTI-SERAFINI, L.; SANTOS, A. C.; FRIZZO, C. D.; PAROUL, N.; PAZ, D.; DELLACASSA, E.; MOYNA, P. *Achyrocline satureioides* essential oils from southern Brazil and Uruguay. **Planta Medica**, v. 66, p. 476-477, 2000.

MARCH, R. E.; LEWARS, E. G.; STADEY, C. J.; MIAO, X.S.; ZHAO, X.; METCALFE, C. D. A comparison of flavonoid glycosides by electrospray tandem mass spectrometry. **Mass Spectrometry**, v. 248, p. 61-85, 2006.

MASESANE, L. K.; YEBOAH, S. O.; LIEBSCHER, J.; MÜGGE, C.; ABEGAZ, B. M. A bichalcone from the twigs of *Rhus pyroides*. **Phytochemistry**, v. 53, p. 1005-1008, 2000.

MASTERS, K. **Spray Drying**. 2nd ed. New York: John Wiley, 1976. 384 p.

MDEE, L. K.; YEBOAH, S. O.; ABEGAZ, B. M. Ruschalcones II-IV, Five new Bichalcones from the root bark of *Rhus pyroides*. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 599-604, 2003.

MESQUITA, A. A. L.; CORRÊA, D. B.; DE PÁDUA, A. P.; GUEDES, M. L. O.; GOTTLIEB, O. R. Flavonoids from four Compositae Species. **Phytochemistry**, v. 25, n. 5, p. 1255-1256, 1986.

MORQUIO, A.; RIVERA-MEGRET, F.; DAIAS F. Photoprotection by topical application of *Achyrocline satureioides* ("marcela"). **Phytoterapy Research**, v. 19, p. 486-490, 2005.

NORBEDO, C.; FERRARO, G.; COUSSIO, J. D. A new flavanone from *Achyrocline flaccida*. **Journal of Natural Products**, v. 45, n. 5, p. 635-636, 1981.

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

PELZER, L. E.; GUARDIA, T.; JUÁREZ, A. O.; GUERREIRO, E. Acute and chronic antiinflammatory effects of plant flavonoids. **II Farmaco**, v. 53, p. 421-424, 1998.

PHARMACOPEÉ Française. 10^{ème} ed. Paris: Adrapharm, 1988.

POLYDORO, M.; DE SOUZA, K. C. B.; ANDRADES, M. E.; DA SILVA, E.G.; BONATTO, F.; HEYDRICH, J.; DAL-PIZZOL, F.; SCHAPOVAL, E. E. S.; BASSANI, V. L.; MOREIRA, J. C. F. Antioxidant, a pro-oxidant and cytotoxic effects of *Achyrocline satureioides* extracts. **Life Sciences**, v. 74, p. 2815-2826, 2004.

PUHLMANN, J. **Immunologisch aktive Polysaccharide aus den Herbadrogen von *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. und *Arnica montana* L. sowie aus *Arnica montana* L. Zellkulturen**. 1989. Tese (Doutorado em Farmácia) – Fakultät für Chemie und Pharmazie, Ludwig-Maximillians-Universität, München, 1989.

PUHLMANN, J.; KNAUS, U.; TUBARO, L.; SCHAFER, W.; WAGNER, H. Immunologically active metallic ion-containing polysaccharides of *Achyrocline satureioides*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 8, p. 2617-2621, 1992.

RIVERA F.; GERVAZ, E.; SERE, C.; DAJAS, F. Toxicological studies of the aqueous extract from *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC (Marcela). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 95, p. 359-362, 2004.

ROJAS de ARIAS, A.; FERRO, E.; INCHAUSTI, A.; ASCURRA, M.; ACOSTA, N.; RODRIGUEZ, E.; FOURNET, A. Mutagenicity, insecticidal and trypanocidal activity of some Paraguayan *Asteraceae*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 45, p. 35-41, 1995.

ROTELLI, A. E.; GUARDIA, T.; JUÁREZ, A. O.; DE LA ROCHA, N. E.; PELZER, L. E. Comparative study of flavonoids in experimental models of inflammation. **Pharmacological Research**, v. 48, p. 601-606, 2003.

RUFFA, M. J.; FERRARO, G.; WAGNER, M.L.; CALCAGNO, M.L.; CAMPOS, R.H.; CAVALLARO, L. Cytotoxic effect of Argentine medicinal plant extracts on human hepatocellular carcinoma cell line. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 79, p. 335-339, 2002.

SANTOS, A. L. G. **Estudo tecnológico e biológico de soluções extrativas aquosas de *Achyrocline satureioides* (LAM) D.C. Compositae (Marcela)**. 1996. 149p. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1996.

SANTOS, A. L. G.; RIPOLL, D.; NARDI, N.; BASSANI, V.L. Immunomodulatory effect of *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. aqueous extracts. **Phytotherapy Research**, v. 13, p. 65-66, 1999.

SCHWINGEL, L. **Associação da 3- O -metilquercetina com β -ciclodextrina: avaliação da complexação e penetração cutânea**. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

SILVA, D. M.; HOLZSCHUH, M. H.; TEIXEIRA, H.; BASSANI, V. L. Feasibility of *Achyrocline satureioides* powder by spray-drying in pilot scale. In: **International Conference on Pharmaceutical Technology and Quality Control**, 06 a 09 de agosto de 2003, João Pessoa, PB, Brasil (resumo).

SIMÕES, C. M. O. **Investigação químico-farmacológica de *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. Compositae (Marcela)**. 1984. 186p. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Curso de Pós-graduação em Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1984.

SIMÕES, C. M.; SCHENKEL, E. P.; BAUER, L.; LANGELOH, A. Pharmacological investigations on *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. *Compositae*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 22, p. 281-293, 1988.

SIMÕES, C. M. O.; MENTZ, L.A .; SCHENKEL, E. P.; IRGANG, B. F.; STEHMANN, J. R. **Plantas da Medicina Popular no Rio Grande do Sul**, 5 ed. Porto Alegre: Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1998. p. 108-109.

SMITH, G. S.; THOMSEN, S. J.; MARKHAN, K. R.; ANDARY, C.; CARDON, D. Photostabilities of naturally occurring 5-hydroxyflavones, flavonols, their glycosides and their aluminium complexes. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 136, p. 87-91, 2000.

SONAGLIO, D. **Padronização de extrato hidroalcoólico das sumidades floridas de *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. *Compositae* (Marcela)**. 1987. 163p. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Curso de Pós-graduação em Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1987.

SOERTANO, S. **Comparaison entre divers extraits secs de *Strychnos ligustrina* BL. Aspects technologique, analitique et disponibilité**. Montpellier: Faculté de Pharmacie, 1980. Tese (Doutorado em Farmácia).

STILL, W. C.; KAHN, M.; MITRA, A. Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution. **Journal of Organic Chemistry**, v. 43, n. 14, p. 2923-2925, 1978.

SWARTZ, M. E.; KRULL, I. S. Validação de métodos cromatográficos. **Pharmaceutical Technology**, ed. Port., p. 12-20, 1998.

TEIXEIRA, H. F. **Avaliação da influência de adjuvantes farmacêuticos sobre características físicas, químicas, tecnológicas e farmacológicas de extratos secos nebulizados de *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. *Compositae* (Marcela)**. 1996. 146p. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1996.

USP 31. UNITED STATES PHARMACOPOEIA. 31st ed. Rockville: United States Pharmacopoeial Convention, 2008. 3v.

VARGAS, V. M.; GUIDOBONO, R. R.; HENRIQUES, J. A. Genotoxicity of plant extracts. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, supl. 2, p. 67-70, 1991.

WAGNER, H.; PROKSCH, A.; VOLLMAR, R. M.; ODENTHAL, S.; STUPPNER, H.; JURCIC, K.; LE TURDU, M.; FANG, J.N. Immunstimulierend wirkende Polysaccharide (Heteroglycane) aus höheren Pflazen. **Arzneimittelforschung**, v. 35, n. 7, p. 1069-1075, 1985.

WATERMANN, K. C.; ADAMI, R. C. Accelerating aging: Prediction of chemical stability of pharmaceuticals. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 293, p. 101-125, 2005.

WINDER, C. V.; WAX, J.; BEEN, M. A. Rapid foot volume measurements on unanesthetized rats, and the question of phenylbutazone effect on anaphylactoid edema. **Archives Internationales de Pharmacodinamie et de Therapie**, v. 112, p. 174-187, 1957.

WINTER, C. A .; RISLEY, E. A .; NUSS, G. W. Carragenin-induced oedema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 111, p. 544-547, 1962.

WU, W.; YAN, C.; LI, L.; LIU, Z.; LIU, S. Studies on flavones using liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1047, p. 213-220, 2004.

YOSHIOKA, S.; STELLA, V. **Stability of Drugs and Dosage Forms**. New York: Kluwer Academic/Plenum, 2000. cap. 2 e 6.

ZANON, S.M.; CERIATTI, F.S.; ROVERA, M.; SABINI, L.J.; RAMOS, B.A. Search for antiviral activity of certain medicinal plants from Cordoba, Argentina. **Revista Latinoamericana de Microbiologia**, v. 41, p. 59-62, 1999.

ZUANAZZI, J. A. Flavonóides. In: SIMÕES, C. M. O. [et. al] **Farmacognosia – da planta ao medicamento**, 6 ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2007. cap. 23, p. 499-526.

9.1 Anexo I

Tabela 9.1.1 – Parâmetros cromatográficos das substâncias presentes em PS40 e PS80 calculados pelo programa CLASS LC-10 obtido em equipamento de cromatografia de alta eficiência marca Shimadzu, equipado com bomba LC-10AD, injetor automático SIL-10 A e detector UV/vis SPD-10 A. Coluna *Shim-pack* CLC-ODS (M) RP-18, fase móvel metanol:ácido fosfórico 0,16 M (53:47 v:v) fluxo 0,6 mL/min.

PS40	k'	Número de pratos teóricos	Resolução	Fator de separação
P1	2,32	19283	1,54	1,07
P2	3,53	20641	2,48	1,10
P3	8,75	23156	0,98	1,04
CAF	0,35	9308	2,76	2,13
Q	3,21	17066	2,56	1,10
L	4,16	18174	4,54	1,18
3-O-MQ	4,36	18519	1,25	1,05
PS80	k'	Número de pratos teóricos	Resolução	Fator de separação
P4	1,41	10623	0,86	1,09
P5ab	2,19	9008	0,90	1,07
P6	2,60	13391	0,99	1,08
P7	3,57	18726	2,67	1,10
P8	8,88	22257	0,98	1,04
Q	3,26	16479	2,66	1,11
L	4,22	18312	1,36	1,09
3-O-MQ	4,42	18194	1,23	1,05

9.2 Anexo II

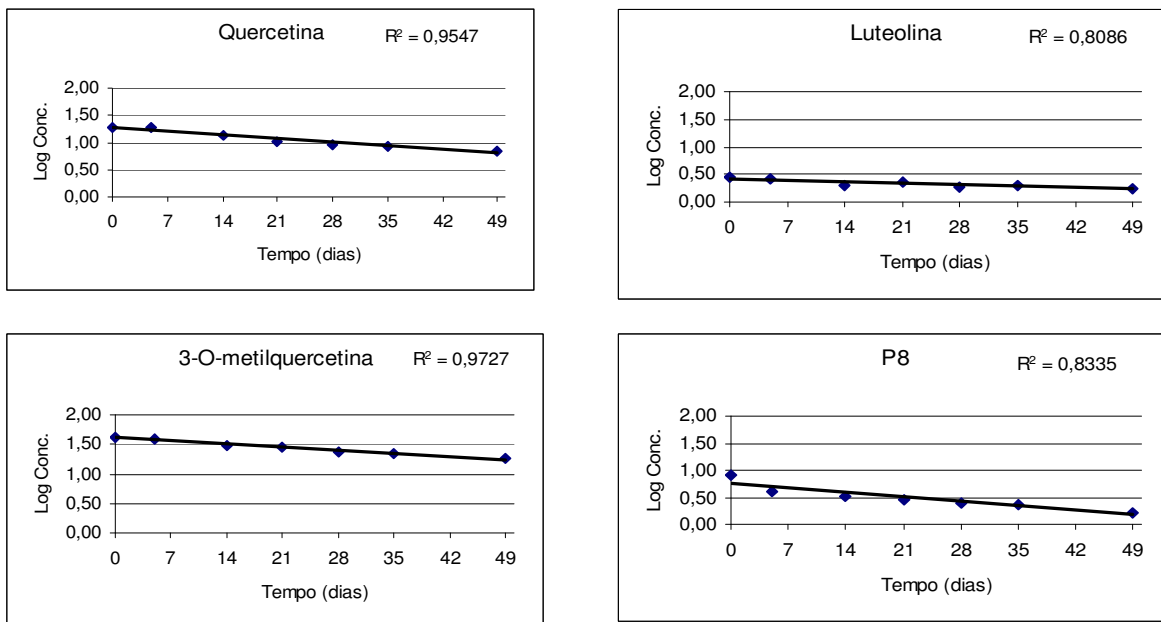


Figura 9.2.1 - Correlação entre o logaritmo da concentração e o tempo de exposição de quercetina, luteolina, 3-O-metilquercetina e P8 presentes no PS80 submetido ao ensaio de cinética de degradação térmica (80 °C) por 49 dias.

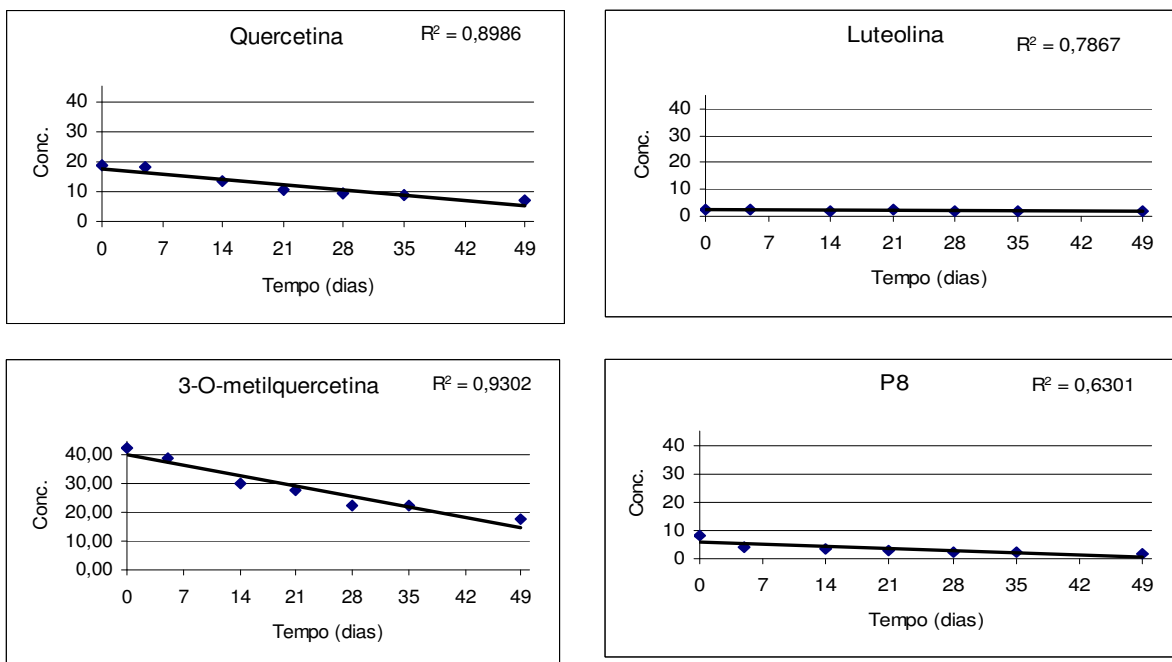


Figura 9.2.2 - Correlação entre a concentração e o tempo de exposição de quercetina, luteolina, 3-O-metilquercetina e P8 presentes no PS80 submetido ao ensaio de cinética de degradação térmica (80 °C) por 49 dias.

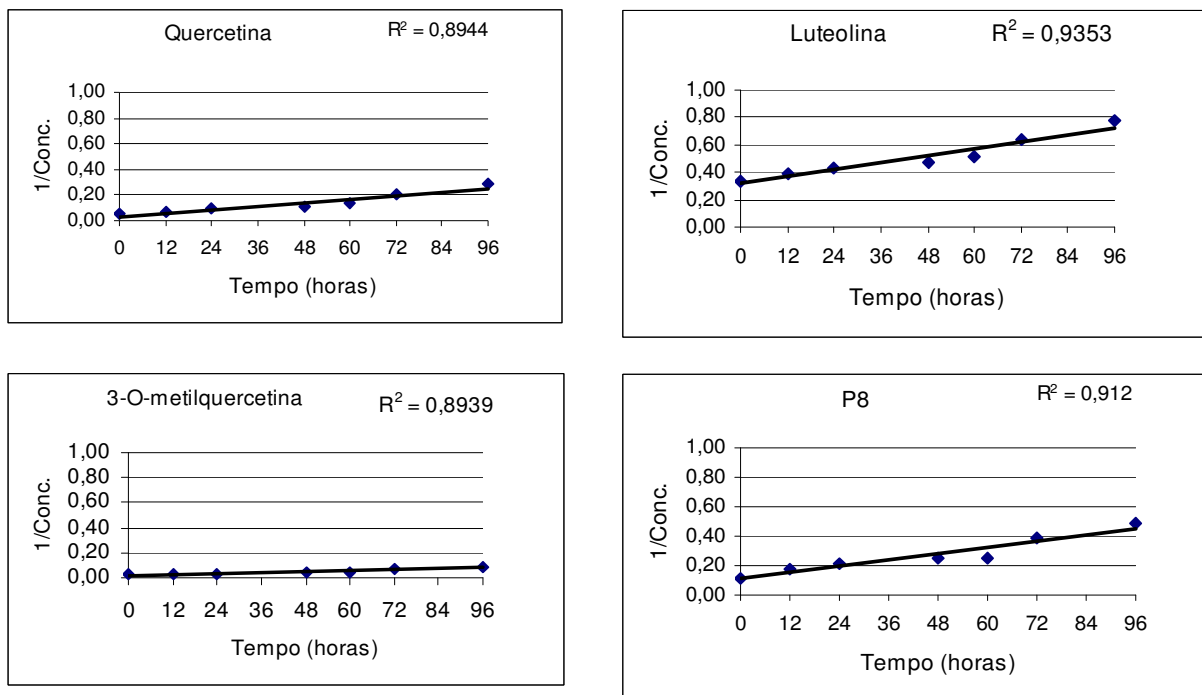


Figura 9.2.3 - Correlação entre o inverso da concentração e o tempo de exposição de quercetina, luteolina, 3-O-metilquercetina e P8 presentes no PS80 submetido ao ensaio de cinética de degradação sob radiação UV-C por 96 horas.

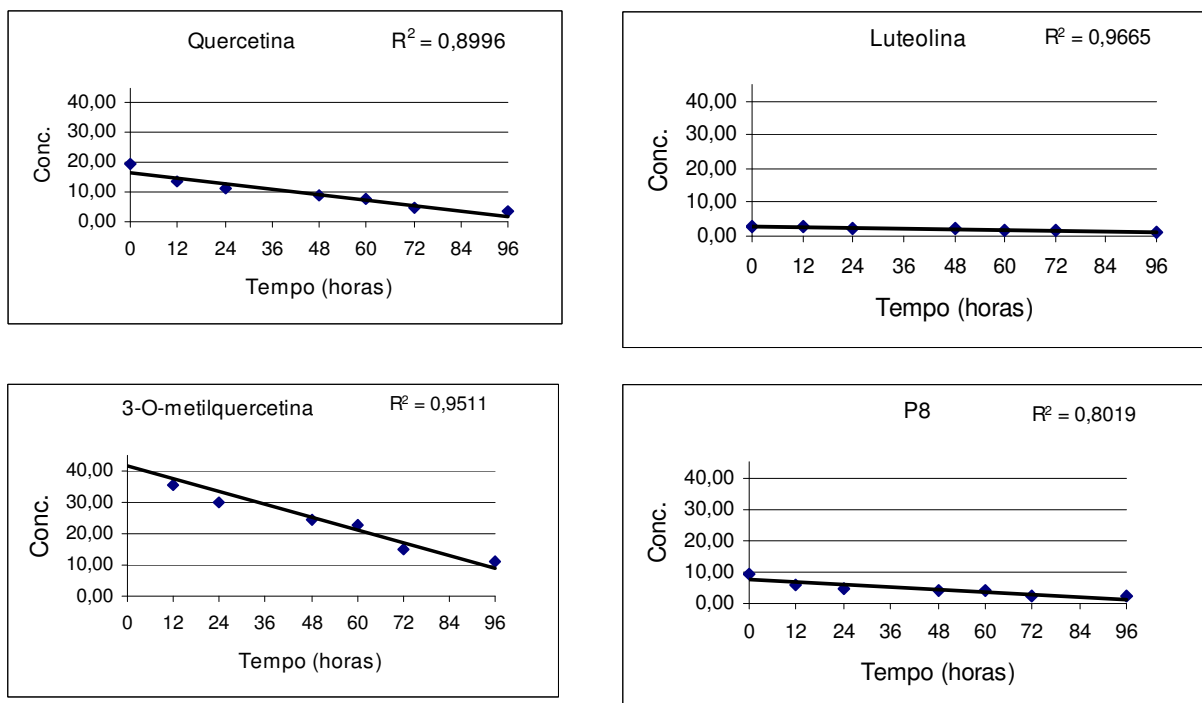


Figura 9.2.4 - Correlação entre a concentração e o tempo de exposição de quercetina, luteolina, 3-O-metilquercetina e P8 presentes no PS80 submetido ao ensaio de cinética de degradação sob radiação UV-C por 96 horas.

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

Thermal and photo stability of phenolic constituents of an *Achyrocline satureioides* spray-dried powder

M. H. HOLZSCHUH, D. M. SILVA, E. E. S. SCHAPOVAL, V. L. BASSANI

Received March 21, 2007, accepted April 20, 2007

Prof. Valquiria Linck Bassani, Faculdade de Farmácia, Av. Ipiranga 2752, 90610-0000, Porto Alegre, RS, Brazil
valqui@farmacia.ufrgs.br

Pharmazie 62: 902–906 (2007)

doi: 10.1691/ph.2007.12.7085

Thermal and the photo stabilities of an *Achyrocline satureioides* powder (SDP40) were evaluated in particular concerning the total polyphenol content as well as the main identified constituents quercetin, luteolin, 3-*O*-methylquercetin and caffeic acid. SDP40 presented good stability for nine months under normal storage conditions of 25 °C temperature and 60% relative humidity (RH). In accelerated term testing, 50 °C temperature and 90% RH and also in stress testing, 80 °C, caffeic acid and a non-identified constituent P3 were the most instable constituents. Luteolin and 3-*O*-methylquercetin were the most stable constituents. Quercetin presented an unusual behavior, improving its concentration after 1 month at 50 °C or 2 days at 80 °C exposition, followed by a decrease in its concentration. The hypothesis that this observation is related to the simultaneous decreasing of a non-identified peak P3 or to the hydrolysis of a non-identified precursor as a quercetin heteroside is being investigated. The SDP40 presented good stability against UV-C light when conditioned in amber or transparent containers, but it suffered degradation when stored in open-dishes. In summary, the total polyphenol content remains within acceptable limits of 10% under normal storage conditions for nine months. However, the LC polyphenol analysis demonstrated that the behavior of individual constituents has still to be enlightened.

1. Introduction

Achyrocline satureioides (Lam) DC, Asteraceae, is a medicinal plant distributed in subtropical South America, used in folk medicine of the South of Brazil, Uruguay, Paraguay and Argentine as anti-inflammatory, antiulcerative and antispasmodic (Simões et al. 1998).

The flavonoids quercetin, luteolin and 3-*O*-methylquercetin have been regarded as the main constituents of the inflorescences ethanol extracts. Several pharmacological activities have been related to the presence of these constituents, like antioxidant, anti-inflammatory, anti-ulcerative, anti-hepatotoxic, antispasmodic, antiplatelet aggregation, vasodilatory and antiviral effects (Husain et al. 1987; Formica and Regelson 1995; Pelzer et al. 1998; Harbone and Smith 2000; Di Carlo et al. 2002; Betega et al. 2004; Polydoro et al. 2004).

Liquid extracts, such as hydroethanolic extracts, are still the most widely used herbal pharmaceutical preparations due to their low cost and easiness to prepare. However, the low stability of herbal liquid preparations, dramatically affected by ethanol content and the lability of the constituents represent the main disadvantage of this type of products (Bilia et al. 2002).

Spray drying is a technique widely employed for producing powders containing some heat sensitive constituents due to the quick solvent evaporation (Broadhead et al. 1992). This characteristic made this technique particularly

useful for preparing medicinal herbal powders from the corresponding liquid extracts (Lemos Senna et al. 1997). Spray dried powders from *Achyrocline satureioides* inflorescences have been previously reported being the process and the product deposited as a patent (Bassani et al. 2001). More recently, an *Achyrocline satureioides* spray-dried powder obtained from an extractive solution containing 40% (v/v) ethanol, (SDP40), has been reported as presenting higher anti-inflammatory activity than that obtained from liquid extract prepared with ethanol 80% or hot water as solvent (De Souza et al. 2007).

Thus, although several biological activities have been already demonstrated for *Achyrocline satureioides* products, no studies concerning its stability have been reported.

In this context, the present work was designed to evaluate the thermal and photo stability of an *Achyrocline satureioides* spray dried powder (SDP40) where the main polyphenols were selected as reference substances, quercetin, luteolin, 3-*O*-methylquercetin and caffeic acid.

2. Investigations, results and discussion

2.1. Thermal stability assay

2.1.1. Long term testing

This test was carried out under room-controlled temperature, simulating storage conditions.

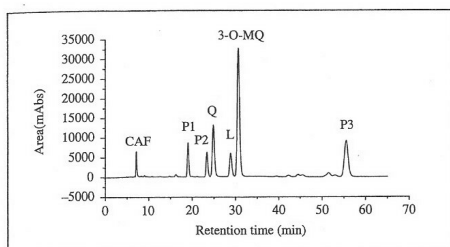


Fig. 1: Fingerprint chromatogram from SDP40

Samples of SDP40 (1 g) were stored in amber or transparent glass flasks. They were analyzed after 0, 3, 6, 9 and 12 months.

The LC profile of the SDP40 at the time zero is shown in Fig. 1, where the presence of the three major polyphenols quercetin ($R_t = 25.68$), 3-*O*-methylquercetin ($R_t = 31.87$) and a non-identified peak P3 ($R_t = 58.82$) can be observed. Luteolin ($R_t = 29.91$), caffeic acid ($R_t = 7.14$) and two non-identified compounds P1 ($R_t = 19.60$) and P2 ($R_t = 24.21$) are also present in lower concentration than the first ones.

The sensorial characteristics of the SDP40 did not change during all the test period (12 months), yellow fine powder and the peculiar smell. The loss on drying of the samples, measured before the polyphenol assay, were in the range from 4.82% to 5.85%.

For herbal medicines with unspecified active compounds, the stability of the product is evaluated by quantifying a group of compounds. In this case, variations of $\pm 10\%$ from the initial content is stated as acceptable (Hefendehl 1987; EMEA 2001). For *Achyrocline satureioides*, considering that the polyphenols play an important role in the antiinflammatory (Simões et al. 1988) and also in the antioxidant activities (Polydoro et al. 2004), these constituents were selected for evaluating the stability of SDP40. Moreover, the low polyphenol stability is an additional reason for selecting this class of compounds as indicator of stability. The SDP40, submitted to long term testing, demonstrated good stability regarding the total polyphenols, which represent the sum of the four main constituents, quercetin, luteolin, 3-*O*-methylquercetin and caffeic acid. Figure 2 shows that the polyphenol content remained within an acceptable range for 9 months ($\pm 10\%$). No significant

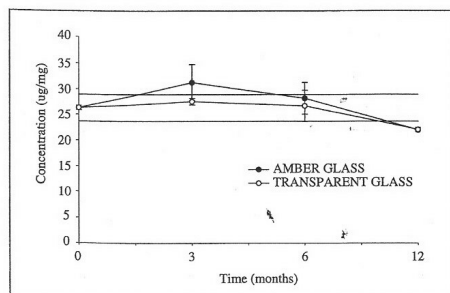


Fig. 2: Total polyphenol concentration in SDP40 (25 °C/60% RH) (caffeic acid, P1, P2, quercetin, luteolin, 3-*O*-methylquercetin and P3). Lines represent 10% of the onset value

Pharmazie 62 (2007) 12

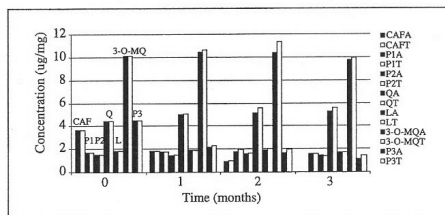


Fig. 3: Polyphenol concentration in SDP40 under accelerated conditions (50 °C/90% RH), A = amber flask and T = transparent flask

differences were observed in the total polyphenol content among samples conditioned in amber or transparent flasks, denoting that, in solid state, the polyphenol fraction remained stable under both storage conditions.

2.1.2. Accelerated term testing

This test was carried out according to the Brazilian official requirements for drugs (ANVISA/BR 2002). Temperature at 50 °C and 90% relative humidity were the conditions employed during the 3 months test; a climatic chamber (Nova Ética mod. 420 CLD) was used to obtain these conditions. Samples of SDP40 (1 g) were stored in each amber or transparent flask containers and analyzed after 0, 1, 2 and 3 months.

Significant changes in sensorial properties of SDP40 were observed during the test. After 3 months the SDP40 samples became brown and smelling acetic. The residual humidity improved from 4.42% to 7.47% in the samples conditioned in amber flasks and from 4.42% to 5.57% for the samples maintained in transparent flask containers.

The variation of the polyphenol content during the period of 3 months is shown in Fig. 3. Significant changes can be observed at this condition, especially regarding the caffeic acid and compound P3 contents. After three months, caffeic acid is not detected anymore and the compound P3 had its content reduced to 25.3% (amber flask) and 31.5% (transparent flask), from its initial content. By the other hand, after 3 months, the content of quercetin improved from $4.4 \pm 0.1 \mu\text{g}/\text{mg}$ to $5.3 \pm 0.1 \mu\text{g}/\text{mg}$ when conditioned in amber flask and from $4.4 \pm 0.1 \mu\text{g}/\text{mg}$ to $5.6 \pm 0.1 \mu\text{g}/\text{mg}$ when conditioned in transparent flask container. These increase in quercetin content corresponds, respectively, to 120% and 127% of the initial concentration. The explanation for this phenomenon is still unclear, however, the hypothesis of conversion of P3 in quercetin was based on the simultaneous decrease in P3 concentrations, during the first month. Although this hypothesis cannot be completely ruled out, the observation that, after two months, the content of P3 continued decreasing without the corresponding increase in quercetin concentration did not corroborate this hypothesis. The hypothesis of hydrolysis of a quercetin conjugated form, as quercetin glycoside, can be also formulated since it is common in herbal medicinal products (Heigl and Franz 2004). Investigations in view to enlighten this phenomenon are running in our laboratory.

2.1.3. Stress testing

A temperature of 80 °C was chosen for evaluating the changes that could be occurring in the polyphenol consti-

903

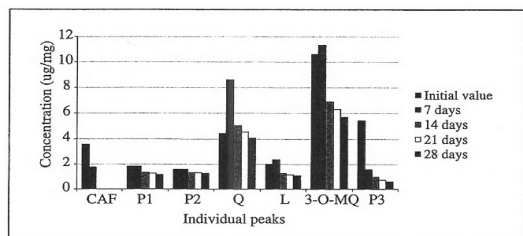


Fig. 4: Polyphenol concentration in SDP40 under stress conditions in unprotected open-dishes (80 °C/28 days)

tments present in SDP40, specially the quercetin, luteolin, 3-*O*-methylquercetin, caffeic acid and also with P3, under stress conditions. The SDP40 samples (1 g) were conditioned in unprotected open-dishes. The results of polyphenol content, after 28 days, are presented in Fig. 4.

After day seven the fine and yellow powder became brown to deep brown and presented a smell characteristic of sugar degradation which became acetic later. The SDP40 residual humidity was reduced from 4.8% to 0.5%.

At the first seven days at 80 °C, we did observe a significant increase in the quercetin (Q) concentration (almost 2 fold), from $4.4 \pm 0.1 \mu\text{g}/\text{mg}$ to $8.6 \pm 0.1 \mu\text{g}/\text{mg}$. After 14 days the quercetin concentration decreased, reaching the initial value. In contrast the caffeic acid content showed a significant decrease during the first seven days, from $3.5 \pm 0.1 \mu\text{g}/\text{mg}$ to $1.2 \pm 0.1 \mu\text{g}/\text{mg}$ disappearing, totally, after fourteen days. Also P3 decreased in its concentration from $5.4 \pm 0.07 \mu\text{g}/\text{mg}$ to $0.5 \pm 0.03 \mu\text{g}/\text{mg}$, after 28 days.

Luteolin and 3-*O*-methylquercetin presented an intermediate stability, showing decreases of 46.5% and 46.8% respectively at the end of the test period. P1 and P2 were the less unstable constituents showing decreases, of 36.7% and 21.0% respectively, after 28 days 80 °C exposure in unprotected open-dishes.

No degradation peaks appeared in the fingerprint chromatogram during 28 days.

In view to determine, more precisely, what time the quercetin content increase, samples of SDP40 were exposed to stress conditions, 80 °C for a week and quercetin was determined at 2, 5 and 7 days. The results presented in Fig. 5 demonstrate that at 48 hours exposure, the highest amount of quercetin was detected, from $4.09 \pm 0.13 \mu\text{g}/\text{mg}$ ($t = 0$) to $6.55 \pm 0.05 \mu\text{g}/\text{mg}$ ($t = 48 \text{ h}$), about 160% of the initial SDP40 quercetin concentration.

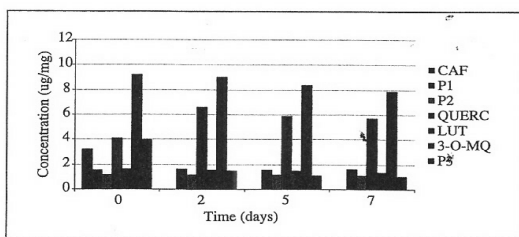


Fig. 5: Polyphenol concentration of SDP40 under stress conditions in unprotected open-dishes (80 °C/7 days)

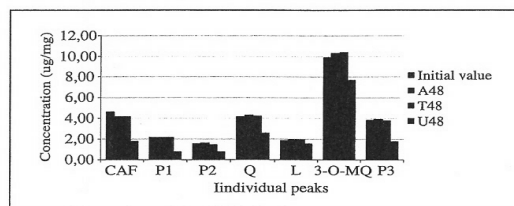


Fig. 6: Polyphenol concentration in SDP40 submitted to UV-C radiation (Light express LE UV, 254 nm, 30 W) initial value and after exposure in A = amber flask, T = transparent flask and U = unprotected for 48 h

2.2. Photo stability assay

The samples were submitted to UV-C radiation (Light express LE UV, 254 nm, 30W) in order to detect the stability of the polyphenol presented in SDP40, conditioned in different containers: amber flask, transparent flask and open-dishes.

The sensorial characteristics of the SDP40 did not change during all the experiment period, maintaining its original properties. The loss on drying of the samples, measured before the polyphenol assay, was in the range of 4.71% to 4.87% for the samples conditioned in amber flasks; 4.71% to 4.57%, for the samples contained in the transparent flasks and 4.71% to 2.77% in open-dishes denoting that no significant differences were provided by amber or transparent flasks. In contrast the samples conditioned in open-dishes presented reduction of the humidity content after 48 h of exposure, reaching a value of 2.77%.

The polyphenol content in SDP40, when samples were conditioned in amber or transparent flasks, presented stable behavior during the time of the experiments, 48 h (Fig. 6). However, when SDP 40 was stored in open-dishes the polyphenol concentration showed a significant decrease in concentration, especially for quercetin, 3-*O*-methylquercetin, caffeic acid (Fig. 7), P1, P2 and P3 (Fig. 6). Luteolin showed the highest stability under UV light radiation.

Taken together, the results of photo stability tests demonstrated that the SDP40 shows sensitivity against UV light radiation when conditioned in open-dish, while amber and transparent flasks demonstrated efficiency to protect the SDP40, during 48 hours of light exposure.

In conclusion, based on the total polyphenol content, SDP40 shows to be stable for nine months, when conditioned in amber or transparent flasks at storage conditions of 25 °C of temperature and 60% relative humidity. Similar behavior was observed in the photo stability assay, where we observed good stability of SDP40 conditioned in amber or transparent flasks against UV-C radiation (Light express LE UV, 254 nm, 30W) for 48 h. We also demonstrated that SDP40, despite being a solid product, is unstable against high temperature 80 °C and UV-light when it was stored in unprotected open-dishes. The LC polyphenol analysis demonstrated also that the behavior of individual constituents have still to be better enlightened, especially the peak in quercetin content after 1 month at 50 °C or 2 days at 80 °C exposition, respectively.

3. Experimental

3.1. Chemicals

The following chemicals were used: methanol for liquid chromatography (LC grade, Merck, Darmstadt, Germany) and phosphoric acid (Merck,

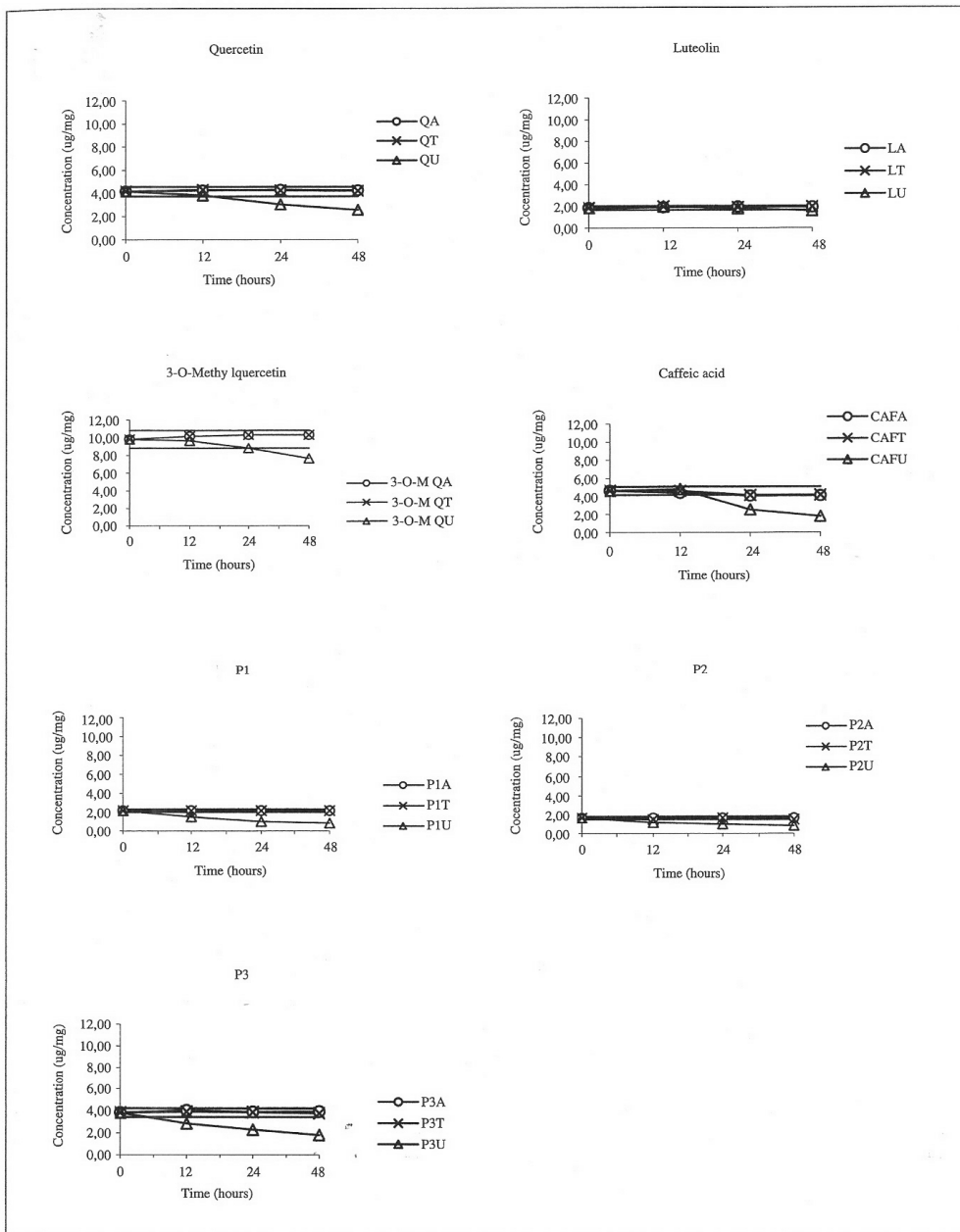


Fig. 7: Polyphenol content in SDP40 samples submitted to UV-C radiation (Light express LE UV, 254 nm, 30 W) A = amber flask, T = transparent flask and U = unprotected. Lines represent 10% of the onset value

Darmstadt, Germany), water (Milli-Q system, Millipore, Bedford, MA, USA), polysorbate 80 (Delaware, Porto Alegre, Brazil), luteolin (Sigma, St. Louis, MO, USA), caffeic acid (Sigma, St. Louis, MO, USA) quercetin (Merck, Darmstadt, Germany) and colloidal silicon dioxide (CSD) (Degussa, Düsseldorf, Germany).

3.2. Preparation of *Achyrocline satureioides* spray dried powder (SDP40)

The spray-dried powder was prepared following the procedure described in the Brazilian patent (Bassani et al. 2001). Briefly, inflorescences of *Achyrocline satureioides* Lam. (DC), Asteraceae, were extracted by maceration, with ethanol 40% (v/v) in order to obtain the extractive solution. The ethanol content was reduced to 10% (v/v), colloidal silicon was added then, the dispersion was dried, using a Production Minor Spray Dryer plant – NIRO A/S, under the following operating conditions: inlet/outlet temperature 180/110 °C; 10,400 rpm and feed rate 130 mL/min. The SDP40 contained 50% of *A. satureioides* dry residue and 50% of solid excipients.

3.3. LC analysis

3.3.1. Sample preparation

The SDP40 (0.5 g) was extracted with ethyl acetate for two hours under magnetic stirring. The supernatant was filtered through a filter paper (grade 1:11 µm, Whatman, UK) and the volume was made up to a 50 ml with the same solvent. An aliquot of 25.0 mL was evaporated, the residue was dissolved in methanol and transferred to a 25.0 mL volumetric flask. From this solution an aliquot of 2.0 mL was diluted to 20.0 mL with methanol 53% (v/v). This solution was filtered through 0.45 µm membrane filter (HVHP-Millipore) and analyzed by LC (De Souza 2002). This procedure was repeated three times for each sample, moreover each point was injected three times in the LC equipment.

3.3.2. Standard curves

Quercetin and luteolin were used as external standards; they were dissolved in a mixture of methanol: water (53:47, v/v) yielding concentrations of 0.1; 0.2; 0.3; 0.4; 0.5 and 10.0 µg/mL. The linear equations (n = 6) were $y = 115873x - 27266$ ($r = 0.9991$), $y = 122605x - 13196$ ($r = 0.9998$) and $y = 28771x - 2715,09$ ($r = 0,9999$) for quercetin, luteolin and caffeic acid, respectively.

3.3.3. Polyphenol assay in the samples

The content of quercetin in the SDP40 samples and that corresponding to the compound P3 were calculated by the quercetin linear equation. The content of caffeic acid by the corresponding equation and the concentrations of luteolin, 3-*O*-methylquercetin, compounds P1 and P2 were calculated by the linear equation of luteolin. Total polyphenol content in the samples was obtained by the sum of the content of the quercetin, luteolin, 3-*O*-methylquercetin and caffeic acid.

3.3.4. Chromatographic conditions

The quantitative analysis was carried out according the method described by De Souza et al. (2002). A Shimadzu liquid chromatograph equipped with a LC-10 AD pump, an auto sampler SIL-10 A and UV-vis detector SPD-10 A controlled by CLASS LC-10 software were used. The column was a Shim-pack CLC-ODS (M) RP-18, 5 µm, 250 × 4 mm i.d. and a pre-column Waters (10 × 4 mm i.d.) packed with Bondapak C-18 10 µm (Waters, Milford, USA) was employed. The mobile phase consisted of a mixture, methanol: phosphoric acid 0.16 M (53:47, v/v), filtered through a 0.45 µm membrane filter (Millipore-HVHP). The flow rate was 0.6 mL/min; the injection volume was 20 µL and the peaks were detected at 362 nm. In order to check the peak purity of each compound Waters Millennium DAD was used. The absorbance was measured from 200 to 800 nm every 1 s with 4.8 nm resolution.

3.4. SDP40 thermal stability

The thermal stability of SDP40 was carried out in triplicate at three different temperatures and relative humidity (RH) conditions:

- 25 °C ± 2 (60% RH ± 5), for 12 months (long term testing); this condition was obtained in a room-controlled temperature, documented by manual measurement of temperature and humidity. The samples were conditioned in amber or transparent glass flasks. The SDP40 LC analyses were carried out 0, 3, 6, 9 and 12 months.
- 50 °C ± 2 (90% RH ± 5), for 3 months (accelerated testing); this condition was obtained in a climatic chamber (Nova Ética mod. 420 CLD). The samples were conditioned in amber or transparent glass flasks. The SDP40 LC analyses were carried out at 0, 1, 2 and 3 months.
- 80 °C ± 2, for 28 days (stress testing); a conventional drying oven was used for obtaining this condition (Biomatic mod. 1305). The samples were conditioned in unprotected open-dishes. The SDP40 LC analyses were carried out at 0, 7, 14, 21 and 28 days.

3.5. SDP40 photo stability

The photo stability of SDP40 was performed in triplicate at three different storage conditions: amber flasks, transparent flasks or open-dishes.

The samples were submitted to UV-C radiation (Light express LE UV, 254 nm, 30W) in light chamber, with internal cover by mirror. The LC analyses were carried out at 0, 12, 24 and 48 h.

Samples of SDP40 (1 g) was stored in each amber or transparent tight flask containers, or also, in unprotected open-dishes. The polyphenol content was determined in all of samples by LC method, taking into account the residual humidity after stability tests.

3.6. Loss on drying

Values of loss on drying were obtained by gravimetric method, according to the Brazilian Pharmacopoeia (Farm. Bras. 1988).

3.7. Sensorial characteristics

The samples from thermal and photo stability tests were analyzed by their characteristics of smell, color and appearance of the powder, in all times, before the LC analysis.

3.8. Abbreviations

P1, P2 and P3 not identified peaks, CAF = Caffeic acid, Q = Quercetin, L = Luteolin, 3-*O*-MQ = 3-*O*-methylquercetin, A = amber flask, T = transparent flask, U = unprotected.

References

- ANVISA – Resolução – RE nº 560, de 2 de abril de 2002. Guia para realização de estudos de estabilidade – 2/2002. Publicado no D.O.U. de 03/04/2002. <http://www.anvisa.gov.br>
- Bassani VL, Teixeira HF, Ortega GG, Lemos Senna E, Simões CMO, Sonaglio D, Petrovick PR (2001) Processo para obtenção de extratos de *Achyrocline satureioides* e Produto obtido. PI 103468-5, INPI/BR.
- Betega JMR, Teixeira HF, Bassani VL, Barardi CRM, Simões CMO (2004) Evaluation of antihyperlipidemic activity of standardized extracts of *Achyrocline satureioides*. *Phytother Res* 18: 819–823.
- Bilia AR, Bergonzi MC, Gallori S, Mazzi G, Vincieri FF (2002) Stability of the constituents of Calendula, Milk-thistle and Passionflower tinctures by LC-DAD and LC-MS. *J Pharm Biom Anal* 30: 613–624.
- Broadhead J, Edmond Rouan SK, Rhodes CT (1992) The spray drying of pharmaceuticals. *Drug Dev Ind Pharm* 18: 1169–1206.
- De Souza KCB, Schapoval EES, Bassani VL (2002) LC determination of flavonoids: separation of quercetin, luteolin and 3-*O*-methylquercetin in *Achyrocline satureioides* preparations. *J Pharm Biom Anal* 28: 771–777.
- Di Carlo G, Mascolo, Izzo AA, Capasso, F (1999) Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sci* 65: 337–353.
- EMEA – The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. Note for Guidance on Quality of Herbal Medicinal Products. London, 2001. <http://emea.europa.eu/>
- FARMACOPÉIA BRASILEIRA 4ª Ed. São Paulo: Atheneu, 1988.
- Formica JV, Regelson W (1995) Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem Toxicol* 33: 1061–1080.
- Heigl D, Franz G (2003) Stability testing on typical flavonoid containing herbal drugs. *Pharmazie* 58: 881–885.
- Harbone JB, Williams CA (2000) Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55: 481–504.
- Hefendehl FW (1987) Requirements of the Licensing Authority of Federal Republic of Germany concerning the Stability Testing of Drug Products, with special reference to Phytopharmaceuticals. In: *Stability Testing of Drug Products*. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, p. 104–112.
- Husain SR, Cilliard J, Cilliard P (1987) Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. *Phytochemistry* 26: 2489–2491.
- Lemos-Senna E, Petrovick PR, Gonzalez Ortega G, Bassani VL (1997) Preparation and characterization of spray-dried powders from *Achyrocline satureioides* (Lam) DC extracts. *Phytother Res* 11: 123–127.
- De Souza KCB, Schapoval EES, Bassani VL (2007) Influence of excipients and technological process on anti-inflammatory activity of quercetin and *Achyrocline satureioides* (Lam) DC extracts by oral route. *Phytomedicine* 14: 102–108.
- Pelzer LE, Guardia T, Juarez AO, Guerreiro E (1998) Acute and chronic antiinflammatory effects of plant flavonoids. *Farmacologia* 53: 421–424.
- Polydoro M, De Souza KCB, Andrades ME, Da Silva EG, Bonatto F, Heydrich J, Dal-Pizzol F, Schapoval EES, Bassani VL, Moreira JCF (2004) Antioxidant, a pro-oxidant and cytotoxic effects of *Achyrocline satureioides* extracts. *Life Sci* 74: 2815–2826.
- Simões CMO, Mentz LA, Schenkel EP, Irgang BF, Stehmann JR (1998) Plantas da Medicina Popular no Rio Grande do Sul. 5 ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 108–109.
- Simões CM, Schenkel EP, Bauer L, Langeloh AJ (1988) Pharmacological investigations on *Achyrocline satureioides* (Lam) DC Compositae. *J Ethnopharmacol* 22: 281–293.

9.4 Anexo IV



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA PROPESQ

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

RESOLUÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul analisou o projeto:

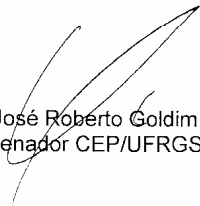
Número:2003249

Título do projeto: Estudo da estabilidade de produto seco obtido a partir de Achyrocline satureioides (LAM.)D.C. - Proc. Nº 23078.034645/03-55

Investigador(es) principal(ais): Valquíria Linck Bassani (Pesq. Resp.)/ Elfrides Rva Scherman Shapoval/ Maribete Holszchuh

O mesmo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS, conforme parecer em anexo, na reunião n.27, ata n. 48, por estar adequado ética e metodologicamente e de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde.

Porto Alegre, 27 de maio de 2004.


Prof. José Roberto Goldim
Coordenador CEP/UFRGS

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
Av. Paulo Gama, 110 - 7º andar Porto Alegre-RS 90046-900
Fone: 0xx(51) 316.3629 Fax: 0xx(51) 316.4085 E-mail: pro-reitoria@propesq.ufrgs.br

9.5 Anexo V

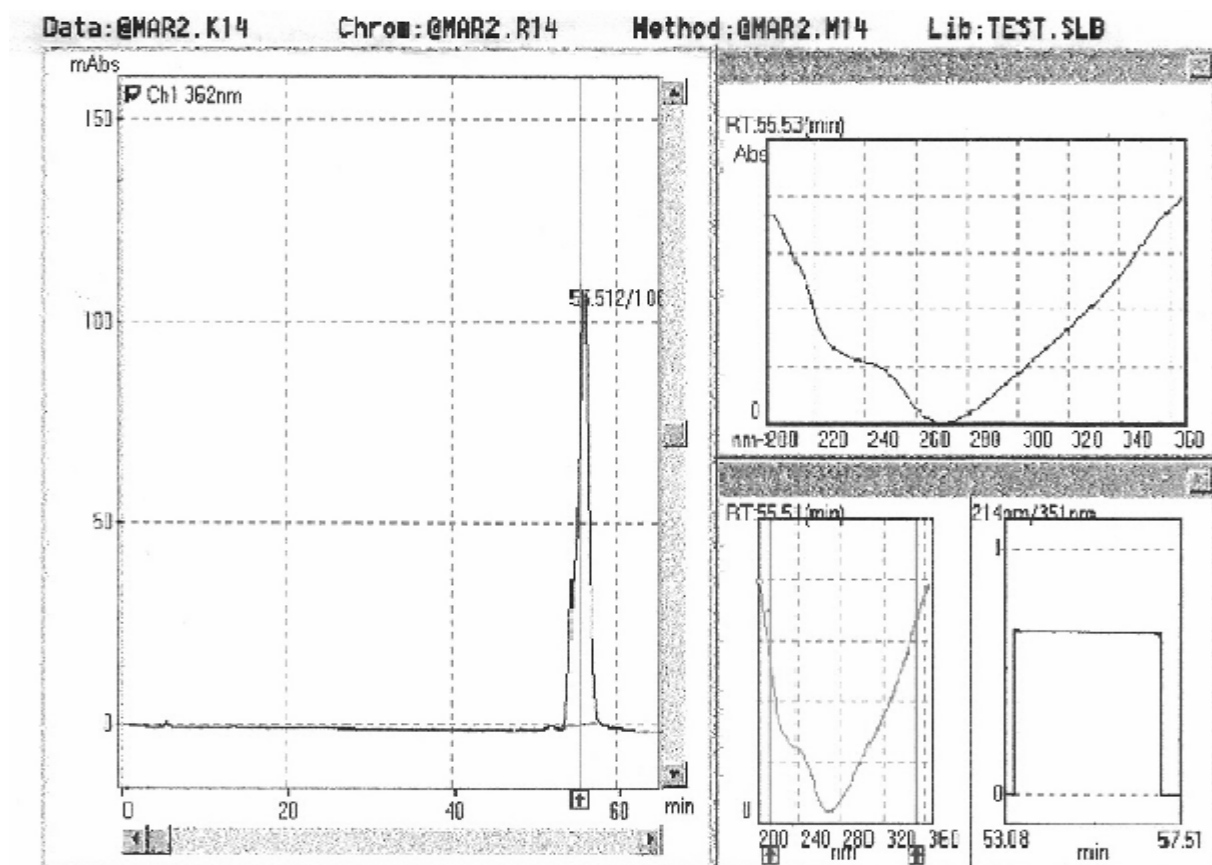


Figura 9.5.1 – Composto P8 isolado e purificado, determinação da pureza do pico por CLAE com detecção por arranjo de diodos, coluna *Shim-pack* CLC-ODS (M) RP-18, fase móvel metanol:ácido fosfórico 0,16 M (53:47 v:v), fluxo 0,6 mL/min e detecção em 200-400 nm.

9.6 Anexo VI

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Nível: Doutorado

Área de concentração: PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS

Título: Estudo da Estabilidade de Produtos Secos Obtidos a partir de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC.
Asteraceae.

Doutoranda: MARIBETE HOMRICH HOLZSCHUH

PARECER

O presente trabalho teve como objetivo estudar a estabilidade dos extratos secos de *A. satureioides* frente à temperatura e à luz. O trabalho aborda um tema de grande relevância dentro do contexto de desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos, isto que poucos estudos são descritos na literatura sobre a estabilidade destas preparações. O trabalho experimental foi bem delineado e envolveu a utilização de várias metodologias de análise, cuja aplicação resultou em vários resultados importantes e inéditos. Por estas razões sou de parecer favorável à aprovação e concessão do título de doutor a Maribete

Homrich Holzschuh

Elenara Lemos Senna
Profa. Dr. Elenara Lemos Senna
Porto Alegre, 19/09 / 2008.

[versão 28.JAN2005]

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Nível: Doutorado

Área de concentração: PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS

Título: Estudo da Estabilidade de Produtos Secos Obtidos a partir de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC.
Asteraceae.

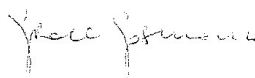
Doutoranda: MARIBETE HOMRICH HOLZSCHUH

PARECER

A doutoranda utilizou literatura ampla e
obteve resultados satisfatórios compatíveis com os
objetivos propostos. Esta importância e a densidade
trazida pelos artigos obtidos, considerando a
relevância do tema e a publicação de trabalhos
científicos, não de natureza secundária à
aprovação da tese.

Profa. Dr. Grace Gosmann
Porto Alegre, 19/09/08

2008.



[versão 28.JAN2005]

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÉUTICAS**

Nível: Doutorado

Área de concentração: PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS

Título: Estudo da Estabilidade de Produtos Secos Obtidos a partir de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC.
Asteraceae.

Doutoranda: MARIBETE HOMRICH HOLZSCHUH

PARECER

Após receber o relatório da doutoranda referente a um trabalho de doutorado de Maribete H. Holzschuh sobre a estabilidade de produtos secos obtidos a partir de uma planta comestível em dois países: o Brasil e a Alemanha. O trabalho é bem elaborado e apresenta resultados satisfatórios. É um trabalho de doutorado e apresenta resultados satisfatórios. É um trabalho de doutorado e apresenta resultados satisfatórios.

É um trabalho de doutorado e apresenta resultados satisfatórios. É um trabalho de doutorado e apresenta resultados satisfatórios. É um trabalho de doutorado e apresenta resultados satisfatórios.

Paulo Schneider
Prof. Dr. Paulo Henrique Schneider
Porto Alegre, 29 de setembro 2008.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Nível: **Doutorado**

Área de concentração:
PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS

Título: **Estudo de estabilidade de produtos secos obtidos a partir de
Achyrocline satureioides (Lam.) DC . Asteraceae**

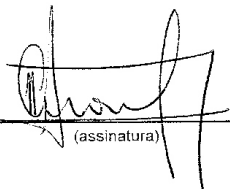
Doutorando: **Maribete Homrich Holzschuh**

P A R E C E R

O tema da tese envolve aspectos de estabilidade, sob os pontos de vista físico-químico e biológico, de dois produtos de composição complexa, de origem vegetal. Trata-se, assim, de uma contribuição inovadora ao melhor conhecimento sobre este tipo de produto. O manuscrito encontra-se bem estruturado, com referenciais atualizados, que embasam adequadamente os métodos escolhidos e a interpretação dos resultados. A organização dos dados permite facilitar a compreensão das interpretações e conclusões. Alguns achados poderiam ser tratados com maior profundidade e propriedade, o que resultaria na melhor inferência sobre alguns fenômenos observados e sua compreensão. Assim sendo, considerando o desempenho da doutoranda na defesa de sua tese e no desenvolvimento de seu tema de pesquisa, sou de parecer favorável à concessão do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Porto Alegre, 19 de setembro de 2008

Avaliador: Prof. Dr. Pedro Ros Petrovick
Lotação: Faculdade de Farmácia/UFRGS



(assinatura)

