



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

**Avaliação da estabilidade de extratos, frações e flavonoides
C-glicosídeos presentes em *Cecropia glaziovii***

Caroline Flach Ortmann

Florianópolis
2013

Caroline Flach Ortmann

**Avaliação da estabilidade de extratos, frações e flavonoides
C-glicosídeos presentes em *Cecropia glaziovii***

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do Grau de Mestre em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Henrique Reginatto.

Co-orientador: Prof^ª. Dr^ª. Simone Gonçalves Cardoso.

Florianópolis
2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Ortmann, Caroline Flach
Avaliação da estabilidade de extratos, frações e
flavonoides C-glicosídeos presentes em *Cecropia glaziovii* /
Caroline Flach Ortmann ; orientador, Flávio Henrique
Reginato ; co-orientadora, Simone Gonçalves Cardoso. -
Florianópolis, SC, 2013.
122 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-
Graduação em Farmácia.

Inclui referências

1. Farmácia. 2. *Cecropia glaziovii*. 3. Flavonoides C-
glicosídeos. 4. Estudos de estabilidade. I. Reginatto,
Flávio Henrique. II. Cardoso, Simone Gonçalves. III.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-
Graduação em Farmácia. IV. Título.

*A minha querida avó Alícia, pelo seu carinho e amor;
A minha mãe Solange, por tudo, sempre;
A minha irmã Bruna, pela amizade e parceria.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço acima de tudo a Deus, pela oportunidade da vida, por me dar saúde, força e luz.

Ao meu orientador, Professor Dr. Flávio Henrique Reginatto, por ter aceitado me orientar desde o primeiro semestre da faculdade. Agradeço a confiança que depositou em mim durante todo este período, a amizade em todos os momentos, e a “paternidade científica”.

À minha co-orientadora, Professora Dra. Simone Gonçalves Cardoso, por ter aceitado me orientar neste trabalho com muita atenção, paciência, e apoio em tudo que precisei. Muito obrigada!

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina, especialmente aqueles em que fui aluna nas disciplinas cursadas durante o mestrado.

A CAPES pela bolsa concedida.

Aos meus colegas e amigos do laboratório, Didi, Taty, Cacá, Fer, Dessa, Carlos, Vitor, Ana C., Sil, Bel, Éverson, Si, Teca, Karen, Lara, Ana, Vanessa, Luiz, Solomon, Dani, Fran, Tauana, Aline, Junia, que me ajudaram, ensinaram e acompanharam o meu crescimento desde o período de iniciação científica até o mestrado, e por todos os momentos de descontração que foram e são muitos, e tornam este grupo muito especial em minha vida. Também às técnicas do laboratório Claudinha e Solange, por estarem sempre dispostas a ajudar e também pelos momentos de descontração. Muito obrigada amigos!

Às alunas de iniciação científica Fernanda e Pâmela, por terem demonstrado muita dedicação e amizade durante este trabalho. Muito obrigada!

Aos amigos do laboratório de controle de qualidade, Manu, Gis, Lari e Paulo, em especial a Gabi, pela ajuda e atenção durante o mestrado sempre que precisei. E as amigas que a pós-graduação trouxe Virgínia, Sami e Débora.

Às minhas amigas do coração, Nay, Shi, Carize, Thaís e Mi que estiveram sempre presentes e me acompanharam durante toda a faculdade até hoje, nas conquistas e nos momentos difíceis, muito obrigada!!

Às minhas fiéis amigas, Li e Fê, por estarem presentes em minha vida há mais de 15 anos, pela amizade e apoio em todas as minhas escolhas, por acreditarem e mim, e dividirem comigo todos os momentos, e a minha querida amiga Eti (*in memorian*), onde quer que ela esteja.

À minha família, por tudo que representam em minha vida, por me apoiarem e estarem sempre desprendendo esforços para estarem presentes em todos os momentos, nos difíceis e nas conquistas. Muito obrigada, Vó Alícia, Vó Arno (*in memorian*), Dinda, PH, Sophia e Edí, e Tia Flávia. Amo vocês!

Ao meu pai Valmir, Janice e Vó Erna. E ao Ênio.

Aos meus irmãos, minha maninha Bru, pelo seu carinho e por estar sempre comigo dividindo todos os momentos, e ao meu irmãozinho Rudolfo, pela alegria que carrega! Amo vocês!

À minha mãe Solange, pela fortaleza que representa em minha vida! E ao Carlos, que chegou faz pouco e faz a todos muito feliz.

Ao Eduardo, pelo carinho e paciência em todos os momentos! E principalmente pelo apoio, em todas as minhas decisões.

*“It's a kind of magic,
A kind of magic,
One dream, one soul, one prize,
One goal, one golden glance of what should be,
It's a kind of magic..”*
(Queen)

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor,
mas lutei para que o melhor fosse feito.
Não sou o que deveria ser,
mas Graças a Deus,
não sou o que era antes.”*
(Marthin Lhuter King)

RESUMO

A espécie *Cecropia glaziovii*, popularmente conhecida no Brasil como embaúba, é amplamente utilizada na medicina popular como agente diurético e cardiotônico. Em relação às propriedades farmacológicas são descritas as atividades anti-hipertensiva, antioxidante e anti-herpética. Flavonoides, procianidinas, ácidos fenólicos e catequinas são relatados como metabólitos presentes no extrato aquoso de suas folhas. Especificamente em relação aos flavonoides C-glicosídeos, são descritas as atividades antioxidante, anti-inflamatória e no sistema nervoso central. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a estabilidade do extrato bruto (EB) e de uma fração enriquecida em flavonoides C-glicosídeos (FrMeOH). As amostras (EB e FrMeOH) foram submetidas a testes de estresse sob condições de temperatura (80 °C), luz UV (254 nm), hidrólise ácida (HCl 0,1N) alcalina (NaOH 0,1N) e neutra, e oxidação (H₂O₂ 3%, 10% e 30%) durante períodos diversos; a estudos de estabilidade acelerada (40 °C ± 2 °C e 75% ± 5% UR), durante seis meses, e também foram avaliadas sob condições de refrigeração (4 °C). Foram selecionados três marcadores (ácido clorogênico, isoorientina e isovitexina) para monitorar o perfil quantitativo das amostras durante os experimentos por CLAE/DAD. O método por CLAE utilizado mostrou-se indicativo da estabilidade. Não foram verificadas alterações relevantes nos teores dos marcadores no experimento sob refrigeração durante 30 dias, e oxidação (H₂O₂ 3% e 10%) durante cinco horas, no EB e FrMeOH. Com exceção dos experimentos anteriores, para os demais testes de estresse e para o estudo de estabilidade acelerada foram observadas alterações relevantes no teor de pelo menos um entre os três marcadores para as duas amostras. Durante os testes de estresse foi verificada a formação de três produtos de degradação no EB, e apenas um produto na FrMeOH. Os experimentos de estabilidade realizados demonstraram que o flavonoide O-glicosídeo (isoquercitrina), e o ácido fenólico (ácido clorogênico) apresentaram maior sensibilidade às condições impostas em relação aos flavonoides C-glicosídeos (isoorientina, isovitexina).

Palavras-chave: *Cecropia glaziovii*; compostos fenólicos, flavonoides C-glicosídeos; testes de estresse; estudo de estabilidade acelerada.

ABSTRACT

Evaluation of the stability of extracts, fractions and C-glycosyl flavonoids present in *Cecropia glaziovii*

Cecropia glaziovii is popularly known in Brazil as “embaúba” and is widely used in folk medicine as a diuretic and cardiotonic agent. Antihypertensive, antioxidant and anti-herpetic activities are described as pharmacological properties. Flavonoids, procyanidins, phenolic acids and catechins are reported as the major compounds present in aqueous extract of *C. glaziovii* leaves. Specifically related to C-glycosyl flavonoids, antioxidant, anti-inflammatory and central nervous system activities are described. The aim of this study was to evaluate the stability of the crude aqueous extract (EB) as well as an enriched C-glycosyl flavonoids fraction (FrMeOH). The samples (EB and FrMeOH) were evaluated under stress conditions as temperature (80 °C), UV light (254 nm), acid (HCl 0.1 N), alkaline (NaOH 0.1 N) and neutral hydrolysis, and oxidation (H₂O₂ 3%, 10% and 30%) during different times; to accelerated stability studies (40 °C ± 2 °C and 75% ± 5% RH) during six months, and also to refrigerated conditions (4 °C). The quantitative profile were performed by HPLC/DAD, three chemical-markers (chlorogenic acid, isoorientin and isovitexin) were selected. The HPLC method proved to be stability indicative. Any relevant changes were observed for the chemical profile of EB and FrMeOH samples in temperature (4 °C) and oxidation (H₂O₂ 3% and 10%) experiments. With the exception about previous experiments related, relevant changes were observed in the content of at least one of the three markers for the two samples on stress tests and accelerated stability study. Moreover, three degradation products were detected for EB sample, while FrMeOH showed only one new product during stress tests. The flavonoid O-glycosides (isoquercitrin) and the phenolic acid (clorogenic acid) showed higher sensibility in relation to C-glycosyl flavonoids (isoorientin, isovitexin) on the stability studies performed.

Key-words: *Cecropia glaziovii*; phenolic compounds, C-glycosyl flavonoids; stress tests; accelerated storage conditions.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Árvore de <i>Cecropia glaziovii</i>	33
Figura 2: Folha de <i>Cecropia glaziovii</i>	33
Figura 3: Estruturas químicas de metabólitos presentes no extrato aquoso de <i>Cecropia glaziovii</i>	34
Figura 4: Núcleo fundamental dos flavonoides e sua numeração.....	41
Figura 5: Rearranjo Wessely-Moser composto vitexina para isovitexina.....	43
Figura 6: Esquema representando possíveis metabólitos das flavonas C-glicosídicas, isoorientina e isovitexina.....	45
Figura 7: Fluxograma do estudo de estresse sob condições de hidrólise ácida e alcalina	52
Figura 8: Mecanismo de (a) aquecimento e (b) rotação molecular promovida por micro-ondas	53
Figura 9: Fluxograma estudo estresse sob condições de oxidação	54
Figura 10: Perfil cromatográfico do (a) Extrato bruto e (b) Fração metanólica	73
Figura 11: Análise cromatográfica para identificação de apigenina e luteolina	74
Figura 12: Cromatograma do composto A isolado	75
Figura 13: Cromatograma de uma fração enriquecida no composto B	76
Figura 14: Cromatograma da solução do EB na análise de 12 horas do experimento de temperatura a 80 °C	79
Figura 15: Teores dos marcadores presentes no (a) EB e (b) FrMeOH em solução durante o experimento de temperatura a 80 °C	80

Figura 16: Cromatograma do pó do EB no sétimo dia do experimento de temperatura 80 °C	81
Figura 17: Teores dos marcadores presentes no EB na forma de pó durante o experimento de temperatura a 80 °C	82
Figura 18: Teores dos marcadores presentes na FrMeOH em forma de pó durante o experimento de temperatura a 80 °C	82
Figura 19: Teores dos marcadores presentes na solução (a) EB e (b) FrMeOH durante exposição à luz UV (254 nm)	84
Figura 20: Teores dos marcadores presentes no pó (a) EB e (b) FrMeOH durante o experimento de exposição à luz UV (254 nm)	85
Figura 21: Cromatograma do EB na primeira hora de experimento de hidrólise ácida (HCl 0,1 N).....	86
Figura 22: Teores dos marcadores presentes no EB durante o experimento de hidrólise ácida (HCl 0,1 N) sob refluxo	87
Figura 23: Perfil cromatográfico do EB na primeira hora do experimento de hidrólise ácida (HCl 0,1 N) sob refluxo	87
Figura 24: Teores dos marcadores presentes na FrMeOH durante o experimento de hidrólise ácida (HCl 0,1 N) sob refluxo	88
Figura 25: Perfil cromatográfico da FrMeOH (a) tempo zero e (b) 8 horas de experimento de hidrólise ácida (HCl 0,1 N) sob refluxo	89
Figura 26: Perfil cromatográfico em (a) EB e (b) FrMeOH na primeira hora do experimento de hidrólise alcalina sob refluxo	90
Figura 27: Gráfico demonstrando os teores dos marcadores presentes (a) EB e (b) FrMeOH durante o experimento de hidrólise alcalina (NaOH 0,1 N) sob refluxo.....	91
Figura 28: Clivagem alcalina geral para flavonoides	91
Figura 29: Teores dos marcadores presentes (a) EB e (b) FrMeOH durante o experimento de hidrólise neutra sob refluxo	92

Figura 30: Correlação entre as metodologias utilizadas para os experimentos de hidrólise por refluxo e micro-ondas	93
Figura 31: Gráfico de correlação entre os teores obtidos para os três marcadores nas técnicas de micro-ondas e refluxo, para hidrólise alcalina e ácida.....	94
Figura 32: Teores dos marcadores no EB e FrMeOH submetidas a oxidação com H ₂ O ₂ nas concentrações de 3% e 10%	95
Figura 33: Teores dos marcadores presentes no EB durante o experimento de oxidação com H ₂ O ₂ 30%	96
Figura 34: Teores dos marcadores presentes na FrMeOH durante o experimento de oxidação com H ₂ O ₂ 30%	96
Figura 35: Características estruturais atribuídas à atividade antioxidante dos flavonoides	97
Figura 36: Teores dos marcadores presentes (a) EB e (b) FrMeOH durante o experimento sob condições de refrigeração (4 °C)	98
Figura 37: Fotografias ilustrativas das amostras durante o estudo de estabilidade acelerada	99
Figura 38: Cromatogramas do EB em (a) t ₀ e (b) primeiro mês do estudo de estabilidade acelerada	100
Figura 39: Cromatogramas da FrMeOH em (a) t ₀ e (b) quarto mês do estudo de estabilidade acelerada	100
Figura 40: Teores dos marcadores presentes no EB durante o estudo de estabilidade acelerada	101
Figura 41: Teores dos marcadores presentes na FrMeOH durante o estudo de estabilidade acelerada	102
Figura 41: Hipótese de (1) estrutura para o composto e possível conversão em (2) isovitexina.....	108

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Classes dos flavonoides C-glicosídeos e suas estruturas químicas.....	42
---------------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Teor dos metabólitos secundários presentes no EB e FrMeOH de <i>C. glaziovii</i> , no t ₀ de experimento	75
Tabela 2: Exatidão do método analítico para os compostos fenólicos presentes em <i>C. glaziovii</i>	77
Tabela 3: Faixa de teor dos metabólitos secundários considerada como inalterada/semelhante no EB e FrMeOH.....	77
Tabela 4: Exemplos de medicamentos fitoterápicos disponíveis no mercado brasileiro que utilizam faixa de teor do marcador químico.....	78
Tabela 5: Teores dos marcadores no EB na forma de pó durante o experimento de temperatura a 80 °C.....	81
Tabela 6: Teores dos marcadores no FrMeOH na forma de pó durante o experimento de temperatura a 80 °C.....	82
Tabela 7: Teores dos marcadores no EB e FrMeOH na forma de solução durante o experimento de exposição à luz UV (254 nm).....	83
Tabela 8: Teores dos marcadores no EB e FrMeOH na forma de pó durante o experimento de exposição à luz UV (254 nm).....	84
Tabela 9: Teores dos marcadores no EB durante o experimento de hidrólise ácida (HCl 0,1 N) por refluxo	86
Tabela 10: Teores ^a dos marcadores na FrMeOH durante o experimento de hidrólise ácida (HCl 0,1 N) por refluxo	88
Tabela 11: Teores dos metabólitos no EB e FrMeOH durante o experimento de hidrólise alcalina (NaOH 0,1 N) por refluxo.....	90
Tabela 12: Teores de metabólitos presentes no EB e FrMeOH durante o experimento de hidrólise neutra sob refluxo.....	92
Tabela 13: Teores de metabólitos presentes no EB durante o experimento de oxidação com H ₂ O ₂ 30%	95
Tabela 14: Teores de metabólitos presentes na FrMeOH durante o experimento de oxidação com H ₂ O ₂ 30%.....	96

Tabela 15: Faixa de teor ^a dos marcadores considerada como inalterada/semelhante no EB e FrMeOH para o experimento de temperatura de refrigeração.....	98
Tabela 16: Teores ^a dos marcadores no EB e FrMeOH durante o experimento de temperatura a 4 °C.....	98
Tabela 17: Teores dos metabólitos no EB durante o estudo de estabilidade acelerada.....	101
Tabela 18: Teores dos metabólitos na FrMeOH durante o estudo de estabilidade acelerada.....	102
Tabela 19: Experimentos nos quais foi detectado aumento no teor de isovitexina.....	107
Tabela 20: Estudos de estabilidade submetidos ao EB e FrMeOH e formação de produto de degradação.....	109

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E UNIDADES

ACG	Ácido clorogênico
acetil-CoA	Acetil co-enzima A
ANVISA	Agência de Vigilância Sanitária
BuOH	Butanol
CCD	Cromatografia em camada delgada
CLAE-DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos
CLAE/EM	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetro de massas
^{13}C RMN	Ressonância magnética nuclear de carbono
DL ₅₀	Dose letal corresponde a 50%
DMSO- <i>d</i> ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
DPPH	2,2- difenil-1-picrilhidrazil
ECA	Enzima conversora de angiotensina
EC ₅₀	Concentração necessária para reduzir em 50%
FrMeOH	Fração metanólica
HMBC	<i>Heteronuclear multiple bond correlation</i>
HPTLC	Cromatografia em camada delgada de alta performance
^1H RMN	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
HSQC	<i>Heteronuclear single quantum coherence</i>
HSV	Herpes Simplex Virus
HSV-1	Herpes Simplex Virus tipo 1
HSV-2	Herpes Simplex Virus tipo 2
IC ₅₀	Concentração inibitória em 50%
ICH	<i>International Conference of Harmonization</i>
i.d.	Intradérmico
ISOOR	Isoorientina
ISOV	Isovitexina
MC	Micro-ondas
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RE	Resolução
t _r	Tempo de retenção
v.o.	Via oral

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	29
2 REVISÃO DA LITERATURA	32
2.1 <i>Cecropia glaziovii</i> SNETH.....	32
2.1.1 Aspectos botânicos	32
2.1.2 Composição química	34
2.1.3 Aspectos biológicos	36
2.1.3.1 Atividade anti-hipertensiva	36
2.1.3.2 Atividades ansiolítica e antidepressiva.....	37
2.1.3.3 Atividade antioxidante e hepatoprotetora.....	37
2.1.3.4 Atividade antiviral	37
2.1.3.5 Demais atividades farmacológicas.....	38
2.1.3.6 Toxicidade	39
2.2 FLAVONOIDES	39
2.2.1 Características químicas	40
2.2.1.1 Flavonoides C-glicosídeos	41
2.2.3. Aspectos biológicos	44
2.2.3.1 Flavonoides C-glicosídeos.....	44
2.2.3.1.1 <i>Metabolismo</i>	44
2.2.3.1.1 <i>Atividades farmacológicas</i>	45
2.2.3.1.1.1 Atividade antioxidante	45
2.2.3.1.1.2 Atividade anti-inflamatória	46
2.2.3.1.1.4 Atividade neurofarmacológica	47
2.2.3.1.1.5 Atividade antihiperglicêmica	47
2.2.3.1.1.6 Atividade antiúlcera	48
2.2.3.1.1.7 Demais atividades	48
2 ESTABILIDADE	49
2.3.1 Tipos de estudos de estabilidade	50
2.3.1.1 Estudos de estresse.....	51
2.3.1.1.1 <i>Hidrólise</i>	51
2.3.1.1.1.1 Hidrólise em micro-ondas.....	52
2.3.1.1.2 <i>Oxidação</i>	54
2.3.1.1.3 <i>Fotólise</i>	55
2.3.1.1.4 <i>Temperatura</i>	55
2.3.1.2 Estudo de estabilidade acelerada	55
2.3.2 Experimentos de estabilidade aplicados a matérias-primas vegetais	56
3 OBJETIVOS	59
3.1 OBJETIVO GERAL	59
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	59

4 METODOLOGIA	63
4.1 MATERIAL VEGETAL	63
4.2 PROCESSO EXTRATIVO E OBTENÇÃO DE FRAÇÃO ENRIQUECIDA	63
4.3 ANÁLISE DO PERFIL QUÍMICO.....	63
4.4 ISOLAMENTO DO COMPOSTO A E B	65
4.5 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL	65
4.6 ESTUDOS DE ESTABILIDADE.....	65
4.7.1 Estudos de estresse.....	66
4.7.1.1 Temperatura.....	66
4.7.1.2 Luz UV.....	66
4.7.1.3 Hidrólise.....	67
4.7.1.3.1 <i>Hidrólise por refluxo</i>	67
4.7.1.3.2 <i>Hidrólise por micro-ondas</i>	67
4.7.1.4 Oxidação	68
4.7.2 Estudos sob condições de refrigeração.....	68
4.7.2 Estudos de estabilidade acelerada.....	68
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	73
5.1 ANÁLISE QUALI E QUANTITATIVA DO EXTRATO BRUTO (EB) E FrMeOH	73
5.2 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO COMPOSTOS A, B.....	75
5.3 EXPERIMENTOS DE ESTABILIDADE	77
5.3.1 Estudos de estresse	79
5.3.1.1 Temperatura	79
5.3.1.2 Luz UV.....	83
5.3.1.3 Hidrólise	85
5.3.2.3.1 <i>Hidrólise por refluxo</i>	85
5.3.1.3.2 <i>Hidrólise por micro-ondas</i>	93
5.3.1.4 Oxidação	95
5.3.2 Estudos sob condições de refrigeração.....	98
5.3.2 Estudo de Estabilidade Acelerada.....	99
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	105
7 CONCLUSÕES.....	111
8 PERSPECTIVAS.....	112
REFERÊNCIAS.....	113

INTRODUÇÃO

Introdução geral – Revisão da literatura - Objetivos

1 INTRODUÇÃO

A utilização de extratos vegetais para prevenção e tratamento de diversas enfermidades é evidenciada desde os primórdios da humanidade. Um estudo entre o período de 1981 e 2006 indicou que cerca de 50% de todos os novos medicamentos lançados no mercado são, de alguma forma, derivados de produtos naturais (NEWMAN; CRAGG, 2006; NEWMAN, 2008). Geralmente acredita-se que o risco associado a produtos à base de plantas seja menor, premissa esta vinculada ao uso tradicional das plantas medicinais. Porém, relatos de reações sérias e efeitos adversos significativos indicam a necessidade do conhecimento com maior rigor científico em matérias-primas vegetais. Dessa forma, ensaios para a avaliação da estabilidade, padronização e controle de qualidade de fitoterápicos são necessários, embora sejam bastante laboriosos (SAHOO; MANCHIKANTI; DEY, 2010).

Com base na complexidade de um produto fitoterápico, o controle de qualidade convencional e técnicas farmacobotânicas são insuficientes para assegurar a segurança e a eficácia. Partindo do conceito de que um medicamento fitoterápico é baseado em um extrato vegetal, são necessárias técnicas multifatoriais, sendo a avaliação das condições de armazenamento um dos pontos importantes a ser considerado. A garantia da qualidade dos marcadores químicos da espécie vegetal é um pré-requisito, por exemplo, para viabilizar a elaboração de uma forma farmacêutica e a realização de ensaios clínicos (BILIA et al., 2001; SAHOO; MANCHIKANTI; DEY, 2010).

O gênero *Cecropia* pertence à família Urticaceae e é composto por aproximadamente 75 espécies tropicais. Dentre elas, a espécie *Cecropia glaziovii* conhecida popularmente como embaúba, imbaúba ou umbaúba é amplamente utilizada na medicina tradicional do Brasil, destacando-se como agente diurético e cardiotônico, no combate a pressão alta, assim como para o tratamento de problemas respiratórios como tosse, asma e bronquite (PIO CORRÊA, 1978; MORS; RIZZINI; DI STASI et al., 2002; LORENZI; MATOS, 2008). Em relação às propriedades farmacológicas são encontrados apenas estudos pré-clínicos para diversas atividades, como anti-hipertensiva, capacidade de inibição da ECA, ansiolítica, antioxidante, antidepressiva, broncodilatadora, anti-herpética, antiulcerosa e antisecretora de ácido gástrico (COSTA; SCHENKEL; REGINATTO, 2011).

C. glaziovii apresenta como principais constituintes químicos flavonóides, procianidinas, ácidos fenólicos e catequinas. Especificamente em relação aos flavonóides, foram identificados

compostos tipo *C*-glicosídeos como isoorientina, orientina e isovitexina, e o composto *O*-glicosídeo isoquercitrina (LACAILLE-DUBOIS; FRANCK; WAGNER, 2001; TANAE et al., 2007; COSTA et al., 2011).

Os flavonoides, em geral, destacam-se como metabólitos secundários de interesse farmacêutico. Podem ser encontrados amplamente distribuídos no reino vegetal e possuem grande diversidade estrutural. Estes compostos representam uma importante classe de compostos fenólicos podendo ocorrer na forma de aglicona ou sob a forma de glicosídeo. Em relação aos flavonoides glicosilados, especialmente aos *C*-glicosilados são relatadas atividades antioxidante (LIN et al., 2000; ORREGO; LEIVA; CHEEL, 2009; WANG et al., 2012), antimicrobiana (MICHAEL; GUERGUES; SANDAK, 1998), antiinflamatória (AQUILA et al., 2009; ZUCOLOTTI et al., 2009), neurofarmacológica (SENA et al., 2009), anti-hiperglicêmica (CAZAROLLI et al., 2009; FOLADOR et al., 2010) e antiulcerosa (MONTANHA et al., 2009).

Especificamente para *C. glaziovii* é verificada uma correlação direta entre seus teores de flavonóides glicosilados e atividade farmacológica. Para o extrato aquoso foram detectadas atividades anti-hipertensiva (CYSNEIROS et al., 1997), tipo ansiolítica (ROCHA; LAPA; DE LIMA, 2002) e anti-herpética (SILVA et al., 2010), sendo que esses trabalhos apontam os flavonoides *C*-glicosídeos presentes no extrato como possíveis responsáveis pela atividade. O flavonoide isovitexina, por exemplo, foi indicado como responsável pela ação β -adrenérgica na atividade anti-hipertensiva detectada em estudos *in vivo* (CYSNEIROS et al., 1997). A fração butanólica, obtida a partir do extrato aquoso das folhas de *C. glaziovii*, mostrou atividade tipo ansiolítica cerca de 5 a 10 vezes mais potente que o extrato aquoso além de altos teores dos flavonoides isoorientina e orientina, quando comparado com o extrato aquoso (ROCHA; LAPA; DE LIMA, 2002). Uma fração enriquecida em flavonoides *C*-glicosídeos (MeOH_{AMB}) obtida a partir do extrato aquosos de *C. glaziovii* apresentou promissora atividade anti-herpética frente ao HSV-1 e HSV-2 (SILVA et al., 2010).

Considerando a co-relação atividade biológica x constituição química em extratos vegetais, a avaliação da estabilidade dos componentes é essencial para garantir a segurança e a eficácia de uma forma farmacêutica fitoterápica. Apesar de sua escassez, alguns estudos presentes na literatura descrevem a degradação por estresse de produtos fitoterápicos, incluindo extratos, formas farmacêuticas e substâncias isoladas, como ensaios a serem utilizados para a avaliação da

estabilidade de produtos naturais (BILIA et al., 2000; AGRAWAL et al., 2004).

Na presente dissertação serão apresentados resultados iniciais de estudos de estabilidade realizados com o extrato aquoso de *C. glaziovii* e sua fração enriquecida em flavonoides C-glicosídeos, com base em resoluções e guias descritos na literatura para fármacos e medicamentos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Cecropia glaziovii* SNETH.

2.1.1 Aspectos botânicos

O gênero *Cecropia* (Urticaceae) é composto por aproximadamente 75 espécies tropicais, sendo comumente encontrado em regiões de baixas altitudes, em torno de florestas densas, lagos e áreas recentemente devastadas. Este gênero é comum às regiões que compreendem a América Central - mais especificamente sul do México, sul da Flórida, ilhas do Caribe - e América do Sul (PIO CORRÊA 1978; BERG; ROSSELI, 2005; TANAE et al., 2007).

No Brasil as espécies desse gênero podem ser encontradas na região norte, abrangendo a Floresta Amazônica, e também nas regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul. As principais espécies dispersas em nosso país são *C. glaziovii*, *C. hololeuca*, *C. leucocoma*, *C. lyratiloba*, *C. obtusa*, *C. pachystachya* e *C. scabra* (BERG; ROSSELI, 2005; TANAE et al., 2007).

Popularmente conhecidas como embaúba, imbaúba ou umbaúba no Brasil, algumas espécies de *Cecropia* são utilizadas na medicina popular como agentes diuréticos e cardiotônicos (*C. glaziovii*, *C. hololeuca*, *C. pachystachya*), para tratamento de problemas respiratórios como tosse, asma e bronquite (*C. glaziovii*, *C. hololeuca*, *C. pachystachya* e *C. peltata*), combate a pressão alta (*C. adenopus*, *C. glaziovii*, *C. hololeuca*, *C. obtusifolia*, *C. pachystachya* e *Cecropia peltata*), diabetes (*C. adenopus*, *C. obtusifolia*, *C. pachystachya* e *C. peltata*) e tratamento de inflamações (*C. obtusifolia*) (PIO CORRÊA, 1978; MORS; RIZZINI; DI STASI et al., 2002; LORENZI; MATOS, 2008). De modo geral, entre as várias espécies deste gênero, apenas algumas foram estudadas quimicamente e/ou farmacologicamente, compreendendo cerca de trinta trabalhos, dos quais aproximadamente dez são relacionados à *C. glaziovii* (COSTA; SCHENKEL; REGINATTO, 2011).

Especificamente em relação à *C. glaziovii*, objeto de estudo do presente trabalho, suas árvores (Figura 1) apresentam aproximadamente 20 metros de altura, copa ampla e bastante ramificada, e galhos com 2 a 5 centímetros de espessura de coloração verde acinzentada. As folhas (Figura 2) são geralmente largas (até 100 x 100 cm de área) anteriores a ramificação, longamente pecioladas, palmadas e rugosas. Possui tronco reto, oco e esbranquiçado, habitado por formigas agressivas do gênero *Azteca* que vivem em simbiose com a espécie. Essa relação mutualística

atribui benefícios a espécie em função da proteção oferecida pelas formigas contra herbívoros (DAVIDSON, 2005; LUENGAS-CAICEDO et al., 2007).

Figura 1: Árvore de *Cecropia glaziovii* em Florianópolis, Santa Catarina.



Fonte: O autor.

Figura 2: Folha *Cecropia glaziovii* coletada em Florianópolis, Santa Catarina.

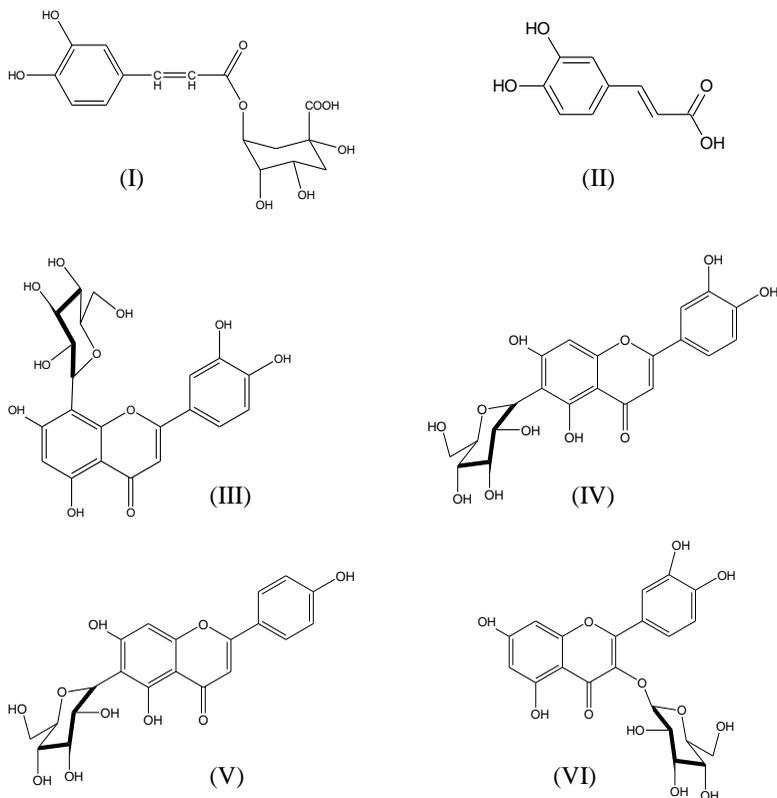


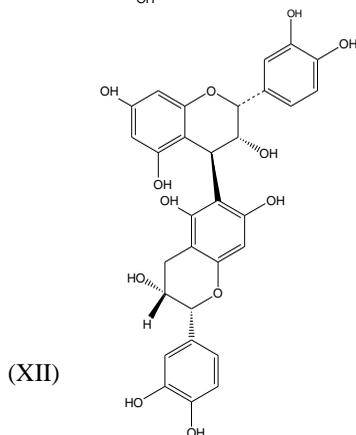
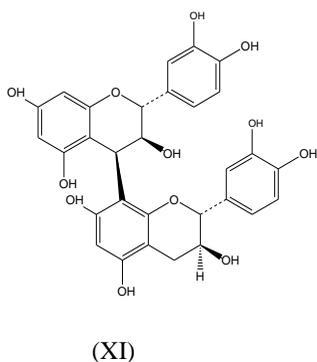
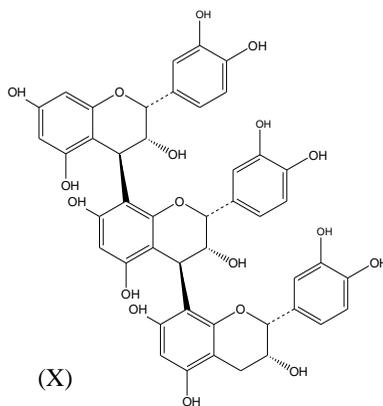
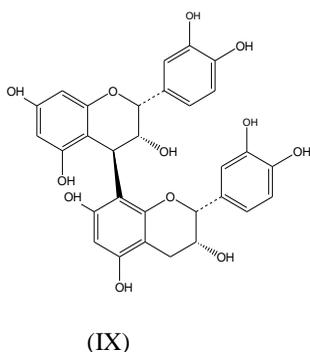
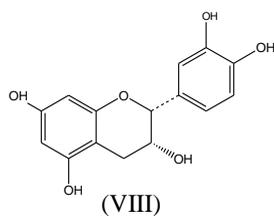
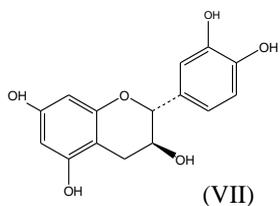
Fonte: O autor.

2.1.2 Composição química

Em relação à constituição química de *C. glaziovii* são descritos flavonóides, procianidinas, ácidos fenólicos e catequinas como metabólitos majoritários presentes em diferentes extratos de suas folhas (Figura 3). Especificamente em relação aos flavonoides, foram identificados compostos tipo C-glicosídeos como isoorientina, orientina e isovitexina, e o composto O-glicosídeo isoquercitrina. O ácido 3-O-cafeoilquínico (ácido clorogênico) também foi identificado, sendo este um dos constituintes majoritários do extrato aquoso das folhas desta espécie (LACAILLE-DUBOIS; FRANCK; WAGNER, 2001; TANAE et al., 2007; AREND et al., 2011; COSTA et al., 2011).

Figura 3: Estruturas químicas de metabólitos presentes em *Cecropia glaziovii*





(I) ácido clorogênico, (II) ácido cafeico, (III) orientina (IV) isorientina, (V) isovitexina, (VI) isoquercitrina, (VII) (+) catequina, (VIII) (-) epicatequina, (IX) procianidina B2, (X) procianidina C1, (XI) procianidina B3, (XII) procianidina B5 (AREND et al., 2011; COSTA et al., 2011).

2.1.3 Aspectos biológicos

Conforme já mencionado, o gênero *Cecropia* é amplamente utilizado na medicina tradicional. Especificamente para *C. glaziovii* são encontrados relatos de seu uso para tratamento de doenças do coração, tosse, asma, bronquite, dispnéia, agente diurético e antidiabético (PIO-CORRÊA, 1978). Em relação às propriedades farmacológicas são encontrados apenas estudos pré-clínicos para diversas atividades, como atividades anti-hipertensiva, inibição da ECA, ansiolítica, antioxidante, antidepressiva, broncodilatadora, antiulcerosa e antissecretora de ácido gástrico (ROCHA; LAPA; DE LIMA, 2002; ROCHA et al., 2007; COSTA; SCHENKEL; REGINATTO, 2011). A seguir serão apresentadas de forma resumida as principais informações dos trabalhos relacionados a estas atividades.

2.1.3.1 Atividade anti-hipertensiva

Ensaios *in vitro* com os extratos diclorometano/metanol e metanólico das folhas de *C. glaziovii* causaram inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA) (LACAILLE-DUBOIS; FRANCK; WAGNER, 2001; BRAGA et al., 2007). Segundo LACAILLE-DUBOIS e colaboradores, a atividade inibitória da ECA das folhas, cascas e estípulas de *C. glaziovii* estaria relacionada a um sinergismo entre os flavonoides C-glicosídeos e proantocianidinas, visto que estes compostos, quando isolados, não apresentaram atividade.

O extrato aquoso de plantas cultivadas de *C. glaziovii* causou efeito hipotensor em doses entre 0,15 a 0,50 g/kg (v.o.) em ratos normotensos e em ratos com hipertensão induzida por L-NAME (10 mg/kg, v.o.). Cysneiros e colaboradores (1997) sugerem que esse efeito ocorra pelo relaxamento da musculatura lisa através de dois mecanismos: bloqueio dos canais de cálcio tipo I e por ação em receptores β -2 adrenérgicos, sendo a isovitexina responsável pela ação β -adrenérgica.

A administração crônica por via oral do extrato aquoso de *C. glaziovii* e da sua fração n-butanólica induziu hipotensão tanto em ratos normotensos quanto hipertensos, sendo que este efeito seria independente de bloqueio específico de receptores α 1 ou AT₁. Os autores inferem que a hipotensão causada pelo extrato aquoso de *C. glaziovii* estaria relacionada ao bloqueio do influxo de Ca²⁺ em células do músculo liso e neurônios (LIMA-LANDMAN et al., 2006).

Estudos *in vivo* da inibição da ECA a partir do extrato aquoso padronizado de *C. glaziovii* demonstraram que uma única administração do extrato (1,0 g/kg, v.o.) não causou modificação na atividade desta

enzima, na pressão arterial, ou nos batimentos cardíacos. Entretanto, a administração crônica (0,5 g/kg, v.o. durante 60 dias), foi eficiente ao reduzir a pressão após 14 dias de tratamento. Segundo os autores, a hipotensão provocada pelo extrato não estaria relacionada à inibição desta enzima, mas ao bloqueio dos canais de Ca^{2+} na musculatura lisa (NINAHUAMAN et al., 2006).

2.1.3.2 Atividades ansiolítica e antidepressiva

O extrato aquoso de *C. glaziovii* nas doses entre 0,25-1,0g/kg foi administrado via oral em ratos sob tratamento agudo (1h) e repetido (24, 7 e 1,5h antes do experimento) no modelo de labirinto em cruz elevada. A atividade tipo ansiolítica foi constatada somente após administração repetida do extrato aquoso, sendo possível ainda verificar uma atividade superior (entre 5 a 10 vezes) para a fração butanólica obtida a partir desse extrato. Os flavonóides isoorientina e orientina presentes na fração butanólica, foram apontados como possíveis responsáveis pela atividade no SNC (ROCHA; LAPA; DE LIMA, 2002).

Atividade tipo antidepressiva também foi avaliada pelo mesmo grupo de pesquisa para o extrato aquoso padronizado e a sua fração n-butanólica em experimentos *in vivo* (nado forçado), *ex vivo* (níveis de monoaminas no hipocampo) e *in vitro* (recaptação de serotonina, noradrenalina e dopamina). Ambos, extrato aquoso e fração butanólica apresentaram atividade tipo antidepressiva devido ao bloqueio da recaptação de monoaminas pelo sistema nervoso central. Os compostos catequina, procianidina B3 e procianidina B2 foram identificados como os mais ativos (ROCHA et al., 2007).

2.1.3.3 Atividade antioxidante e hepatoprotetora

O extrato hidroetanólico de *C. glaziovii* nas concentrações de 2, 20 e 200 $\mu\text{g/mL}$ foi capaz de reduzir a peroxidação lipídica *in vitro* induzida por três geradores de radicais livres: H_2O_2 , FeSO_4 , AAPH. Com base nesses resultados, o extrato hidroetanólico também foi avaliado *in vivo* nas concentrações de 20 e 40 mg/kg após administração de CCl_4 , sendo capaz de reduzir o dano hepático em ambas as doses testadas (PETRONILHO et al., 2012).

2.1.3.4 Atividade antiviral

O extrato aquoso de *C. glaziovii*, sua fração BuOH e uma fração enriquecida em flavonoides C-glicosídeos (MeOH_{AMB}) foram avaliados, *in vitro*, quanto aos seus efeitos antiherpéticos. O teste da atividade

antiviral foi realizado baseado no ensaio de redução de placas de lise frente aos vírus HSV-1 (cepa KOS) e HSV-2 (cepa 333). O mecanismo de ação da fração mais ativa - MeOH_{AMB} - foi investigado e os autores detectaram que a atividade anti HSV ocorre através da redução da infectividade viral para HSV-2 e pela inibição da entrada do vírus na célula, inibição da transmissão viral e também pela dano ao envelope proteico para o HSV-1. A fração MeOH_{AMB} mostrou-se de 2 a 3 vezes mais ativa frente as cepas HSV-1 e HSV-2 quando comparada ao extrato aquoso, sendo esta atividade atribuída ao flavonoides C-glicosídeos (SILVA et al., 2010).

Recentemente foi descrito na literatura que o extrato hidroetanólico de *C. glaziovii* foi capaz de inibir significativamente a replicação do HSV-1 (cepa 29R – resistente a aciclovir) com uma EC₅₀ de 40 µg/mL e um índice de seletividade de 50 (PETRONILHO et al., 2012).

2.1.3.5 Demais atividades farmacológicas

Adicionalmente às atividades apresentadas, foram encontrados trabalhos de um grupo de autores descrevendo atividade brocodilatadora e inibitória da secreção de ácido gástrico para um extrato padronizado e fração butanólica de *C. glaziovii*, os quais serão descritos em sequência.

O extrato aquoso de *C. glaziovii* padronizado em 12% de catequinas, 19% de procianidinas e 19% de flavonoides (TANAE et al., 2007) e sua fração butanólica foram avaliados *in vivo* quanto à inibição de secreção de ácido gástrico (SOUCCAR et al., 2008) e quanto a propriedades broncodilatadoras (DELARCINA et al., 2007).

O extrato bruto e a fração butanólica foram avaliados quanto a inibição da secreção ácida em camundongos com ligadura de piloro no modelo de lesão aguda da mucosa gástrica e em preparações gástricas H⁺, K⁺, -ATPase de coelho. A administração de ambos os extratos (doses entre 0,5-2,0 g/kg, i.d.) produziu uma diminuição tipo dose-dependente da secreção de ácido gástrico basal, indicando que o mecanismo de ação esteja relacionado com a inibição da bomba de prótons. O pré-tratamento com a fração butanólica nas doses de 0,05-0,50 g/kg via oral, protegeu a mucosa gástrica de lesões e também foi responsável pela redução da atividade da H⁺, K⁺, -ATPase *in vitro* (IC₅₀ = 58,8 µg/mL) (SOUCCAR et al., 2008).

Os compostos isolados a partir da fração butanólica procianidina B5, B2 e C1; orientina; isoorientina; isovitexina e uma mistura entre os compostos procianidina B3 e epicatequina, também inibiram a atividade gástrica H⁺, K⁺, -ATPase *in vitro*. Os resultados

indicaram que estes compostos presentes em *C. glaziovii* podem contribuir para as atividades antissecretórias e antiúlcera encontradas para o extrato (SOUCCAR et al., 2008).

O extrato bruto e sua fração butanólica foram testados *in vivo* em porcos da Índia tratados com histamina para produzir broncoespasmo. Foi realizado também um experimento *in vitro* em músculo de traquéia com a fração butanólica. O estudo demonstrou que após administração da fração butanólica (0,1; 0,3 e 1,0 mg/mL), a resposta máxima a histamina foi diminuída em 13%, 34% e 55% respectivamente, sem mudança significativa na EC₅₀. Em relação ao experimento *in vitro*, após a administração do extrato aquoso (1,0 g/kg, v.o.) e da fração butanólica (0,1 g/kg, v.o.), a concentração de histamina necessária para produzir broncoespasmo foi aumentada em cinco vezes para o primeiro e em duas vezes para o segundo. A broncodilatação observada *in vivo* parece estar relacionada com a atividade do sistema β -adrenérgico observado *in vitro* com altas concentrações do extrato purificado (DELARCINA et al., 2007).

2.1.3.6 Toxicidade

Na revisão da literatura realizada foi encontrado apenas um relato sobre a toxicidade do extrato de *C. glaziovii*. O extrato foi administrado diariamente em ratas grávidas 1,0 g/kg, sendo a DL₅₀ observada superior a 5,0 g/kg. Com base nos resultados foi possível demonstrar que o extrato não afeta de maneira significativa o desenvolvimento físico e comportamental, conferindo baixa toxicidade para a prole (GENERUTTI et al., 2008).

2.2 FLAVONOIDES

Os flavonoides representam uma importante classe de compostos fenólicos amplamente distribuídos no reino vegetal, sendo abundantes em angiospermas. Esses compostos apresentam diversidade estrutural importante e podem ser utilizados como marcadores taxonômicos, devido a sua relativa abundância em quase todo reino vegetal, especificidade em algumas espécies, relativa facilidade de identificação e concentração no vegetal (HARBORNE, WILLIAMS; 2000; ZUANAZZI; MONTANHA, 2011).

Os flavonoides estão presentes quase universalmente em folhas verdes e podem ser responsabilizados por atribuírem aos vegetais resistência à radiação ultravioleta. A radiação UV-B (280-315 nm) apresenta baixo comprimento de onda e alta energia, e ao penetrar na

camada de ozônio pode danificar os tecidos vegetais. A resistência dos vegetais a esta radiação é relacionada à presença dos flavonoides, os quais são capazes de agir como filtros de raios UV, além de conferirem proteção aos tecidos fotossintéticos (HARBORNE; WILLIAMS, 2000).

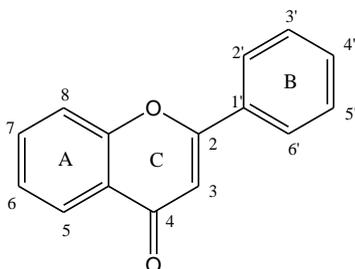
Como já destacado, os flavonoides estão presentes em uma ampla diversidade de frutas, vegetais, sementes e bebidas, como o vinho e chá, e estão presentes na alimentação humana há mais de quatro milhões de anos. Atualmente estudos indicam que o consumo diário destes compostos seja de um a dois gramas por indivíduo (HAVSTEEN, 2002; GALATI; O'BRIEN, 2004).

2.2.1 Características químicas

Os flavonoides são compostos derivados a partir dos fenilpropanoides, os quais são conhecidos como unidades formadoras de compostos fenólicos de maior complexidade. Especificamente em relação à sua biossíntese, os flavonoides são formados através da condensação de duas rotas: ácido chiquímico e acetil-CoA, onde, respectivamente, há uma conjugação entre a molécula de 4-cumaril-CoA com três moléculas de malonil-CoA, originando a chalcona, principal composto intermediário da via de biossíntese dos flavonoides subsequentes (HARBONE; MABRY, 1982; ZUANAZZI; MONTANHA, 2011; ANDERSEN; MARKHAM, 2006).

O núcleo fundamental dos flavonoides é constituído por 15 átomos de carbono que são distribuídos em três anéis A, C e B do tipo C₆-C₃-C₆ respectivamente (Figura 4). Diferenças no estado de oxidação do anel C caracterizam as principais classes de flavonoides, como: flavonóis, flavonas, flavanóis (catequinas), flavanonas, antocianidinas e isoflavonoides. A variabilidade estrutural entre estes compostos está na estruturação dos anéis das agliconas, referentes ao seu estado de oxidação/redução, seu padrão e posição dos radicais hidroxila, e também nas diferenças entre os substituintes dos grupamentos hidroxila. (ZUANAZZI; MONTANHA, 2011; HAVSTEEN, 2002; LIU, 2004; GROTEWOLD, 2006).

Figura 4: Núcleo fundamental dos flavonoides e sua numeração.



Referência: (ZUANAZZI; MONTANHA, 2011).

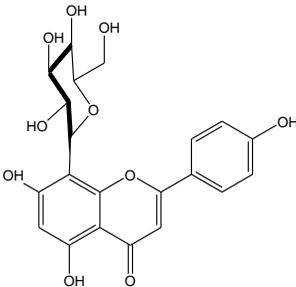
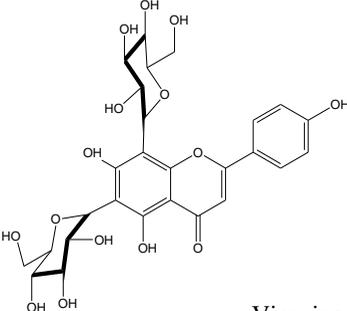
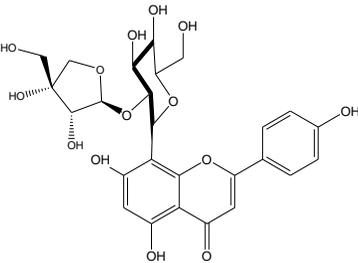
Os flavonoides de origem natural apresentam-se frequentemente oxigenados e boa parte ocorrem conjugados com moléculas de açúcares, de forma que já foram relatados mais de 80 tipos de açúcares diferentes. Essa ligação entre o núcleo fundamental, denominado genina ou aglicona, e os açúcares, pode ocorrer por meio de uma hidroxila que originam os flavonoides tipo *O*-heterosídeos ou diretamente ao carbono do esqueleto básico, gerando os flavonoides tipo *C*-heterosídeos (HARBONE; MABRY, 1982; ZUANAZZI; MONTANHA, 2011; LIU, 2004).

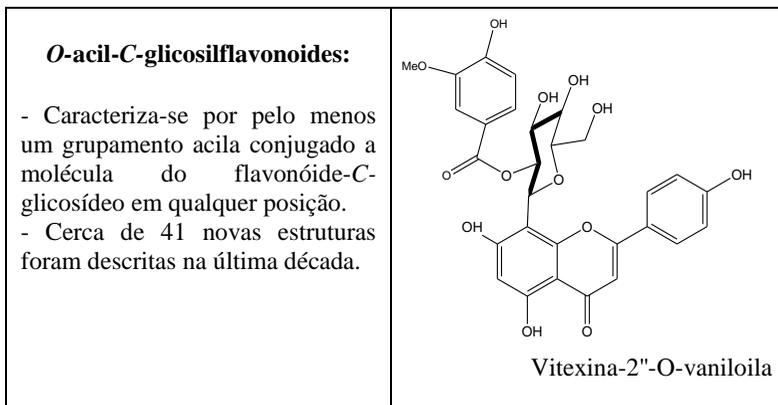
2.2.1.1 Flavonoides C-glicosídeos

Historicamente, a primeira descoberta sobre flavonoides *C*-glicosilados ocorreu por volta no século XIX com a scoparina em 1851, vitexina em 1898 e saponarina em 1906. Amplamente distribuídos no reino vegetal, aproximadamente 362 espécies são ricas nestes compostos, sendo encontrados em mono e dicotiledôneas, samambaias, musgos e algas verdes. Na maioria dos casos, os flavonoides *C*-glicosilados coexistem com os flavonoides *O*-glicosídeos, e são necessárias técnicas cromatográficas e espectroscópicas específicas que auxiliem na caracterização destes compostos (CHOPIN; BOUILLANT, 1975; TALHI; SILVA, 2012).

Os flavonoides *C*-glicosídeos naturais podem ser divididos em dois grandes grupos: agliconas não-hidrolisáveis (mono e di-*C*-glicosilflavonoides) e seus derivados hidrolisáveis (*O*-glicosídeos e *O*-acil derivados). Dentre estes estão os mono-*C*-glicosilflavonoides, di-*C*-glicosilflavonoides, *O*-glicosil-*C*-glicosilflavonoides e *O*-acil-*C*-glicosilflavonoides (HARBORNE; MABRY, 1982; ANDERSEN, MARKHAM; 2006).

Quadro 1: Classes dos flavonoides *C*-glicosídeos e suas estruturas químicas.

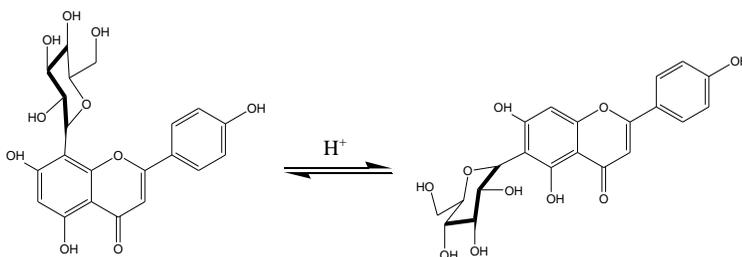
<p>Mono-<i>C</i>-glicosilflavonoides:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Caracteriza-se por possuir uma única molécula de açúcar ligada a aglicona, geralmente nas posições C-6 e C-8. - Classe mais abundante em plantas. - Cerca de 15 novas estruturas foram descritas na última década. 	 <p style="text-align: right;">Vitexina</p>
<p>Di-<i>C</i>-glicosilflavonoides:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Caracteriza-se por possuir duas moléculas de açúcar ligada a aglicona. 	 <p style="text-align: right;">Vicenina-2</p>
<p><i>O</i>-glicosil-<i>C</i>-glicosilflavonoides:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Caracteriza-se por substituição <i>O</i>-glicosídica através de uma OH fenólica pertencente ao esqueleto do flavonóide e/ou através de uma OH do fragmento <i>C</i>-glicosídico. - Cerca de 49 novas estruturas foram descritas na última década. 	 <p style="text-align: right;">Ficuflavosídeo</p>



Fonte: TALHI; SILVA (2012).

Como característica principal os flavonoides *C*-glicosídeos apresentam-se estáveis frente à hidrólise ácida, estabilidade esta atribuída à ligação carbono-carbono entre a molécula de açúcar e o núcleo fundamental. O rearranjo de Wessely-Moser (Figura 5) que envolve os compostos 5-hidroxi-*C*-glicosilflavonas decorrente de tratamento ácido ocasiona isomerização da molécula. Este rearranjo isomérico ocorre devido à abertura hidrolítica do anel pirrônico (anel C) seguido de fechamento deste anel com uma das hidroxilas em posição *orto* em relação ao grupo carbonila (CHOPIN; BOUILLANT, 1975; CHOPIN; BOUILLANT; BESSON, 1982; MARKHAM, 1982).

Figura 5: Rearranjo de Wessely-Moser do composto vitexina para isovitexina



Referência: (MARKHAM, 1982).

2.2.3. Atividades biológicas

Em relação à sua efetividade farmacológica é possível relatar atividades variadas, as quais serão brevemente descritas com ênfase nos compostos C-glicosilados na presente dissertação.

Comum aos compostos fenólicos, os flavonoides apresentam-se como potentes agentes antioxidantes e quelantes de metais, sendo também relacionados com a capacidade de reduzir o risco das principais doenças crônicas. Essas atividades têm sido atribuídas ao consumo de alimentos ricos nesses compostos, como frutas frescas e vegetais, adicionalmente ao efeito sinérgico ocorrido entre misturas complexas, incluindo os flavonoides e os ácidos fenólicos (PIETTA, 2000; LIU, 2004; GROTEWOLD, 2006; RICE-EVANS, 2001).

Atividade anti-inflamatória *in vitro* e *in vivo* também pode ser destacada entre as atividades relatadas para os flavonoides. Diversos mecanismos de ação são descritos na literatura, como a inibição de enzimas geradoras de eicosanoides e também a modulação da expressão de moléculas pró-inflamatórias originada especialmente por flavonoides derivados do núcleo flavona (HAVSTEEN, 2002; KIM et al., 2004).

2.2.3.1 Flavonoides C-glicosídeos

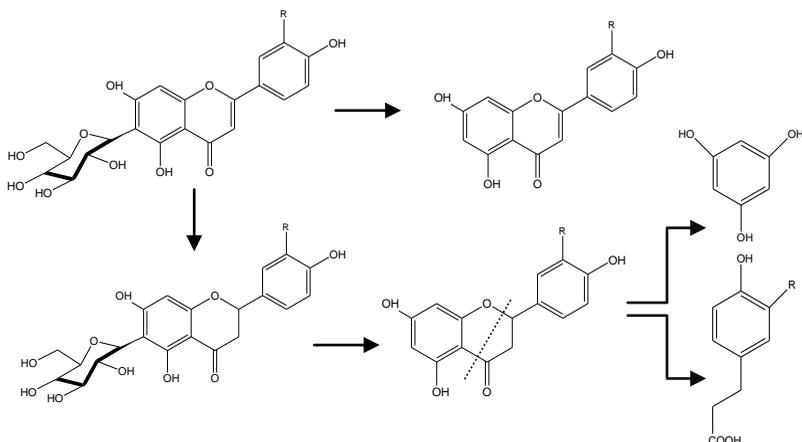
2.2.3.1.1 *Metabolismo*

A biodisponibilidade dos flavonoides C-glicosídeos não é muito bem compreendida e existem poucas evidências de sua absorção em humanos (TALHI; SILVA, 2012).

O metabolismo e distribuição de quatro flavonas C-glicosídicas - orientina, isoorientina, vitexina e isovitexina – das folhas do bambu foram investigados em ratos. Após a administração oral do extrato etanólico 30% (1,0 g/kg), as quatro flavonas C-glicosídicas foram fracamente absorvidas no trato gastrointestinal, sendo que mais de 50% destes compostos foram excretados em sua forma original. No entanto, os resultados sugerem que estes compostos permanecem no cólon tempo suficiente para executar ação antioxidante e sequestradora de radicais livres (ZHANG et al., 2007).

Além da excreção em sua forma original, algumas moléculas pequenas, como floroglucinol, ácido hidrocafeico e ácido florético foram identificadas como metabólitos das flavonas C-glicosídicas. Essas moléculas são resultado de hidrólise via deglicosilação e abertura do anel C do esqueleto flavônico, realizadas por microrganismos intestinais (Figura 6).

Figura 6: Esquema representando possíveis metabólitos das flavonas C-glicosídicas.



Isoorientina R = OH, isovitexina R = H. As vias metabólicas para orientina e vitexina são semelhantes a estas apresentadas (ZHANG et al., 2007).

2.2.3.1.1 Atividades farmacológicas

Os flavonoides C-glicosídeos estão presentes em diversas espécies vegetais ativas farmacologicamente. Considerando o enfoque da presente dissertação, a seguir serão descritas as principais atividades relacionadas para estes compostos, como as atividades: antioxidante, anti-inflamatória, anti-hiperglicêmica, no sistema nervoso central e antiúlcera (TALHI; SILVA, 2012).

2.2.3.1.1.1 Atividade antioxidante

Entre as diversas espécies vegetais com potencial efeito antioxidante, é possível destacar em algumas a presença majoritária de flavonoides C-glicosídeos. A espécie *Terminalia catappa*, por exemplo, utilizada comumente na medicina tradicional do Taiwan, possui em sua composição derivados esterificados dos flavonoides vitexina e isovitexina. Estes flavonoides foram avaliados isoladamente quanto ao seu potencial antioxidante pelo método de peroxidação de lipoproteínas de baixa densidade induzidas por $\text{Cu}^{2+}/\text{O}_2$. Foram encontrados valores de IC_{50} iguais a 2,1 μM e 4,5 μM para os derivados de vitexina e isovitexina respectivamente, sendo mais ativos que controle positivo de probucol (4,0 μM) (LIN et al., 2000 apud ANDERSEN, MARKHAM; 2006).

Os extratos metanólicos de 15 espécies de bambu foram avaliados quanto à sua atividade antioxidante por meio de bioautografia e reação com DPPH. A espécie *Bambusa textilis* McClure apresentou a maior atividade sendo que as análises cromatográficas do seu extrato metanólico demonstraram a presença dos flavonoides C-glicosídeos isoorientina 4"-O-β-D-xilopiranosídeo, isoorientina 2"-O-α-L-ramnosídeo e isoorientina (WANG et al., 2012).

Os flavonoides isoorientina, swertijaponina e isoorientina 2"-O-ramnosídeo, isolados das folhas de *Cymbopogon citratus*, foram avaliados quanto a inibição da peroxidação de LDL humano induzida por Cu²⁺. Após cinco horas de incubação, os três compostos apresentaram efeito inibitório significativo na formação de MDA-TBARS. Porém, após seis horas de incubação, apenas o flavonoide isoorientina continuou efetivo (IC₅₀ de 0,25 μM), demonstrando ser um potente inibidor da oxidação de LDL *in vitro*. A hipótese comentada pelos autores seria que compostos de caráter menos hidrofílico possuem maior disponibilidade em relação à estrutura lipídica das lipoproteínas de baixa densidade, o que conseqüentemente confere maior efeito protetor frente à oxidação (ORREGO; LEIVA; CHEEL, 2009).

Os extratos hidroetanólicos das folhas de *Passiflora alata* e *P. edulis* ricos em derivados C-glicosídeos (isoorientina, orientina, vitexina e isovitexina) foram avaliados quanto a sua atividade antioxidante em experimentos *in vitro* (TRAP) e *ex vivo* (FeSO₄ como agente indutor de estresse oxidativo). As propriedades antioxidantes apresentaram correlação significativa com o conteúdo fenólico de ambos os extratos. Além disso, de acordo com o experimento *ex vivo*, as duas espécies atenuaram a morte celular induzida por ferro, quantificada pelo teor de lactato desidrogenase, e protegeram efetivamente contra danos protéicos ocasionados por ferro e por glicose por meio de inibição dos produtos finais da glicação avançada (RUDNICKI et al., 2007).

2.2.3.1.1.2 Atividade anti-inflamatória

Em um estudo bioguiado com *Passiflora edulis* a fração *n*-butanólica apresentou atividade antiinflamatória por meio da inibição de leucócitos e neutrófilos em modelos de pleurisia induzida por carragenina em ratos. Foi verificado também que os compostos isoorientina, vicenina-2 e spinosina também apresentaram atividade antiinflamatória por inibirem a atividade da mieloperoxidase, sendo a isoorientina o composto mais ativo (ZUCOLOTTO et al., 2009).

As propriedades farmacológicas de uma fração enriquecida em flavonoides, identificados como vicenina-2, spinosina, isovitexina,

swertisina e isoswertisina, obtida a partir da fração butanólica das raízes da espécie *Cayaponia tayuya* foram avaliadas em dois modelos de edema de orelha em camundongos induzidos por TPA. No modelo agudo, a fração enriquecida em flavonoides inibiu o edema em 55% enquanto no modelo sub-crônico a inibição foi de 37% na dose de 0,5mg por orelha. Adicionalmente, esta amostra na concentração de 22,30 µg/mL inibiu a expressão de iNOS e COX-2 em 98% e 49% respectivamente, indicando que a atividade antiinflamatória ocorre por meio da inibição destas enzimas (AQUILA et al., 2009).

A atividade anti-inflamatória foi avaliada para o extrato metanólico das folhas de *Cecropia pachystachya* por meio do modelo de edema de orelha induzido por óleo de cróton. O extrato metanólico, que apresenta os compostos orientina e isoorientina, administrado por via oral (300 mg/kg) como pré-tratamento apresentou efeito similar ao fármaco indometacina, com 53% de inibição do edema. A administração tópica do extrato imediatamente após a aplicação do óleo de cróton apresentou efeito similar a dexametasona, com 83% de inibição do edema (DE OLIVEIRA ARAGÃO et al., 2012).

2.2.3.1.1.4 Atividade neurofarmacológica

Atividade neurofarmacológica de *Passiflora edulis* foi avaliada em camundongos. O extrato aquoso, fração butanólica e a fração residual aquosa do pericarpo aumentaram o tempo total gasto no compartimento claro no ensaio da caixa claro-escuro, demonstrando efeito tipo ansiolítico. Adicionalmente, o extrato aquoso potencializou os efeitos hipnótico-sedativo induzidos por éter etílico. Os possíveis compostos envolvidos nos efeitos neurofarmacológicos observados foram isoorientina, vicenina-2, spinosina e crisina-6,8-di-C-glicosídeo (SENA et al., 2009).

2.2.3.1.1.5 Atividade antihiperglicêmica

O flavonoide apigenina-6-C-β-L-fucopiranosídeo, isolado das folhas de *Averrhoa carambola* (Oxalidaceae), demonstrou efeito na redução dos níveis de glicose sanguínea em ratos hiperglicêmicos e estimulou a secreção de insulina induzida por glicose. Foi verificado também efeito estimulador da síntese de glicogênio muscular (efeito insulinomimético) além do efeito antihiperglicêmico detectado (CAZAROLLI et al., 2009).

A atividade anti-hiperglicêmica e seu mecanismo de ação também foram estudados para os extratos e flavonoides presentes nas raízes de *Wilbrandia ebracteata* (Cucurbitaceae). O extrato aquoso e

uma sub-fração metanólica reduziram a glicemia e aumentaram o conteúdo de glicogênio e de insulina sérica em ratos hiperglicêmicos. As flavonas C-glicosídicas isovitexina e swertisina, isoladas a partir do extrato metanólico, elevaram o conteúdo de glicogênio muscular 3h após tratamento e estimularam significativamente a secreção de insulina sugerindo um potencial efeito anti-hiperglicêmico dos flavonoides C-glicosídeos de *W. ebracteata* (FOLADOR et al., 2010).

2.2.3.1.1.6 Atividade antiúlcera

Atividade antiúlcera gástrica foi verificada para o extrato aquoso e hidroetanólico das folhas de *Jodina rhombifolia* (Santalaceae). O extrato aquoso e hidroetanólico foram administrados por via oral em ratos e após trinta minutos foi administrada uma solução de HCl 0,3M (1,0 mL/kg) para induzir ulceração. O pré-tratamento com o extrato hidroetanólico nas doses de 250 e 750mg/kg reduziu em 75% e 62,5% o número de animais com úlcera gástrica. A análise cromatográfica do extrato indicou a presença de uma mistura de flavonoides C-glicosídeos sendo vicenina-2, vitexina, orientina e swertisina os constituintes majoritários (MONTANHA et al., 2009).

2.2.3.1.1.7 Demais atividades

Adicionalmente às atividades já mencionadas, foram encontrados relatos para atividade antimicrobiana e radioprotetora atribuídas aos flavonoides C-glicosilados.

A atividade antimicrobiana dos extratos de *Triticum aestivum*, foi investigada pelo método de difusão em disco. O extrato em acetona rico em di-C-glicosil e C-diglicosilflavonas (luteolina-7-O-rutinosídeo, apigenina-7-O-neohesperosídeo, 6,8-di-C-glicosídeo apigenina, apigenina-6-C-glicosídeo-7-O-glicosídeo), demonstrou atividade frente a duas bactérias gram-positivas (*Sarcina lutea* e *Bacillus subtilis*). Já o extrato etanólico, rico em mono-C-glicosilflavonas – luteolina-7-glicoronídeo, 7,3'-diglicosídeo, vitexina, isovitexina- apresentou atividade frente à *Escherichia coli* (ANDERSEN, MARKHAM; 2006). O efeito protetor dos compostos orientina e vicenina-2, isolados das folhas de *Ocimum sanctum* (Lamiaceae), foi determinado em cultura de linfócitos periféricos humanos através do teste de micronúcleos. Ambos flavonoides apresentaram proteção significativa para os linfócitos humanos contra efeitos clastogênicos em concentrações baixas e não tóxicas. Os autores inferem que a radio-proteção parece estar associada com a atividade antioxidante (VRINDA; DEVI, 2001).

2.3 ESTABILIDADE

Estabilidade é definida como o tempo durante o qual a especialidade farmacêutica ou mesmo a matéria-prima considerada isoladamente mantém, dentro dos limites especificados e durante todo o período de estocagem e uso, as mesmas condições que possuía quando da época de sua fabricação (BILIA et al., 2001, SILVA et al., 2009). Segundo a legislação vigente, a estabilidade de produtos farmacêuticos depende de fatores ambientais como temperatura, umidade e luz, e de outros relacionados ao próprio produto, como propriedades físicas e químicas de substâncias ativas e excipientes farmacêuticos, forma farmacêutica e sua composição, processo de fabricação, tipo e propriedades dos materiais de embalagem (BRASIL, 2005).

Os estudos de estabilidade são preconizados com a finalidade de garantir a integridade química, física, microbiológica, terapêutica e toxicológica do fármaco e da forma farmacêutica dentro dos limites especificados, sob influência dos fatores ambientais, em função do tempo (ANSEL et al., 2007).

O estudo de estabilidade de fármacos e medicamentos descrito pela RE nº01/05 ANVISA é aplicado para realização dos testes de estabilidade de produtos farmacêuticos a fim de prever, determinar ou acompanhar o seu prazo de validade. Como parte destes estudos estão previstos os ensaios de estabilidade acelerada, de acompanhamento e de longa duração. A resolução também determina a quantificação dos produtos de degradação, assim como o método analítico utilizado correspondente, envolvendo testes de estresse ou testes de degradação forçada sob condições variadas e mais severas (BRASIL, 2005; SILVA et al., 2009). É importante destacar, porém, que em relação aos medicamentos fitoterápicos, não há guias ou resoluções de estabilidade específicos previstos na legislação.

A segurança em relação aos medicamentos fitoterápicos é uma preocupação global. Dados de pesquisa científica, mecanismos adequados para controle de qualidade, educação de fornecedores e conhecimento, destacam-se como pontos fundamentais para o campo da regulamentação do uso seguro de produtos naturais (EMEA, 2009; SAHOO; MANCHIKANTI; DEY, 2010).

Especificamente para formulações baseadas em extratos vegetais, os testes de estabilidade possuem destacada relevância, principalmente para a determinação das condições de estocagem de extratos ou medicamentos e garantia do tempo de validade dos mesmos, pois devido à alta complexidade química, as formulações fitoterápicas possuem uma

maior tendência a alterações físicas e químicas (KOPLEMAN et al., 2001). Com base nestes aspectos, os estudos de estabilidade representam uma forma de demonstrar que o produto farmacêutico pode satisfazer as especificações de segurança e qualidade durante o seu prazo de validade (SINGH; KUMAR, 2006).

2.3.1 Tipos de estudos de estabilidade

Os estudos de estabilidade podem ser realizados de diferentes modos: acelerado, longa duração, acompanhamento e degradação forçada. Nesta revisão serão abordados os estudos de estresse ou degradação forçada e estudos de estabilidade acelerada, com base nas legislações vigentes para insumos farmacêuticos ativos e para fármacos e medicamentos, e também em trabalhos científicos, considerando os experimentos que serão apresentados ao longo da dissertação. Embora não exista, até o momento, resoluções e guias específicos para estudos de estabilidade de insumos de origem vegetal, para fins de registro de medicamentos fitoterápicos a Anvisa recomenda seguir os critérios estabelecidos na RE nº 01/2005 (NETTO et al., 2006). Para a realização de estudos de estabilidade de insumos farmacêuticos ativos, a Anvisa aprovou, recentemente, um Regulamento Técnico estabelecendo os requisitos mínimos para a condução destes estudos (BRASIL, 2012).

2.3.1.1 Estudos de estresse

Os estudos em condições de degradação forçada caracterizam-se como testes realizados para avaliar a estabilidade intrínseca do insumo farmacêutico ativo. São executados sob condições mais severas do que as utilizadas no estudo de estabilidade acelerada (BRASIL, 2012).

Entre os objetivos do teste de estresse está a possibilidade da demonstração da especificidade ao desenvolver um método indicativo de estabilidade. Com base nas variadas condições experimentais destes ensaios, podem ser obtidas informações sobre os prováveis produtos de degradação formados durante o período de armazenamento e estabelecer uma possível via de degradação (AGRAWAL et al., 2004; SILVA et al., 2009).

Estes testes não visam degradar totalmente o composto, e sim promover uma degradação de pequena extensão (10-30%). Na ausência total de degradação do composto após 10 dias, o fármaco pode ser considerado estável. Se a degradação for menor que 10% é indicado aumentar as condições de estresse. As condições de estresse iniciais são realizadas, assumindo que o fármaco seja instável, portanto, sujeito a receber condições mais amenas, e, dependendo dos resultados obtidos,

aumenta-se ou diminui-se a concentração das condições de reação utilizada (SINGH; BAKSHI, 2000).

Contudo, não existe uma padronização para realização destes estudos, e na ausência de procedimentos, dificuldades são enfrentadas pelos profissionais ao decidir sobre as condições de estresse a serem utilizadas para um novo fármaco (SILVA et al., 2009). A respeito dos fitoterápicos, as diretrizes do ICH não podem ser transpostas diretamente a estes produtos, pois é necessário considerar não só a totalidade de um medicamento como excipientes e embalagem, e sim a presença de uma mistura complexa em um extrato (BILIA et al., 2001). No entanto poucos estudos dessa natureza têm sido encontrados na literatura.

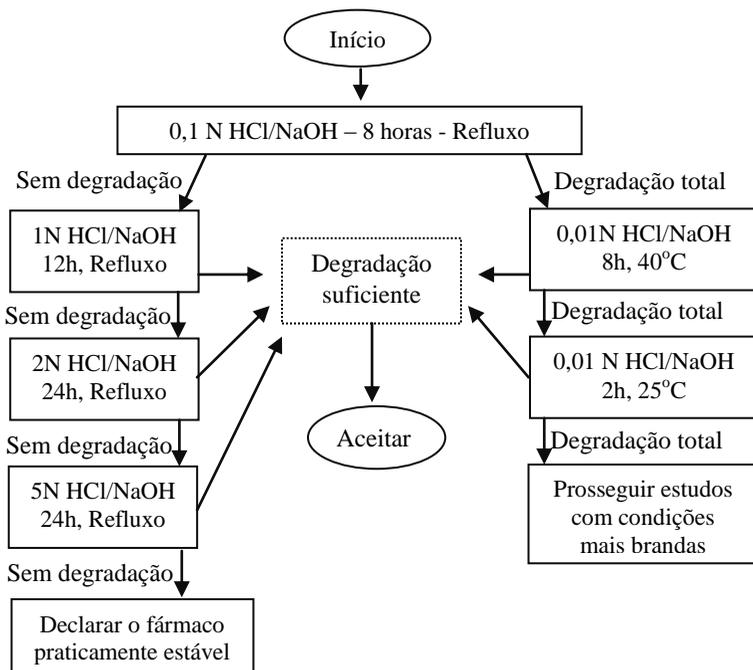
As orientações do ICH preconizam a avaliação dos efeitos da temperatura, umidade e eventualmente oxidação, fotólise e susceptibilidade à hidrólise em diversos valores de pH, que são condições típicas de degradação de fármacos (BAKSHI; SINGH, 2002; ICH, 2003; SILVA et al., 2009). Estes aspectos serão abordados com mais detalhes a seguir baseados no guia para conduzir testes de estabilidade proposto pelos autores Singh & Bakshi (2000) e em literatura relacionada.

2.3.1.1.1 Hidrólise

A água é considerada como um dos principais catalisadores em reações de degradação. Para a realização de estudos de estresse em condições de hidrólise ácida e alcalina, são utilizados geralmente o ácido clorídrico e hidróxido de sódio, respectivamente (SILVA et al., 2009).

Em condições ácidas, a concentração mais utilizada de ácido clorídrico é a de 0,1N, porém há relatos de trabalhos que utilizam 1N ou ainda normalidades superiores. Com exceção do ácido clorídrico, que é o ácido comumente usado, o ácido sulfúrico em diferentes normalidades também é relatado para experimentos de hidrólise. Para condições alcalinas, o hidróxido de sódio é frequentemente utilizado de 0,1N a 1N, sendo o hidróxido de potássio também relatado como alternativa. Existem muitas variações em relação à temperatura e ao tempo de duração do experimento, pois estas podem variar de 40°C a 110°C, e de minutos até meses (Figura 7). Para hidrólise neutra, espera-se que a decomposição ocorra em uma velocidade lenta, pois reações em pH neutro não são catalíticas e, portanto, períodos longos e temperaturas altas podem ser necessárias para obter quantidades suficientes de produtos de degradação (SINGH; BAKSHI, 2000).

Figura 7: Fluxograma do estudo de estresse sob condições de hidrólise ácida e alcalina.



Fonte: Adaptado de Singh & Bakshi, 2000.

2.3.1.1.1 Hidrólise em micro-ondas

A utilização de micro-ondas na química analítica é conhecida desde a década de 70. Entre as aplicações recentes, é possível relatar a obtenção de produtos orgânicos em escala de laboratório, com auxílio de aquecimento por meio de micro-ondas. Essas reações podem ser conduzidas em forno de micro-ondas convencional de cozinha ou em reatores específicos desenvolvidos industrialmente com este objetivo (SANSEVERINO, 2002).

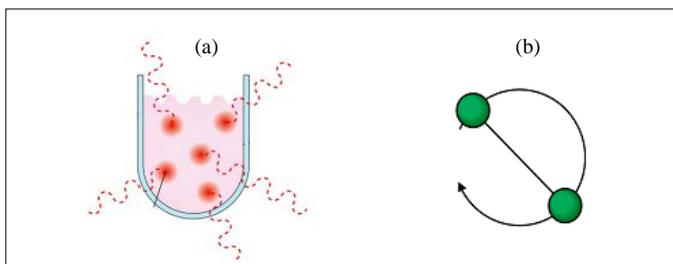
As micro-ondas constituem-se em radiação eletromagnética não ionizante, entre a região de infravermelho e ondas de rádio no espectro eletromagnético. Possuem uma frequência de 300 a 300.000 MHz. Comparativamente, as frequências mais utilizadas em uso doméstico e industrial para fins de aquecimento encontram-se em torno de 915 MHz

e 2,45 GHz, respectivamente (SANSEVERINO, 2002; CHANDRASEKARAN; RAMANATHAN; BASAK, 2012).

A energia emitida pelos fótons no micro-ondas é muito baixa em relação à energia típica necessária para clivar ligações moleculares, conseqüentemente não é capaz de induzir as moléculas à reações químicas por meio da absorção direta da energia eletromagnética, em oposição a radiação ultravioleta e visível, por exemplo. (KAPPE; PIEBER; DALLINGER, 2013).

O forno de micro-ondas fornece energia diretamente para as espécies reativas, sob forma de um aquecimento molecular. Este aquecimento é causado pela capacidade do material de absorver a energia eletromagnética de alta frequência, no caso, as micro-ondas, e convertê-las em calor. Importante ressaltar que a energia imposta é de mais baixa frequência no espectro eletromagnético, portanto, dentro desta região somente a rotação molecular é afetada e não a estrutura molecular (Figura 8) (HAYES, 2002; CHANDRASEKARAN; RAMANATHAN; BASAK, 2012).

Figura 8: Mecanismo de (a) aquecimento e (b) rotação molecular promovida por micro-ondas.



Fonte: HAYES, 2002.

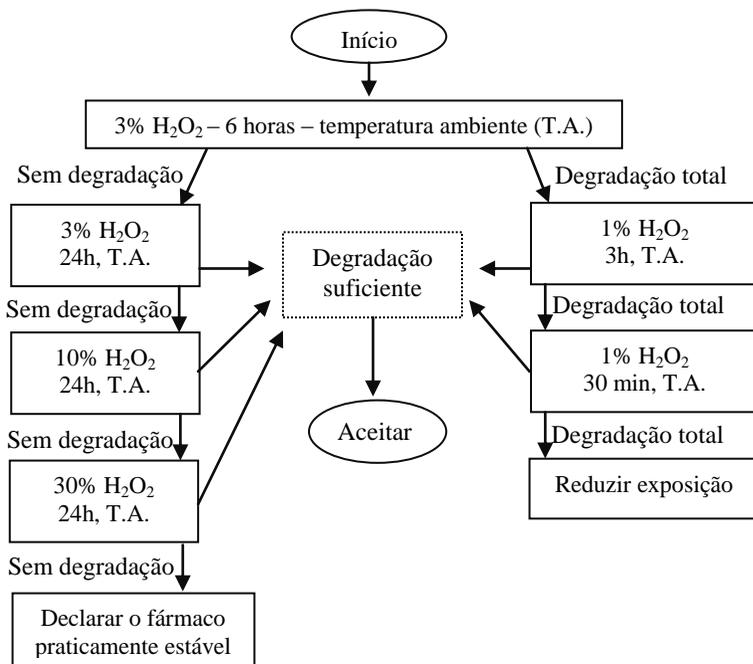
Entre as principais vantagens oferecidas por esta metodologia em relação às reações que utilizam o aquecimento convencional está a possibilidade de maiores rendimentos, maior seletividade e menor decomposição térmica, pois a energia é transferida diretamente para a amostra, não havendo contato físico com a fonte de aquecimento (SANSEVERINO, 2002). Dessa forma, a utilização do equipamento de micro-ondas configura-se como uma potente fonte de energia segura, que pode ser adaptada para diversas aplicações (HAYES, 2002). A técnica destaca-se pela grande redução nos tempos de reação e bons rendimentos (SANSEVERINO, 2002).

Estudos de estabilidade foram desenvolvidos com auxílio de equipamento micro-ondas para reações de hidrólise com o agente anti-úlceras Rebamipide. Segundo os autores, a técnica de micro-ondas mostrou-se muito efetiva na economia de tempo quando comparada a técnica por refluxo (SONAWANE; GIDE, 2011).

2.3.1.1.2 Oxidação

A reação de oxidação envolve a remoção de um átomo eletropositivo, radical ou elétron, ou a adição de um átomo eletronegativo ou radical. O peróxido de hidrogênio geralmente é utilizado para criar as condições necessárias para o estudo de oxidação, e sua concentração pode variar entre 1 a 30% (Figura 9). Esta reação pode ter um comportamento esperado, pelo fato de que alguns fármacos são susceptíveis à oxidação, enquanto outros mesmo quando submetidos a altas temperaturas e concentração de peróxido de hidrogênio de 30% não sofrem degradação (SINGH; BAKSHI, 2000; SILVA et al., 2009).

Figura 9: Fluxograma do estudo de estresse sob condições de oxidação



Fonte: Adaptado de Singh & Bakshi, 2000.

2.3.1.1.3 Fotólise

O estudo de fotoestabilidade deve ser realizado com o objetivo de demonstrar que uma exposição à luz não resulta em alterações significativas no insumo farmacêutico ativo (BRASIL, 2012). Desta forma, este estudo é uma ferramenta importante para indicação da estabilidade de fármacos dentro da indústria farmacêutica. A reação de fotólise é iniciada após a absorção de radiação eletromagnética. Considerando que grande parte dos princípios ativos empregados na preparação de medicamentos apresenta máximos de absorção na região do ultravioleta do espectro eletromagnético e que a radiação ultravioleta é muito energética, a combinação destes fatores pode propiciar a clivagem de muitas ligações químicas, favorecendo a degradação das moléculas (MORIWAKI et al., 2001; SILVA et al., 2009).

Segundo o ICH, diferentes fontes de luz podem ser utilizadas, dentre elas lâmpada fluorescente com comprimentos de onda no espectro visível e ultravioleta, lâmpada de xenônio ou lâmpada de haletos metálicos. O período de exposição pode variar, dependendo da intensidade da fonte de luz. O experimento pode ser realizado com amostras em estado sólido, mas também estado líquido, em soluções aquosas, ácidas e alcalinas, e também em solventes orgânicos como metanol e acetonitrila (ICH, 1996; SINGH; BAKSHI, 2000).

2.3.1.1.4 Temperatura

A temperatura é um fator importante que pode envolver o processo de degradação de um fármaco e não pode ser controlado por materiais de armazenamento (BOTT; OLIVEIRA, 2007).

O estudo de degradação forçada sob condições de diferentes temperaturas possibilita avaliar uma propriedade física e/ou seus produtos de degradação em função de uma temperatura controlada. A condição recomendada segundo as normas do ICH para estudos de decomposição forçada a calor seco seria 10° C acima da temperatura indicada no experimento de estabilidade acelerada (SINGH; BAKSHI, 2000).

2.3.1.2 Estudo de estabilidade acelerada

Este estudo é projetado com o objetivo de acelerar a degradação química e/ou mudanças físicas de um insumo farmacêutico ativo ou de um produto farmacêutico, sob condições forçadas de armazenamento. Segundo a legislação, este tipo de estudo vem demonstrando empiricamente e com grande probabilidade de acerto o que ocorreria no produto farmacêutico quando este é submetido a condições normais de

armazenamento por longo período de tempo (BRASIL, 2005; BRASIL, 2012).

Durante o período de armazenamento, o medicamento pode sofrer diversas alterações físicas e químicas decorrentes de reações entre os componentes da formulação, e também por agentes externos como o oxigênio, além da possibilidade de exposição a altas temperaturas e umidade. Estas interações podem alterar significativamente o estado físico do medicamento, e, por vezes, possibilitam a formação de substâncias tóxicas. Como consequência geral, o medicamento não mantém suas propriedades e a atividade necessária durante o período de vida útil (BOTT; OLIVEIRA, 2007).

As condições climáticas previstas para a realização dos estudos acelerados para insumos com condições de armazenagem de até 30 °C são de 40 °C ± 2 °C / 75% UR ± 5% UR, durante o período de seis meses (BRASIL, 2005; BRASIL, 2012). Este tipo de estudo pode ser conduzido em câmara climática ou em recipientes com soluções específicas para obtenção de umidade, que devem ser mantidas em estufas controladas com equipamentos do tipo termo-higrômetro (WEST; MAUER, 2011).

2.3.2 Experimentos de estabilidade aplicados a matérias-primas vegetais

Ainda que escassos, são encontrados na literatura alguns estudos que avaliam a estabilidade de extratos vegetais como um todo e também seus marcadores químicos isoladamente. Adaptações dos experimentos de degradação descritos para fármacos e formas farmacêuticas foram realizadas pelos autores para viabilizar estes estudos (BILIA et al., 2001; AGRAWAL et al., 2004; PATIL et al., 2009; WEST; MAUER, 2011; YATSU; BORGETTI; BASSANI, 2011).

Bilia e colaboradores (2001) avaliaram a estabilidade química do extrato seco comercial da Erva-de-são-joão (*Hypericum perforatum*) e preparações farmacêuticas elaboradas com este extrato. Foram preparadas cápsulas contendo extrato seco, lactose e estearato de magnésio. Para fins de adaptação das condições descritas pelo ICH para fármacos e medicamentos, o extrato comercial foi considerado um insumo farmacêutico e as cápsulas um medicamento. Os autores relataram a necessidade de maior conhecimento da matéria prima comercial, em função de que seus princípios ativos não são bem estabelecidos, sendo padronizada apenas quanto ao seu conteúdo total de hipericinas. As análises quantitativas demonstraram que os flavonóis representavam os constituintes majoritários (17,72%), as hiperforinas

totalizavam 4,23% enquanto as hipericinas representavam apenas 0,32% do total de extrato seco (BILIA et al., 2001).

Experimentos de estabilidade das cápsulas relatadas anteriormente foram realizados durante três meses em duas condições de temperatura e umidade, 25 °C (± 2 °C) e 60% (± 5 %) UR para teste de longo prazo e 40 °C (± 2 °C) e 75% (± 5 %) UR) para condições aceleradas. De acordo com os resultados encontrados no teste acelerado, a porcentagem residual de hiperforinas foi de 60%, de flavonois 83,3%, já as hipericinas degradaram rapidamente e após 45 dias estes compostos não foram mais detectados. No teste de longo prazo, após o período de três meses, uma degradação de mais de 70% foi detectada para hipericinas. As hiperforinas demonstraram um t_{90} de cerca de três meses, enquanto os flavonois mantiveram os teores em 98%. Em função dos resultados encontrados, os autores relatam que só a estabilidade de todos os constituintes presentes no extrato pode avaliar se o produto permanece efetivo durante o período disponibilizado para consumo (BILIA et al., 2001).

Um estudo de fotoestabilidade foi desenvolvido com o extrato aquoso seco por aspersão (spray-drying) de *Ilex paraguariensis*. O extrato acondicionado em recipiente aberto e em frascos de vidro âmbar e transparente foi exposto à radiação UVC (254 nm), em câmara espelhada, durante o período de 48 horas. As amostras foram avaliadas por cromatografia líquida nos tempos de 0, 12, 24 e 48 horas após a irradiação. Os compostos polifenólicos apresentaram-se estáveis frente à radiação recebida durante todo o período exposto (48 horas) independente do material de armazenamento (YATSU; BORGETTI; BASSANI, 2011).

Estudos de degradação por condições de estresse foram realizados com o esteróide guggulsterona, responsável pela atividade hipolipidêmica da espécie *Commiphora mukul*. Uma solução metanólica estoque do padrão de guggulsterona (1 mg/mL) foi utilizada para os experimentos. A hidrólise ácida e alcalina foi realizada com HCl e NaOH, nas concentrações de 1N a 5N, sob refluxo durante 1 e 2 horas a 80 °C. Para condições oxidativas foi utilizado peróxido de hidrogênio nas concentrações de 6% e 50%. O padrão de guggulsterona em pó foi armazenado em estufa a 90 °C durante quatro horas para estudos de degradação em calor seco, e a solução metanólica foi submetida a refluxo durante duas horas para condições de calor úmido. A fotoestabilidade foi avaliada por meio de exposição da solução estoque diretamente a luz solar (9:00 as 17:00 $\approx 30^\circ\text{C}$) durante três dias. Para análise dos experimentos foi desenvolvida uma metodologia por

cromatografia em camada delgada de alta eficiência (HPTLC), e os resultados demonstraram que a guggulsterona sofreu degradação sob condições de hidrólise ácida e alcalina, de oxidação, de calor seco e úmido e também de fotodegradação. Os autores ressaltam que o método é indicativo de estabilidade e que estes resultados podem auxiliar no estabelecimento de uma cinética de degradação da guggulsterona (AGRAWAL et al., 2004).

Estes relatos da literatura ressaltam, mais uma vez, a importância do estudo de estabilidade da composição química das matérias-primas vegetais em sua totalidade. O conhecimento do comportamento químico do extrato viabiliza, inicialmente, maior segurança em relação aos resultados obtidos nos estudos de atividade biológica, permitindo uma evolução coerente no preparo de um fitoterápico.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar a estabilidade do extrato aquoso e fração enriquecida em flavonoides da espécie *Cecropia glaziovii*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar e identificar os compostos ainda não identificados no EB e na fração enriquecida em flavonoides *C*-glicosídeos.

- Realizar experimentos para avaliação da estabilidade do extrato e da fração enriquecida em flavonoides *C*-glicosídeos sob condições acelerada e a estresse, tais como hidrólise, oxidação, luz UV e temperatura.

- Avaliar o perfil cromatográfico qualitativo e quantitativo do EB e FrMeOH durante e após os experimentos de estabilidade por cromatografia líquida de alta eficiência.

4. METODOLOGIA

4.1 MATERIAL VEGETAL

Folhas de *Cecropia glaziovii* Sneth. de indivíduos nativos foram coletadas no município de Florianópolis, Estado de Santa Catarina e identificadas pelo Prof. Dr. Daniel Falkenberg (UFSC). O material testemunho está depositado no Herbário da Universidade Federal de Santa Catarina (FLOR 37143). Após a coleta, as folhas foram secas em estufa de ar circulante (35 – 40 °C) durante três dias, moídas em moinho de facas e posteriormente acondicionadas em recipiente fechado sob abrigo da luz até a realização do processo de extração (COSTA et al., 2011).

4.2 PROCESSO EXTRATIVO E OBTENÇÃO DE FRAÇÃO ENRIQUECIDA

O material vegetal total obtido (1,584 Kg) foi submetido a extração por infusão na proporção de 1:10 (m/v) durante 30 minutos. O extrato foi filtrado, o solvente eliminado em evaporador rotatório a 40 °C, e armazenado a -20°C até o momento de realização dos experimentos (COSTA et al., 2011).

Para obtenção da fração enriquecida em compostos C-glicosídeos, o extrato bruto seco foi retomado em água, particionado com solventes de polaridade crescente (acetato de etila e *n*-butanol) e o solvente eliminado em evaporador rotatório a 40 °C. Em seguida, a fração butanólica obtida (11,59 g) foi resolubilizada em água, tratada com resina de troca iônica Amberlite® XAD-16 na proporção de 1:10:100 (m/m/v) durante 30 minutos, sob agitação. Após filtração, os compostos aderidos na resina foram extraídos com metanol durante uma hora. Finalmente, o solvente orgânico foi eliminado em evaporador rotatório e esta fração enriquecida em flavonoides C-glicosídeos, codificada como FrMeOH (5,36 g), foi também armazenada a -20°C (SILVA et al., 2010).

4.3 ANÁLISE DO PERFIL QUÍMICO

As amostras foram analisadas qualitativamente e quantitativamente por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) no tempo zero (branco) e em todas as coletas realizadas. Para as análises por CLAE foi utilizado cromatógrafo PerkinElmer Série 200 equipado com detector de arranjo de diodos, bomba quaternária, desgaseificador e

autoamostrador. Os dados foram processados no software Chromera[®] (Version 3.2.0.4847).

A metodologia utilizada para análise dos compostos presentes em *C. glaziovii* foi desenvolvida e validada no mesmo equipamento por Costa e colaboradores (2011). Como fase estacionária foi utilizada uma coluna Brownlee[®] Choice C-18 (150 × 4,6 mm i.d.; 5µm) e a fase móvel consistiu em um gradiente combinando de acetonitrila (A) e solução aquosa de ácido acético 1% (pH= 3) (B) nas seguintes condições: 0-30 minutos gradiente linear de A-B (5:95 v/v) para A-B (20:80 v/v); 30-40 minutos, isocrático A-B (20:80), com fluxo constante de 1,0 mL/min. O volume de injeção foi de 10 µL. A fase móvel foi preparada diariamente e desgaseificada através de sonicação antes da utilização. Os cromatogramas foram adquiridos no comprimento de onda de 340 nm enquanto os espectros de UV foram monitorados na faixa de 200 - 400nm. O EB foi analisado na concentração de 1,0 mg/mL para todas as amostras, enquanto a FrMeOH foi analisada na concentração de 0,5 mg/mL. Todas as análises foram realizadas em duplicata. Em seguida a esta análise, as amostras também foram avaliadas quanto à formação das agliconas apigenina e luteolina empregando os mesmos parâmetros anteriores, mas a fase móvel obedeceu às seguintes condições: 0-20 minutos gradiente linear de A-B (15:85 v/v) para A-B (35:65 v/v); 20-25 minutos, isocrático A-B (35:65 v/v), com fluxo constante de 1,2 mL/min.

Análises em cromatógrafo líquido de alta eficiência (Shimadzu LC-10A) acoplado a espectrômetro de massas (CLAE/EM-2010EV) foram realizadas com o EB na Universidade Nacional da Colômbia. A ionização foi obtida por eletrospray (ESI)-EM e o espectro foi adquirido em modo negativo, na faixa de 100 – 1000 m/z. Os parâmetros do detector e a interface foram os seguintes: voltagem do detector: 1,5 kV; tensão CDL: 150 V; temperatura CDL: 250°C; temperatura do bloco de aquecimento: 250°C; voltagem do QarrayRF: 150 V; e nitrogênio como gás nebulizador em um fluxo de 1L/min. As demais condições cromatográficas empregadas foram as mesmas descritas para análise dos compostos presentes em *C. glaziovii* por CLAE-DAD.

Como amostras de referência foram utilizados padrões Sigma-Aldrich[®]. Para verificação do perfil quantitativo durante os experimentos de estabilidade foram utilizados três marcadores: ácido clorogênico, isoorientina e isovitexina. Para isto, foram realizadas curvas de calibração nas faixas de 0,5-100 µg/mL para os flavonoides e 0,5-50 µg/mL para o ácido fenólico, com valores de coeficiente linear (r^2)

acima de 0,99. Os teores foram expressos em miligramas do composto por grama de extrato (mg/g).

4.4 ISOLAMENTO DO COMPOSTO A E B

O EB (1 g) foi submetido a diversas separações utilizando colunas de sílica gel 60 (Merck[®]) com as granulometrias de 63-200 µm e de 40-60 µm, tendo como fase móvel a combinação dos solventes acetato de etila:acetona:ácido acético:água na proporção de 60:20:10:10 (v/v) de modo isocrático. Para purificar as frações obtidas foram realizadas colunas de permeação molecular (Sephadex[®] LH-20 - GE Healthcare[®]) utilizando metanol como fase móvel.

A partir de uma fração purificada (150 mg) foram realizadas diversas análises por CLAE semi-preparativo, em equipamento Shimadzu (Columbia, MD) equipado com detector UV, sendo em cada análise injetado cerca de 30 mg/mL de amostra. Como fase estacionária foi utilizada uma coluna Phenomenex[®] Luna C-18 (250 X 10 mm; 10µ). Como fase móvel foi utilizado acetonitrila (A) e ácido acético 1% (B), nas seguintes condições: 0-25 minutos gradiente linear de A-B (10:90 v/v) para A-B (15:85 v/v); 25-45 minutos, gradiente linear de A-B (15:85 v/v) para A-B (20:80), e de 45-75 minutos isocrático de A-B (20:80), com fluxo constante de 1,0 mL/min, e detecção a 340 nm.

As separações foram monitoradas por CCD sob cromatofolhas de sílica F₂₅₄. Como sistema de fase móvel foi utilizada a combinação dos solventes acetato de etila:acetona:ácido acético:água na proporção de 60:20:10:10 (v/v). A detecção dos compostos foi realizada mediante observação dos cromatogramas sob luz ultravioleta em 254 nm para visualização de extinção de fluorescência e em seguida reveladas com reagente cromogênico Reagente Natural A (2-aminoetil difenilborinato) e posterior visualização em câmara de luz ultravioleta 366 nm para detecção de flavonoides e compostos fenólicos.

4.5 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL

A substância A (5,61 mg) foi solubilizada em DMSO-*d*₆ e submetida a ressonância magnética nuclear em equipamento Bruker 300 MHz em colaboração com o Prof. Antonio Luiz Braga da Universidade Federal de Santa Catarina.

4.6 ESTUDOS DE ESTABILIDADE

As metodologias para os testes de estresse e de estabilidade acelerada foram baseadas na legislação brasileira em vigência - RDC

Nº45 de 2012 e também o guia para conduzir experimentos de estresse elaborado por Singh e Bakshi (2000).

As amostras foram analisadas em relação às características organolépticas, através de inspeção visual quanto ao seu aspecto geral. Foram realizadas análises qualitativas e quantitativas por CLAE, utilizando metodologia descrita por Costa e colaboradores, 2011 (item 4.3).

4.7.1 Estudos de estresse

4.7.1.1 Temperatura

O EB e a FrMeOH foram submetidos ao experimento de degradação por estresse em estufa com temperatura controlada de 80 °C (± 2 °C). As amostras foram avaliadas simultaneamente sob duas formas: em pó, com experimento de duração de 60 dias, e em solução aquosa, com experimento de duração de sete dias.

Para o experimento em pó as amostras foram acondicionadas em 22 frascos abertos, sendo 11 deles contendo 20,0 mg de EB e outros 11 contendo 20,0 mg de FrMeOH. As amostras permaneceram em estufa à temperatura constante de 80 °C, sendo realizadas coletas por meio de retirada de um frasco de cada amostra nos tempos de: 1, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 25, 30, 45 e 60 dias.

Para o experimento das amostras em solução, estas foram acondicionadas em 20 frascos devidamente fechados, sendo 10 contendo EB e outros 10 contendo FrMeOH, ambas na concentração de 2,0 mg/mL. As amostras permaneceram em estufa à temperatura constante de 80 °C (± 2 °C), sendo realizadas coletas por meio de retirada de um frasco de cada amostra nos tempos de: 3, 6, 12 horas e 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 dias.

Após a coleta, as amostras em solução tiveram seus volumes corrigidos em balão volumétrico e, em seguida, todas as amostras foram armazenadas a -20°C até análise por CLAE.

4.7.1.2 Luz UV

O EB e a FrMeOH foram submetidos ao experimento de degradação por estresse em câmara espelhada, sob luz UV, no comprimento de onda de 254 nm. As amostras foram avaliadas em duas formas: em pó, com experimento de duração de 60 dias, e em solução aquosa, com experimento de duração de três dias.

Para o experimento em pó as amostras foram depositadas em uma camada fina e uniforme sobre vidro de relógio, e expostas à luz UV.

Foram realizadas coletas nos tempos de: 1, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 25, 30, 45 e 60 dias.

Para o experimento em solução, as amostras dissolvidas em solução aquosa a 5,0 mg/mL foram acondicionadas em cubetas de quartzo devidamente fechadas, sendo realizadas coletas nos tempos de: 6, 12, 24, 36, 48 e 72 horas. Após a coleta todas as amostras foram armazenadas a -20°C até análise por CLAE.

4.7.1.3 Hidrólise

O EB e a FrMeOH foram submetidos ao experimento de degradação por estresse em condições de hidrólise sob metodologia de refluxo e micro-ondas.

4.7.1.3.1 Hidrólise por refluxo

As amostras foram submetidas a condições de hidrólise alcalina, ácida e neutra sob aparato de refluxo com temperatura de 100 °C. Em condições alcalinas foi utilizado NaOH 0,1N, enquanto que para a condição ácida foi utilizado HCl 0,1N. Sob condições neutras a amostra foi solubilizada em água Milli-Q®.

Para o EB foram preparadas soluções com volume final de 30,0 mL, em concentração de 5,0 mg/mL. Para a FrMeOH foram preparadas soluções com o mesmo volume final, porém com concentração de 2,5 mg/mL. Foram coletadas alíquotas de 1,0 mL nos tempos de 1, 2, 3, 4, 6, 8 horas. Em seguida as amostras foram resfriadas neutralizadas e diluídas em balão volumétrico até concentração final de 1,0 mg/mL para o EB e 0,5 mg/mL para a FrMeOH. As amostras foram filtradas sob membrana 0,45 µm e analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência.

4.7.1.3.2 Hidrólise por micro-ondas

As amostras foram submetidas a condições de hidrólise alcalina e ácida acelerada em equipamento de micro-ondas (Discovery – Gas Addition CEM) sob pressão máxima de 300 psi, potência de 300 watts e temperatura de 100 °C.

Foram preparadas cinco alíquotas de cada amostra contendo 10,0 mg de EB e 5,0 mg de FrMeOH. Todas as alíquotas foram solubilizadas em 5,0 mL de NaOH ou HCl, ambos 0,1N. As alíquotas foram submetidas à reação de hidrólise em micro-ondas em períodos diferenciados (1, 3, 5, 7 e 10 minutos). Após a reação, as amostras foram resfriadas, neutralizadas com o ácido/base correspondente e diluídas em balão volumétrico até concentração final de 1,0 mg/mL para o EB e 0,5

mg/mL para a FrMeOH. Em seguida as amostras foram filtradas (0,45 μ M) e analisadas por CLAE.

4.7.1.4 Oxidação

Foram pesados 50,0 mg de EB e 25,0 mg de FrMeOH e solubilizados em concentrações crescentes de peróxido de hidrogênio (3, 10 e 30%). As soluções foram acondicionadas em balão volumétrico com volume final de 25,0 mL, e permaneceram devidamente fechadas e ao abrigo de luz durante o período cinco horas. Foi realizado ainda, experimento com concentração de peróxido de hidrogênio 30% para o EB e FrMeOH durante 24 horas, com análises nos tempos de 6, 12 e 24 horas.

Para análise, foram coletadas alíquotas de 5,0 mL, diluídas com água Milli-Q[®] até concentração final de 1,0 mg/mL para o EB e 0,5 mg/mL para a FrMeOH. Em seguida as amostras foram filtradas (0,45 μ M) e analisadas por CLAE.

4.7.2 Estudos sob condições de refrigeração

A influência do armazenamento sob condições de refrigeração foi avaliada durante o período de 30 dias. Para isto, soluções aquosas do EB (1,0 mg/mL) e FrMeOH (0,5 mg/mL) foram acondicionadas em frascos fechados, em geladeira a 4 °C (\pm 2 °C). A temperatura foi controlada com auxílio de termo-higrômetro. Foram realizadas coletas nos tempos de: 1, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 25 e 30 dias.

Após a coleta, as amostras em solução tiveram seus volumes corrigidos em balão volumétrico em seguida, todas as amostras foram armazenadas a -20°C até análise por CLAE.

4.7.3 Estudos de estabilidade acelerada

O EB e a FrMeOH foram submetidos durante o período de seis meses ao experimento de estabilidade acelerada com temperatura de 40 °C (\pm 2 °C) e umidade relativa de 75% (\pm 5%).

Cerca de 500 mg de cada amostra foram depositados em uma camada fina e uniforme sobre vidro de relógio. Os dois vidros de relógio contendo as amostras foram colocados em um recipiente fechado contendo solução aquosa saturada de NaCl (36,6 g NaCl – 100 g H₂O) para e armazenados em estufa a 40 °C. Durante o período do experimento a temperatura e a umidade foram controladas com a utilização de termo-higrômetro. Foram realizadas coletas mensais entre os períodos de 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias, e em seguida as amostras

foram colocadas em liofilizador para eliminar a umidade obtida durante o experimento, pesadas, e armazenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento de análise por CLAE.

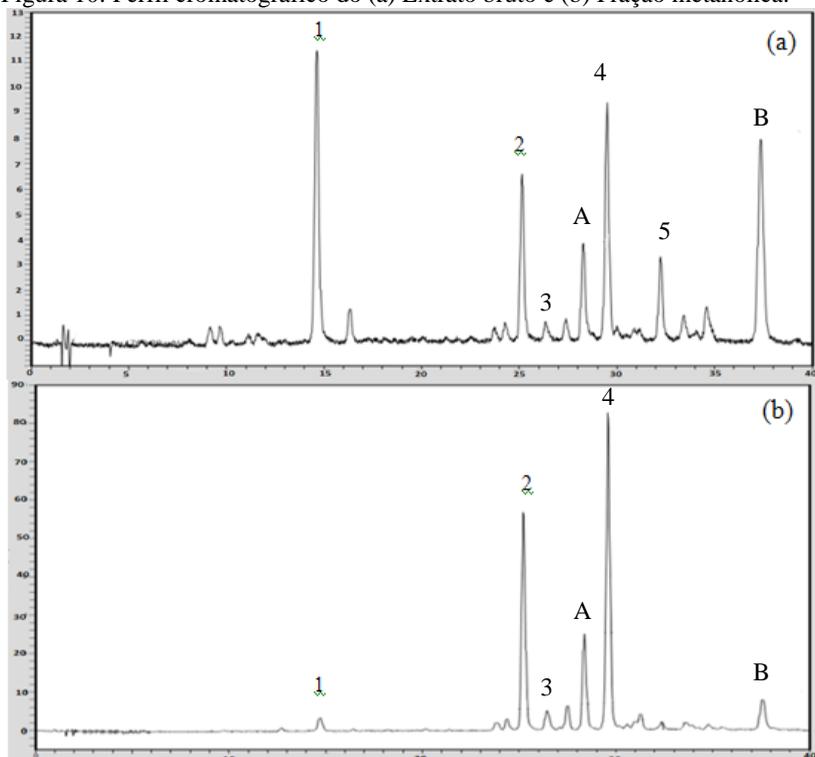
RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISE QUALI E QUANTITATIVA DO EXTRATO BRUTO (EB) E FRAÇÃO METANÓLICA (FrMeOH)

Os processos extrativos para obtenção das amostras resultaram em um total de 11,60 g de extrato bruto e 5,63 g de fração metanólica. Estas amostras foram submetidas à análise por CLAE/DAD, e o perfil qualitativo relatado por Costa e colaboradores (2011) foi confirmado para ambas amostras. Foram identificados os metabólitos: ácido clorogênico, isoorientina, orientina, isovitexina e isoquercitrina (Figura 10).

Figura 10: Perfil cromatográfico do (a) Extrato bruto e (b) Fração metanólica.

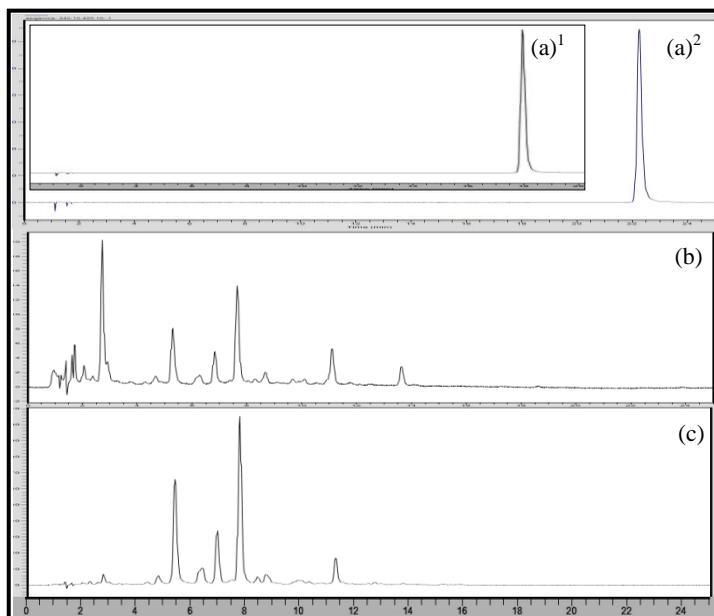


EB (1,0 mg/mL) e (b) FrMeOH (0,5 mg/mL) em $\lambda = 340$ nm (condições cromatográficas item 4.3) 1. Ácido clorogênico; 2. Isoorientina; 3. Orientina; 4. Isovitexina; 5. Isoquercitrina. Os compostos codificados como A e B são desconhecidos e estão em processo de identificação.

Entre os compostos descritos no perfil cromatográfico é possível observar somente o ácido clorogênico nos primeiros 20 minutos de análise, enquanto entre 20 e 30 minutos estão presentes os flavonoides C-glicosídeos e o composto A. Após 30 minutos de análise foram detectados o flavonoide isoquercitrina e o composto B.

O perfil cromatográfico das duas amostras também foi avaliado quanto à presença das agliconas apigenina e luteolina. As análises no tempo zero mostraram ausência destes compostos para as duas amostras (Figura 11).

Figura 11: Análise cromatográfica para identificação de apigenina e luteolina em $\lambda = 340$ nm (condições cromatográficas item 4.3).



(a)¹ Luteolina (t_r 18 min); (a)² Apigenina (t_r 22,5 min); (b) EB; (c) FrMeOH.

As análises quantitativas realizadas nas amostras submetidas aos experimentos de estabilidade foram monitoradas com base nos compostos majoritários conhecidos entre as duas amostras, sendo, para isso, os compostos ácido clorogênico, isoorientina e isovitexina escolhidos. Os teores encontrados para o EB e FrMeOH estão demonstrados na tabela 1. Estes resultados foram utilizados como tempo zero (branco) para todos os experimentos.

Tabela 1: Teor^a dos metabólitos secundários presentes no EB e FrMeOH de *C. glaziovii*, nas concentrações de 1,0 mg/mL e 0,5 mg/mL respectivamente, no t₀ de experimento.

Composto	EB	FrMeOH
Ácido clorogênico	12,83 ± 0,28	9,38 ± 0,38
Isoorientina	5,98 ± 0,03	68,77 ± 0,48
Isovitexina	7,02 ± 0,03	86,88 ± 0,95

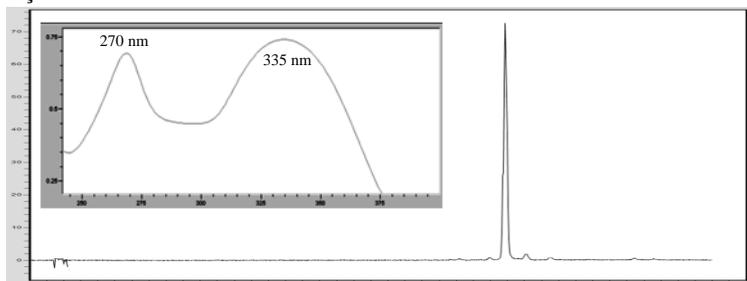
^a: Valores expressos em miligrama por grama de EB/FrMeOH ± desvio padrão. Estas análises foram realizadas em triplicata.

5.2 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS A E B

Por meio de sucessivas cromatografias em CLAE semi-preparativo foi possível isolar 5,61 mg do composto A, o qual se apresentou em forma de pó amorfo de coloração amarela. Na análise por CCD após a revelação da cromatoplaça com Reagente Natural e visualização sob luz UV 366 nm, o composto A apresentou coloração verde-amarelada, característica de flavonoides com núcleo flavona do tipo apigenina. O espectro de UV obtido durante análise por CLAE/DAD (Figura 12) também confirma a indicação de núcleo tipo apigenina com os máximos de absorção em 270 nm e 335 nm (MARKHAM, 1982).

Adicionalmente, na análise por CLAE/EM o espectro de massas do composto A apresentou pico de maior massa em m/z 563 [M-H]⁻. Esses dados são condizentes com o núcleo apigenina e sugerem a presença de dois resíduos de açúcar, que poderiam ser uma hexose e uma pentose.

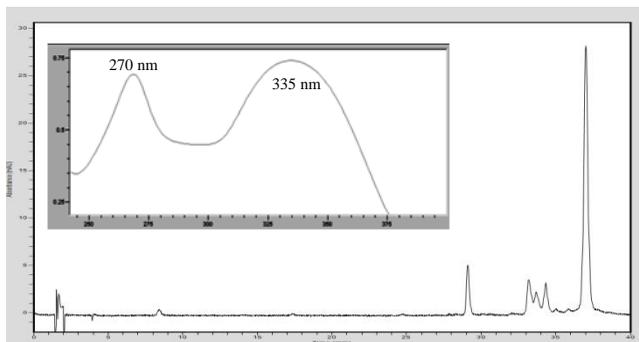
Figura 12: Cromatograma do composto A isolado; em destaque os máximos de absorção no ultravioleta.



Com os dados obtidos por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio não foi possível a elucidação total da molécula. A identificação de alguns sinais presentes no ^1H RMN auxiliou na confirmação das informações obtidas a partir dos métodos cromatográficos e espectrofotométricos. A presença de um núcleo do tipo apigenina foi verificada por meio dos sinais característicos para os quatro hidrogênios do anel aromático 1,4-disubstituído (anel B) (δ_{H} 7.68, 2H, d e δ_{H} 6.78, 2H, d). A ocorrência de um singlete (δ_{H} 6.20) poderia ser atribuída ao carbono 3 (anel C) evidenciando núcleo do tipo flavona. Adicionalmente, foi observado outro singlete (δ_{H} 5.58) em região desblindada, possivelmente referente ao anel A, indicando a ocorrência de um anel pentasubstituído. Essas informações e a elucidação total da estrutura precisam ser confirmadas por ^{13}C RMN e por espectros de correlação HSQC e HMBC.

Em relação ao composto B foi possível obter uma fração purificada de rendimento muito baixo (1,58 mg), que impossibilitou a análise por ressonância magnética nuclear. O espectro de UV (Figura 13) obtido durante análise por CLAE-DAD indicou a ocorrência de núcleo tipo apigenina com os máximos de absorção em 270 nm e 335 nm, valores semelhantes a substância A e aos flavonoides vitexina e isovitexina (MARKHAM, 1982; COSTA et al., 2011).

Figura 13: Cromatograma de uma fração enriquecida no composto B, em destaque os máximos de absorção no ultravioleta.



Na análise por CLAE/EM o espectro de massas composto B apresentou pico de maior massa de m/z 474 $[\text{M-H}]^-$. Esses dados são condizentes com o núcleo apigenina e sugerem a presença de um resíduo de açúcar, possivelmente uma hexose. Além disso, a diferença de massa poderia indicar a presença de uma acetila na molécula. No entanto, é

necessário isolar maior quantidade dessa substância e maiores investigações espectroscópicas para confirmar a identidade deste possível flavonoide.

5.3 EXPERIMENTOS DE ESTABILIDADE

Os medicamentos fitoterápicos normalmente são constituídos de conjuntos de substâncias responsáveis pela atividade farmacológica (SCHENKEL; GOSMANN; PETROVICK, 2011). Dada a complexidade química de um fitoterápico, muitos medicamentos disponíveis no mercado são padronizados quantitativamente por faixas de teores de seus marcadores químicos que garantem a atividade farmacológica do extrato (Tabela 4).

Para avaliação do perfil quantitativo considerou-se uma faixa de teor (Tabela 3) que compreendeu os limites de 5% acima e 5% abaixo do teor encontrado no tempo zero dos experimentos. Os teores referentes às análises dos experimentos encontrados dentro desta faixa foram considerados como alteração não relevante em relação ao tempo zero. Utilizou-se esta variação de 5% com base na exatidão do método analítico por CLAE (Tabela 2), previamente descrito (COSTA et al., 2011).

Tabela 2: Exatidão do método analítico para os compostos fenólicos presentes em *C. glaziovii*.

Composto	Recuperação	
	Média (%)	Desvio padrão (%)
Ácido clorogênico	98,9	0,2
Isoorientina	101,1	1,7
Orientina	101,6	3,8
Isovitexina	104,9	0,9

Fonte: COSTA e colaboradores (2011).

Tabela 3: Faixa de teor^a dos metabólitos secundários considerada como inalterada/semelhante no EB e FrMeOH.

Composto	EB	FrMeOH
Ácido clorogênico	12,20 – 13,50	8,93 – 9,83
Isoorientina	5,62 – 6,34	65,30 – 72,20
Isovitexina	6,67 – 7,37	82,50 – 91,20

^a: Valores expressos em mg/g de EB/FrMeOH

Tabela 4: Exemplos de medicamentos fitoterápicos disponíveis no mercado brasileiro que utilizam faixa de teor do marcador químico.

Medicamento	Teor de marcador químico	Laboratório
Acheflan [®] <i>Cordia verbenacea</i> DC.	2,3 – 2,9% de alfa-humulento	Aché – Laboratórios Farmacêuticos S.A.
Antistax [®] <i>Vitis vinifera</i>	3 - 7% de flavonoides totais (quercetina-3-O-beta-D-glucuronida)	Boehringer Ingelheim do Brasil Quím. e Farm. Ltda.
Fisioton [®] <i>Rhodiola rosea</i> L.	2,0 – 4,0 % de rosavina	Aché – Laboratórios Farmacêuticos S.A.
Flexive [®] CDM <i>Symphytum officinale</i> L.	0,2 - 0,5% de alantoína	Importado por: MERCK S.A.
Galenogal Elixir [®] <i>Salix Alba</i> Linné	30 - 36 mg (5 - 6%) de salicina	Kley Hertz S.A. Indústria e Comércio
Monaless [®] <i>Oryza sativa</i> fermentado por <i>Monascus purpureus</i>	0,4 - 0,6% de monacolin K	Marjan Indústria e Comércio Ltda.
PHITOSS [®] <i>Hedera helix</i> L.	hederacosídeo C - 0,777mg/mL ± 10%	Brasterápica Indústria Farmacêutica Ltda.
Prostat - HPB [®] <i>Serenoa repens</i>	272 – 304 mg (85 - 95%) de ácidos graxos	Marjan Indústria e Comércio Ltda.
Respiratus [®] <i>Hedera helix</i> Linné	Hederacosídeo C - 0,75 mg/mL ± 20%	Medley S.A. Indústria Farmacêutica
Unha de gato [®] <i>Uncaria tomentosa</i>	4,5 - 5,5 mg de alcaloides totais (mitrafilin)	Herbarium Laboratório Botânico Ltda.
Vescaten [®] <i>Melilotus officinalis</i>	4,0 - 5,4 mg (15 - 20%) de cumarina	Marjan Indústria e Comércio Ltda.

Fonte: ANVISA, Bulário Eletrônico.

5.3.1 Estudos de estresse

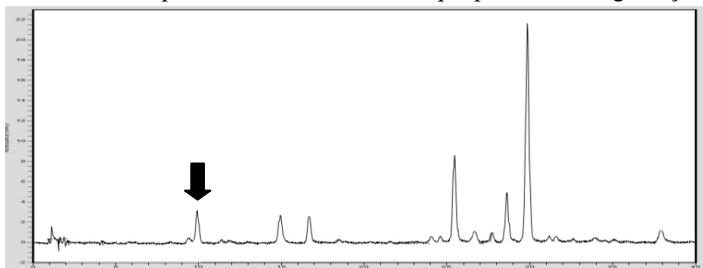
Os estudos de estresse ou de degradação forçada são realizados sob condições extremas e permitem avaliar a estabilidade intrínseca do insumo farmacêutico, fornecendo abordagens de formulação e indicando tipos de adjuvantes, aditivos de proteção específicos e de acondicionamento, que provavelmente melhorarão a integridade do fármaco e do produto. Por meio deste estudo é possível, também, demonstrar a especificidade do método analítico, principalmente quando as informações disponíveis sobre os possíveis produtos de degradação são escassas (ROLIM et al., 2009). No presente trabalho, utilizou-se método previamente desenvolvido (COSTA et al., 2011) para quantificação de compostos fenólicos em espécies de *Cecropia*, embora este método não tenha sido anteriormente aplicado para estudos de degradação forçada.

5.3.1.1 Temperatura

A influência da temperatura foi avaliada a 80 °C (± 2 °C) para o EB e FrMeOH. As amostras foram submetidas em estufa sob forma de solução aquosa e pó.

As soluções apresentaram escurecimento de acordo com o aumento do tempo de exposição, entretanto, não foi observada a formação de precipitado e tampouco outra alteração visual significativa. Em relação ao perfil qualitativo da solução do EB, foi observada, já na primeira análise (3 h), a formação de um produto de degradação com tempo de retenção de 9,5 minutos (Figura 14), porém este se degradou totalmente e não foi mais detectado na análise de 72 horas. O mesmo pico ocorreu somente em traços nas amostras em solução da FrMeOH. Não foi detectada a formação das agliconas apigenina e luteolina durante todo o período dos experimentos.

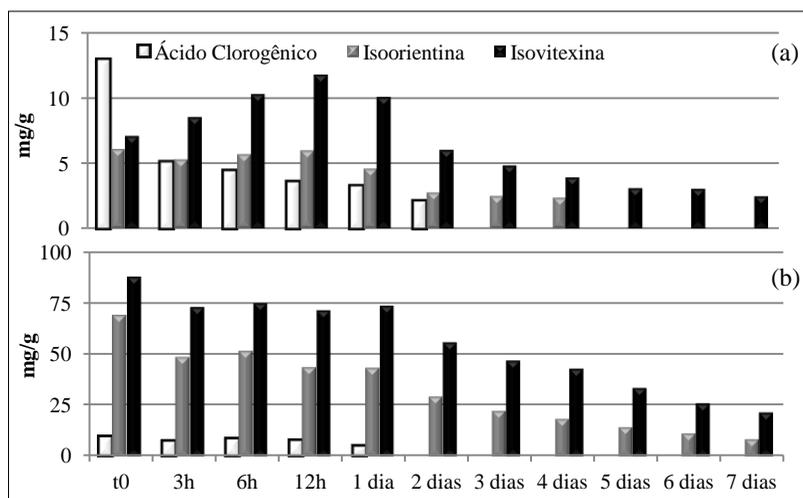
Figura 14: Cromatograma da solução do EB na análise de 12 horas do experimento de temperatura a 80 °C. Em destaque produto de degradação.



Os marcadores quantificados mostraram alterações em seus teores durante a realização do experimento nas duas amostras. O ácido clorogênico mostrou-se pouco estável sendo observada degradação total até o terceiro e até o segundo dia de experimento para o EB e FrMeOH, respectivamente. Os flavonoides também mostraram alterações significativas, e ao final dos experimentos foram encontrados teores inferiores destes compostos em comparação ao t_0 para ambas as amostras (Figuras 15). A isoorientina degradou-se totalmente entre o quarto e o quinto dia de experimento no EB, sendo que na FrMeOH o teor encontrado ao final do experimento foi aproximadamente 88% menor. -.

Especificamente em relação ao flavonoide isovitexina, foi observado um aumento significativo de seu teor nas quatro primeiras análises do EB de cerca de 43% (Figura 15_(a)). Neste mesmo período, também foi observada uma redução na altura/intensidade dos picos com tempo de retenção superiores a 30 minutos, especialmente o flavonoide isoquercitrina e o composto B. Na FrMeOH este composto apresentou diminuição gradativa de seu teor durante todas as análises, sendo encontrado no final do experimento um teor cerca de 75% menor.

Figura 15: Teores^a dos marcadores presentes no (a) EB e (b) FrMeOH em solução durante o experimento de temperatura a 80 °C (± 2 °C).

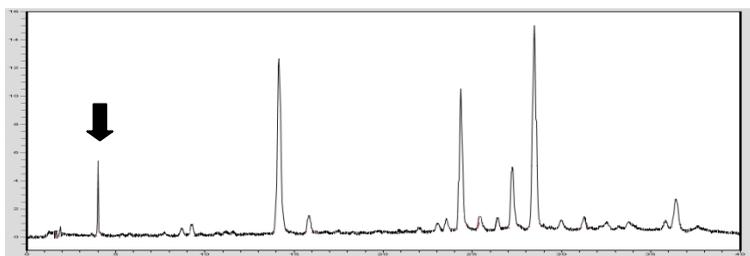


^aValores expressos em mg/g de EB/FrMeOH.

Para as amostras submetidas em forma de pó não foi percebida nenhuma alteração nas características visuais durante os 60 dias de

experimento. Em relação ao perfil qualitativo do EB foi observada a formação de um produto de degradação a partir terceiro dia de experimento, com tempo de retenção de 4,6 minutos (Figura 16). Já para a FrMeOH não foi identificada a formação de produto de degradação. Adicionalmente, também não foi detectada a formação de apigenina e luteolina para ambas as amostras testadas.

Figura 16: Cromatograma do pó do EB no sétimo dia do experimento de temperatura 80 °C (± 2 °C). Em destaque produto de degradação.



No EB (Figura 17) não foram observadas alterações relevantes no teor de isoorientina (Tabela 5). O ácido clorogênico apresentou diminuição de aproximadamente 9% em seu teor ao final dos 60 dias de experimento.

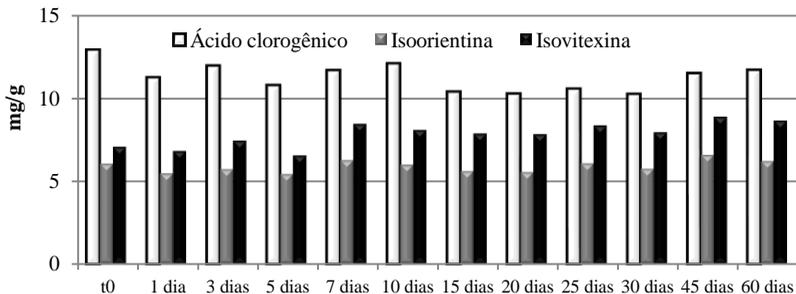
O flavonoide isovitexina não apresentou alterações relevantes em seu teor durante cinco dias de experimento, porém no sétimo dia foi verificado um aumento no teor deste flavonoide de aproximadamente 20% este que permaneceu sem alterações relevantes até o final do experimento. Paralelo a este aumento, também foi observada a diminuição da intensidade dos picos dos compostos com tempo de retenção superiores a 30 minutos nas análises por CLAE/DAD (isoquercitrina e composto B).

Tabela 5: Teores^a dos marcadores no EB na forma de pó durante o experimento de temperatura a 80°C (± 2 °C).

Marcadores	EB	
	t ₀	60 dias
Ácido clorogênico	12,83	11,63
Isoorientina	5,98	6,15
Isovitexina	7,02	8,60

^aValores expressos em mg/g de EB.

Figura 17: Teores^a dos marcadores presentes no EB na forma de pó durante o experimento de temperatura a 80 °C (± 2 °C).



^aValores expressos em mg/g de EB.

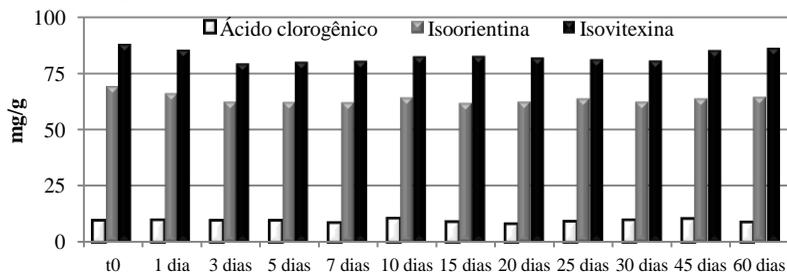
Para a FrMeOH (Figura 18) foi verificada uma diminuição de 5% no teor de ácido clorogênico ao final do experimento. Já para os flavonoides não foram observadas alterações relevantes em seus teores em relação ao tempo zero (Tabela 6).

Tabela 6: Teores^a dos marcadores no FrMeOH na forma de pó durante o experimento de temperatura a 80 °C (± 2 °C).

Marcadores	FrMeOH	
	t ₀	60 dias
Ácido clorogênico	9,10	8,46
Isoorientina	68,77	65,56
Isoviteína	87,43	85,74

^aValores expressos em mg/g de EB.

Figura 18: Teores^a dos marcadores presentes na FrMeOH em forma de pó durante o experimento de temperatura a 80 °C (± 2 °C).



^aValores expressos em mg/g de FrMeOH.

A temperatura é um fator relevante a ser considerado no processo de degradação de um insumo farmacêutico especialmente pela dificuldade em controlar sua influência através de materiais de armazenamento (BOTT; OLIVEIRA, 2007). Para as soluções submetidas à temperatura de 80 °C, de forma geral, foi verificada redução nos teores dos marcadores químicos analisados já nos primeiros dias de experimento. Por sua vez, o pó comportou-se de forma diferenciada a 80 °C, para o ácido clorogênico, por exemplo, foram observadas reduções inferiores a 10% em seu teor ao final do experimento em relação a degradação total verificada para as amostras em solução aquosa. Considerando os flavonoides, uma diminuição superior a 50% no teor dos compostos foi observada para as amostras em solução, sendo que para as amostras em pó não foram encontrados alterações relevantes nos teores destes compostos para ambas amostras, com exceção do aumento no teor de isovitexina no EB aliado à diminuição de intensidade do composto B.

5.3.1.2 Luz UV

A influência da luz ultravioleta (254 nm) foi avaliada no EB e FrMeOH nas formas de solução e pó. Foram observadas alterações de coloração das soluções nas duas amostras, visto que estas se tornaram escurecidas de acordo com o aumento do tempo de exposição à luz UV. Por outro lado, o pó não apresentou mudanças visuais aparentes.

As soluções das duas amostras mostraram-se instáveis frente ao estresse por luz ultravioleta, sendo observada uma diminuição dos teores dos três metabólitos ao final dos experimentos (Tabela 7). No entanto, nas metodologias por CLAE empregadas para avaliação do perfil qualitativo, não foi observada formação de produtos de degradação.

Tabela 7: Teores^a dos marcadores no EB e FrMeOH na forma de solução durante o experimento de exposição à luz UV (254 nm).

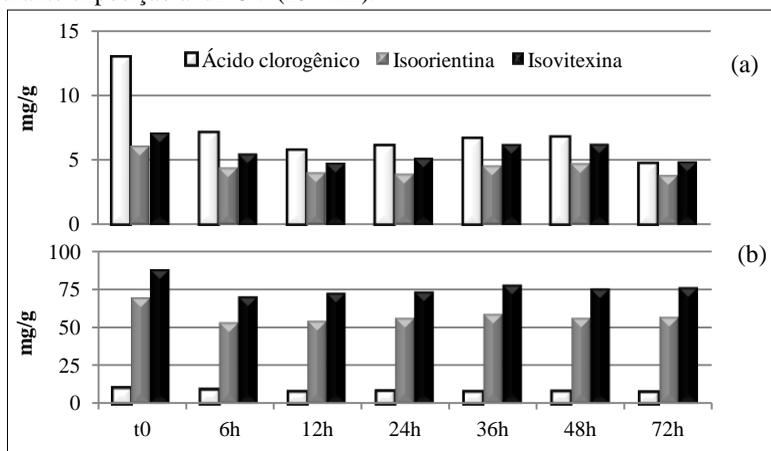
Marcadores	EB		FrMeOH	
	t ₀	72 horas	t ₀	72 horas
Ácido clorogênico	12,83	4,74	9,38	6,88
Isoorientina	5,98	3,79	68,77	56,22
Isovitexina	7,02	4,87	86,88	75,87

^aValores expressos em mg/g de EB/FrMeOH.

Cabe destacar, também, que os marcadores analisados apresentam valores maiores de degradação no EB quando comparados a FrMeOH (Figura 19). O ácido clorogênico, por exemplo, apresentou

uma diminuição de 63% no EB enquanto na FrMeOH esta diminuição foi de 24%. O mesmo ocorreu para os flavonoides isoorientina e isovitexina, que no EB apresentaram valores de 37% e 31%, enquanto na FrMeOH a diminuição foi de apenas 18% e 13%, respectivamente.

Figura 19: Teores^a dos marcadores presentes na solução (a) EB e (b) FrMeOH durante exposição à luz UV (254 nm).



^aValores expressos em mg/g de EB/FrMeOH.

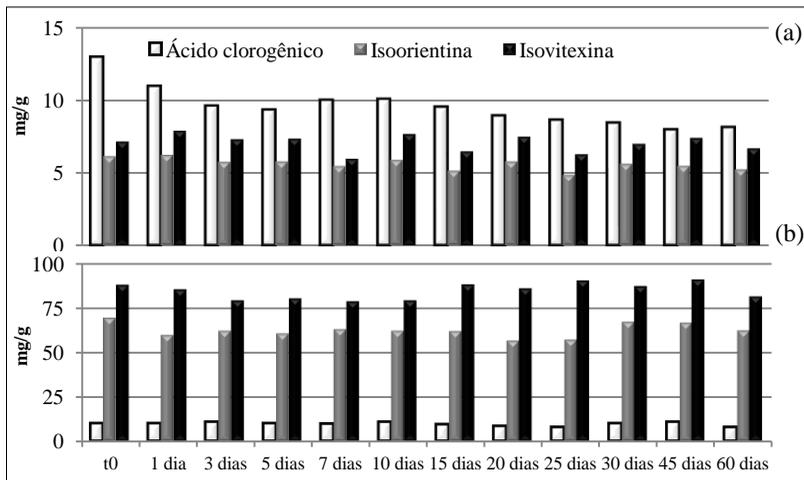
O perfil quantitativo das duas amostras em pó indicou variação relevante para o ácido clorogênico ao final dos experimentos (Tabela 8). Comparativamente, no EB este metabólito apresentou um teor 29,95% menor, enquanto na FrMeOH este teor foi de 12,69%. Para os flavonoides foram observadas diminuições nos teores para as duas amostras, no EB a isoorientina apresentou diminuição de aproximadamente 9% enquanto a isovitexina apresentou 6%, e para a FrMeOH foram encontrados valores respectivos a 10% e 7% para estes compostos (Figura 20).

Tabela 8: Teores^a dos marcadores no EB e FrMeOH na forma de pó durante o experimento de exposição à luz UV (254 nm).

Marcadores	EB		FrMeOH	
	t ₀	60 dias	t ₀	60 dias
Ácido clorogênico	12,83	8,09	9,38	7,15
Isoorientina	5,98	5,42	68,77	61,87
Isovitexina	7,02	6,59	86,88	80,91

^aValores expressos em mg/g de extrato/FrMeOH.

Figura 20: Teores^a dos marcadores presentes no pó (a) EB e (b) FrMeOH durante o experimento de exposição à luz UV (254 nm).



^aValores expressos em mg/g EB/FrMeOH.

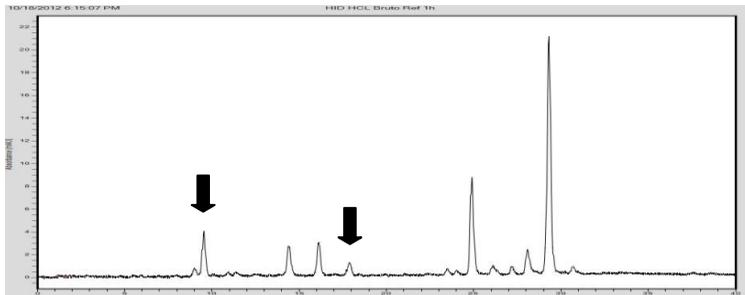
5.3.1.3 Hidrólise

5.3.2.3.1 Hidrólise por refluxo

O EB e a FrMeOH foram submetidas a condições de hidrólise ácida (HCl 0,1N), alcalina (NaOH 0,1N) e neutra sob refluxo a 100 °C. A possível formação de apigenina e luteolina, em virtude das condições de hidrólise impostas nos experimentos, foi monitorada em todas as análises, contudo não foi verificada a formação destes compostos.

As análises do perfil qualitativo na hidrólise ácida mostraram um produto de degradação formado nas duas amostras, com tempo de retenção de 17,9 minutos (Figura 21). Ainda para o EB, foi observado outro pico adicional com tempo de retenção de 9,5 minutos, o qual também foi detectado no experimento de temperatura do EB em solução (Figura 14).

Figura 21: Cromatograma do EB na primeira hora de experimento de hidrólise ácida (HCl 0,1 N). Em destaque os produtos de degradação formados.



O ácido clorogênico mostrou-se instável frente às condições ácidas de hidrólise nas duas amostras. No EB (Figura 22) ao final do experimento foi verificada uma diminuição de aproximadamente 56% no teor deste marcador, enquanto na FrMeOH (Figura 24) foi observada sua degradação total entre a segunda e a terceira hora de experimento.

No EB (tabela 9), o flavonoide isoorientina não apresentou alteração relevante em seu teor durante todas as análises do experimento. Já para a isovitexina, observou-se um aumento no seu teor em cerca de 75% na primeira análise, e após esta alteração, o teor permaneceu com apenas pequenas alterações até o final do experimento (Figura 22).

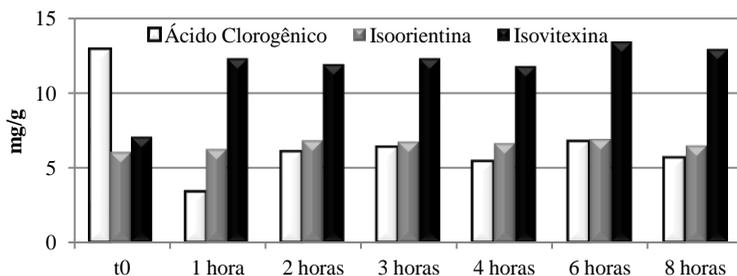
Tabela 9: Teores^a dos metabólitos no EB durante o experimento de hidrólise ácida (HCl 0,1 N) por refluxo.

Marcadores	EB	
	t_0	8 horas
Ácido clorogênico	12,83	5,65
Isoorientina	5,98	6,45
Isovitexina	7,02	12,9

^aValores expressos em mg/g de EB/FrMeOH.

n.d.: não detectável

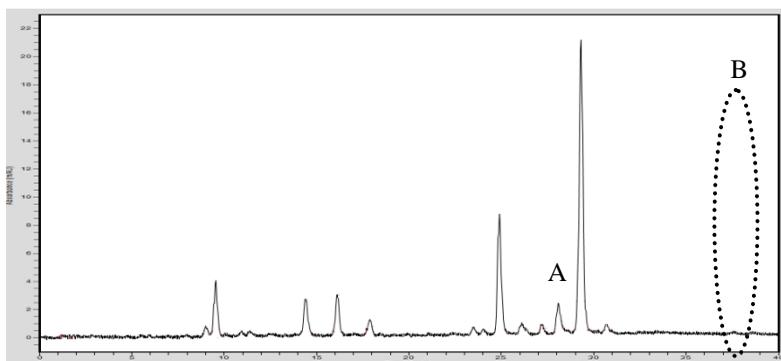
Figura 22: Teores^a dos marcadores presentes no EB durante o experimento de hidrólise ácida (HCl 0,1 N) sob refluxo.



^aValores expressos em mg/g de EB.

Ainda em relação ao perfil qualitativo do EB, mais especificamente aos compostos A e B, observou-se uma diminuição da intensidade destes compostos durante o experimento (Figura 23). O composto B (t_r 37,4), juntamente com o ácido clorogênico e os flavonoides isoorientina e isovitexina, são os compostos majoritários do EB (Figura 9_(a)). Considerando a degradação total do composto B sob condição de hidrólise ácida já na primeira hora do experimento e o aumento considerável do flavonoide isovitexina, relatado anteriormente, também na primeira hora de experimento, considera-se a hipótese do composto B influenciar no aumento do teor da isovitexina, visto que a soma das áreas dos produtos de degradação observados não é equivalente à área do composto B.

Figura 23: Perfil cromatográfico do EB na primeira hora do experimento de hidrólise ácida (HCl 0,1 N) sob refluxo. Em destaque, degradação total do composto B.



O perfil quantitativo da FrMeOH no experimento de hidrólise ácida apresentou-se diferente ao do EB em relação aos flavonoides (Figura 24). Foi verificada também uma diminuição gradativa do teor de isoorientina, sendo que ao final do experimento o teor encontrado foi aproximadamente 34% menor em relação ao t_0 (Tabela 10). Paralela a esta diminuição foi observado o aumento da intensidade do flavonoide orientina, o qual apresentava intensidade muito baixa no tempo zero da FrMeOH (Figura 25). A isovitexina não apresentou alterações relevantes de teor durante o experimento.

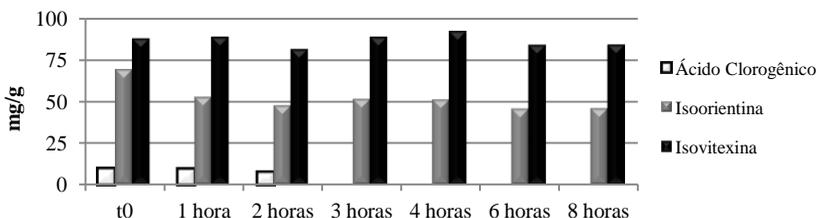
Tabela 10: Teores^a dos marcadores na FrMeOH durante o experimento de hidrólise ácida (HCl 0,1 N) por refluxo.

Marcadores	FrMeOH	
	t_0	8 horas
Ácido clorogênico	9,38	n.d.
Isoorientina	68,77	45,40
Isovitexina	86,88	83,91

^aValores expressos em mg/g de FrMeOH.

n.d.: não detectável

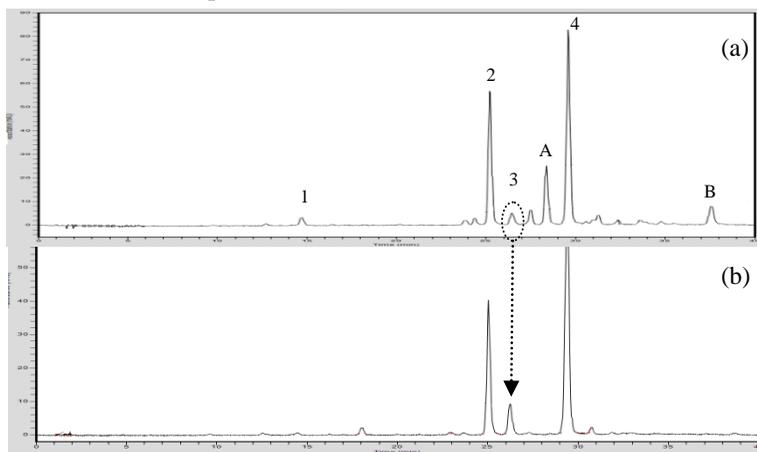
Figura 24: Teores^a dos marcadores presentes na FrMeOH durante o experimento de hidrólise ácida (HCl 0,1 N) sob refluxo.



^aValores expressos em mg/g de FrMeOH.

O aumento da intensidade do composto orientina (Figura 25) pode ocorrer em função da presença do seu isômero isoorientina na amostra avaliadas, pois em meio ácido estes compostos são suscetíveis ao rearranjo de Wessely-Moser (MARKHAM, 1982) hipótese já descrita no item 2.2.1.1 da revisão da literatura do presente trabalho. Entretanto são necessárias análises com o composto isolado e com teor conhecido de orientina para confirmação da ocorrência deste rearranjo.

Figura 25: Perfil cromatográfico da FrMeOH (a) tempo zero e (b) 8 horas de experimento de hidrólise ácida (HCl 0,1 N) sob refluxo. Em destaque, aumento de intensidade do composto orientina.

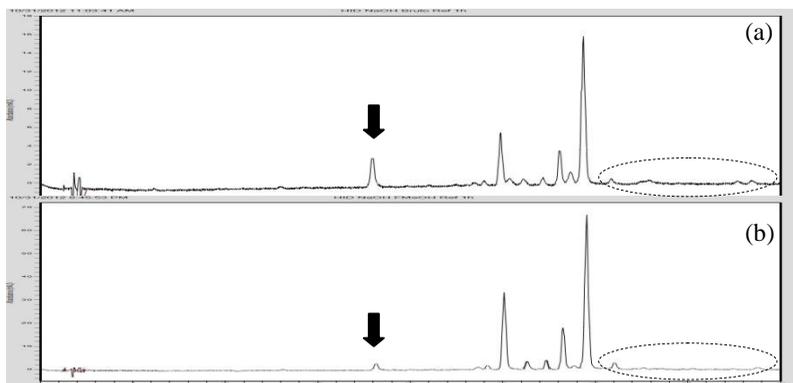


(1) Ácido clorogênico; (2) Isoorientina; (3) orientina; (4) Isovitexina; (A) Composto desconhecido A; (B) Composto desconhecido B.

Ao final do experimento na FrMeOH ainda foi possível visualizar no perfil qualitativo que os compostos A e B degradaram totalmente (Figura 25_(b)), enquanto os flavonoides C-glicosilados foram encontrados apesar das alterações no teor de isoorientina. Diante do exposto para hidrólise ácida nas duas amostras, durante oito horas de experimento, foi observado que os flavonoides C-glicosídeos apresentaram-se mais estáveis em comparação ao ácido clorogênico, hipótese esta já descrita previamente na literatura (HARBORNE; MABRY, 1982; ANDERSEN, MARKHAM; 2006).

A condição de hidrólise alcalina, por sua vez, demonstrou forte interferência no perfil quali e quantitativo das amostras. Foi observado um produto de degradação para as duas amostras na primeira análise do experimento, com tempo de retenção de 17,9 minutos (Figura 26). Porém, este composto degrada-se rapidamente, não sendo mais detectado a partir da terceira hora de experimento. Os compostos com tempo de retenção acima de 30 minutos (isoquercitrina e composto B) sofreram degradação já na primeira análise para as duas amostras.

Figura 26: Perfil cromatográfico em (a) EB e (b) FrMeOH na primeira hora do experimento de hidrólise alcalina sob refluxo. Em destaque da esquerda para direita o produto de degradação formado e o desaparecimento da isoquercitrina e composto B.



O teor do ácido clorogênico apresentou rápida diminuição, não sendo possível quantificá-lo a partir da terceira hora de experimento no EB, além de já não ser detectado na primeira análise do experimento na FrMeOH. A isoorientina apresentou redução no teor durante todo o experimento, degradando-se totalmente no EB entre três e quatro horas de experimento, e entre quatro e seis horas na FrMeOH (Figura 27).

O flavonoide isovitexina apresentou novamente aumento no seu teor de cerca de 35% , identificado já na primeira análise do EB. No entanto, as análises posteriores demonstraram uma diminuição gradativa deste teor até o final do experimento. Em relação à FrMeOH, foi verificada uma redução do teor deste flavonoide durante todo o período do experimento (Tabela 11).

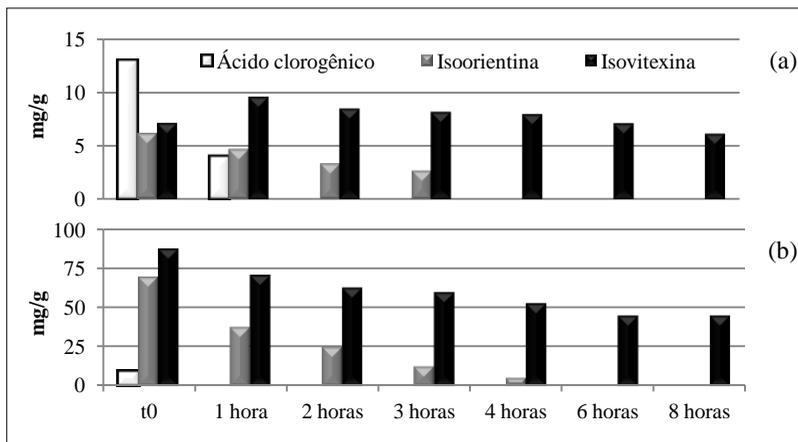
Tabela 11: Teores^a dos metabólitos no EB e FrMeOH durante o experimento de hidrólise alcalina (NaOH 0,1 N) por refluxo.

Marcadores	EB		FrMeOH	
	t_0	8 horas	t_0	8 horas
Ácido clorogênico	12,83	n.d.	9,38	n.d.
Isoorientina	5,98	n.d.	68,77	n.d.
Isovitexina	7,02	6,05	86,88	44,89

^aValores expressos em mg/g de EB/FrMeOH.

n.d.: não detectável.

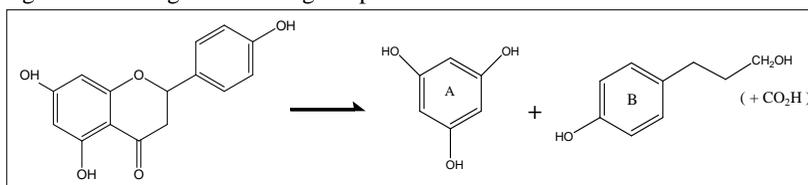
Figura 27: Gráfico demonstrando os teores^a dos marcadores presentes (a) EB e (b) FrMeOH durante o experimento de hidrólise alcalina (NaOH 0,1 N) sob refluxo.



^aValores expressos em mg/g de EB/FrMeOH.

A hidrólise alcalina provocou maiores alterações em relação aos flavonoides presentes nas duas amostras quando comparada à hidrólise ácida. Contudo, a metodologia utilizada para identificação de produtos de degradação e a possibilidade de formação de apigenina e luteolina, não foi suficiente para compreender este processo de degradação. Dados na literatura mostram que a condição alcalina de hidrólise conduziria a abertura do anel C, produzindo dois fragmentos compostos do anel A e anel B (Figura 28). Reação semelhante foi demonstrada por Zhang e colaboradores (2007) para o metabolismo dos flavonoides isoorientina e isovitexina, previamente relatado (item 2.2.3.1.1). Análises posteriores devem ser conduzidas para identificar a possível formação destes compostos com o objetivo de compreender o processo de degradação visualizado para os flavonoides em meio alcalino.

Figura 28: Clivagem alcalina geral para flavonoides



Fonte: MARKHAM, 1982.

O comportamento das amostras sob condição de hidrólise neutra também foi avaliado. Em relação ao perfil qualitativo, foi observada a formação de um produto de degradação no EB, com tempo de retenção de 9,5 minutos, o mesmo já relatado no experimento de temperatura para a mesma amostra EB (Figura 14). Não foram detectados picos adicionais para FrMeOH nas análises por CLAE/DAD.

O ácido clorogênico demonstrou degradação de aproximadamente 63% no final do experimento no EB. Já na FrMeOH foi observada sua degradação total entre a segunda e a terceira hora de experimento (Tabela 11). O flavonoide isoorientina não apresentou alteração relevante em seu teor nas duas amostras avaliadas. Para a isovitexina, foi observado no EB um aumento de cerca de 28% em seu teor no final do experimento, embora na FrMeOH os teores deste composto não tenham apresentado alteração significativa (Figura 29).

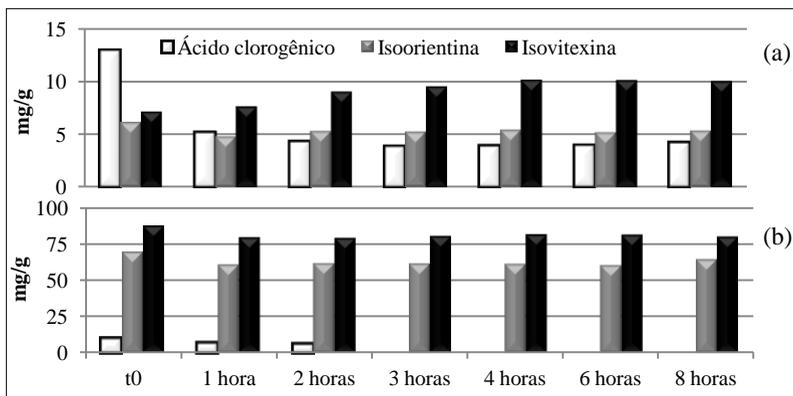
Tabela 12: Teores^a de metabólitos presentes no EB e FrMeOH durante o experimento de hidrólise neutra sob refluxo.

Marcadores	EB		FrMeOH	
	t ₀	8 horas	t ₀	8 horas
Ácido clorogênico	12,83	4,24	9,38	n.d.
Isoorientina	5,98	5,40	68,77	63,66
Isovitexina	7,02	9,89	86,88	79,78

^aValores expressos em mg/g de EB/FrMeOH.

n.d.: não detectável

Figura 29: Teores^a dos marcadores presentes (a) EB e (b) FrMeOH durante o experimento de hidrólise neutra sob refluxo.

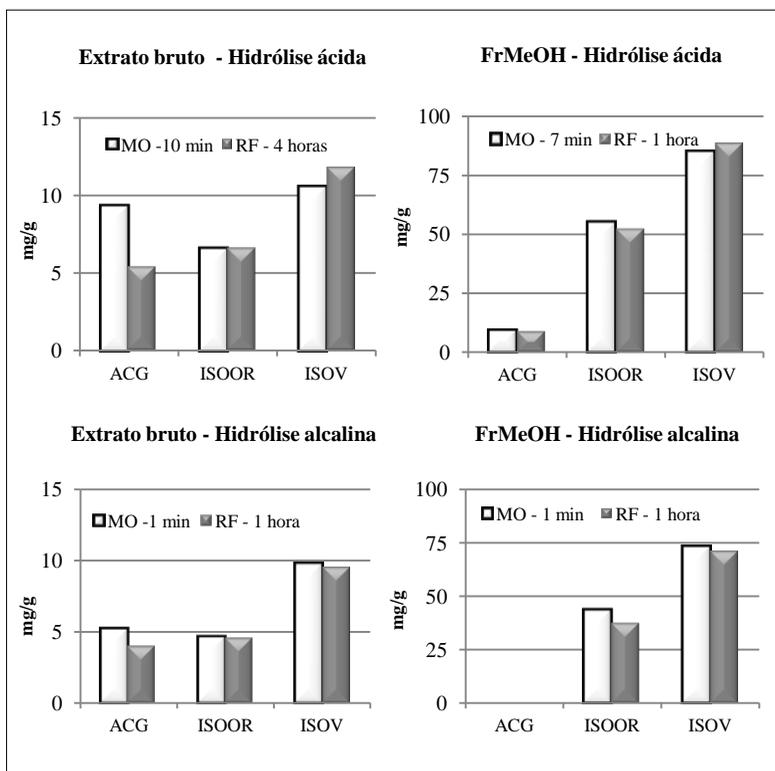


^aValores expressos em mg/g de EB/FrMeOH.

5.3.1.3.2 Hidrólise por micro-ondas

As amostras foram avaliadas em condições de hidrólise alcalina e ácida acelerada por equipamento de micro-ondas. As reações foram realizadas na ordem de minutos, e foi possível comparar estes resultados com os obtidos pela técnica de refluxo, realizada em horas. O perfil qualitativo obtido foi semelhante ao já descrito para as hidrólises em refluxo. A semelhança entre os teores obtidos entre as duas técnicas está demonstrada na figura 30.

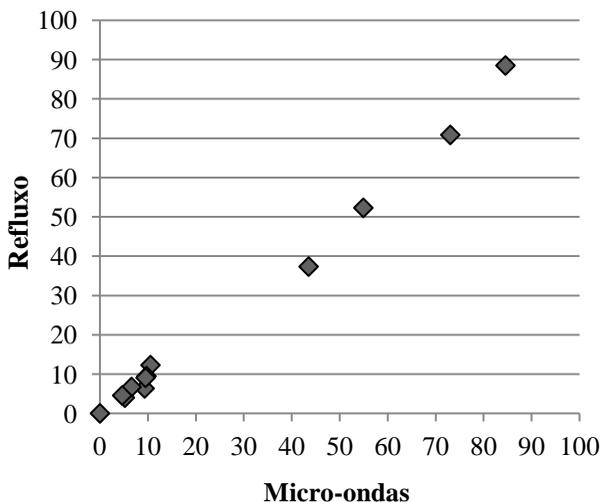
Figura 30: Comparação entre as metodologias utilizadas para os experimentos de hidrólise por refluxo e micro-ondas.



ACG- ácido clorogênico; ISOOR – Isoorientina; ISOV –Isovitexina; MO- micro-ondas; RF- refluxo.

Os teores obtidos para os três marcadores e para as duas amostras teste, relatados anteriormente, foram correlacionados para as duas técnicas utilizadas, sendo verificada uma correlação significativa ($P= 0,9964$) e linear ($r^2=0,9929$) evidenciando a efetividade da técnica de micro-ondas em relação ao tradicional refluxo utilizado para reações de hidrólise (Figura 31).

Figura 31: Gráfico de correlação entre os teores obtidos para os três marcadores (ácido clorogênico, isoorientina e isovitexina) nas duas técnicas empregadas, micro-ondas e refluxo, para hidrólise alcalina e ácida ($P= 0,9964$) ($r^2=0,9929$).

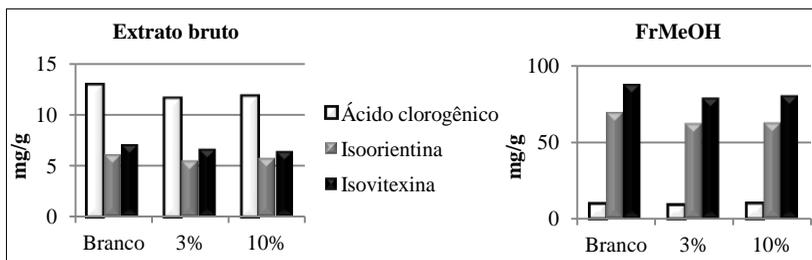


Reações com auxílio de equipamentos micro-ondas podem ser aplicadas com bastante efetividade para qualquer esquema de reação, com o objetivo de obter rendimentos melhores e mais rápidos (HAYES, 2002). Embora os resultados obtidos pelas duas técnicas de hidrólise tenham sido semelhantes, o tempo de realização dos estudos foi diferenciado. As reações em micro-ondas foram realizadas em um tempo de duração máximo de 10 minutos, enquanto na técnica de refluxo este tempo foi de 1 a 4 horas. Desta forma, a técnica de micro-ondas, promove além da economia de tempo uma redução no tempo de exposição das amostras à altas temperaturas quando comparada com o sistema de refluxo.

5.3.1.4 Oxidação

O efeito do peróxido de hidrogênio como agente oxidante foi avaliado nas concentrações de 3, 10 e 30% no EB e FrMeOH durante cinco horas. Não foram verificadas alterações relevantes nos perfis quali e quantitativo das amostras nas concentrações de 3% e 10% de peróxido de hidrogênio (Figura 32).

Figura 32: Teores dos marcadores no EB e FrMeOH submetidas a oxidação com H_2O_2 nas concentrações de 3% e 10%.



Com base nestes resultados, foi realizado novo experimento durante 24 horas com peróxido de hidrogênio 30%. O peróxido de hidrogênio 30% não alterou o perfil qualitativo das amostras, assim como não foi detectada a formação de produtos de degradação. Porém foram verificadas alterações no perfil quantitativo das amostras.

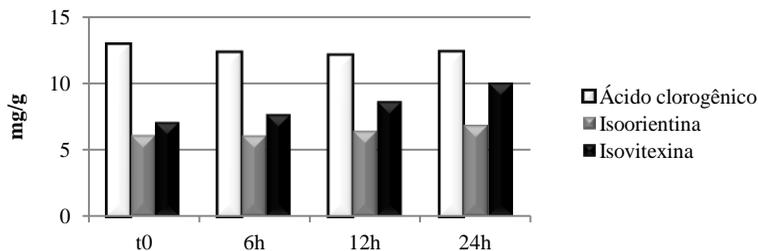
No EB, não foram detectadas alterações significativas em relação ao tempo zero para o ácido clorogênico e isoorientina durante as 24 horas de experimento (Tabela 13). Especificamente para a isovitexina não foi verificada alteração relevante no seu teor na primeira análise do experimento (Figura 33). Contudo, nas análises seguintes (12 – 24h) foi verificado um aumento gradativo em seu teor, novamente paralelo a diminuição da intensidade do composto B. Ao final do experimento foi verificado um aumento no teor de isovitexina de aproximadamente 29%.

Tabela 13: Teores^a de metabólitos presentes no EB durante o experimento de oxidação com H_2O_2 30%.

Marcadores	EB	
	t ₀	24 horas
Ácido clorogênico	12,83	12,33
Isoorientina	5,98	6,32
Isovitexina	7,02	9,99

^aValores expressos em mg/g de EB

Figura 33: Teores^a dos marcadores presentes no EB durante o experimento de oxidação com H₂O₂ 30%.



^aValores expressos em mg/g de EB.

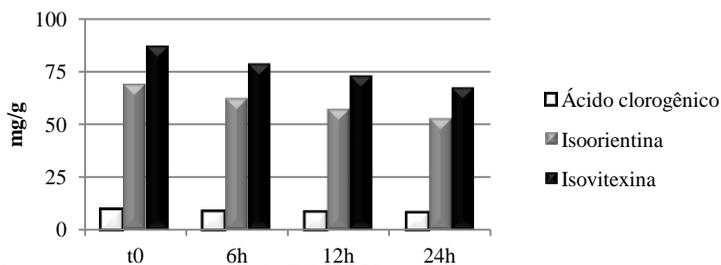
Em relação à FrMeOH (Figura 34), não foi observada alteração no perfil qualitativo durante todo experimento. Para o perfil quantitativo, uma diminuição de intensidade de todos os picos presentes no cromatograma foi verificada (Tabela 14).

Tabela 14: Teores^a de metabólitos presentes na FrMeOH durante o experimento de oxidação com H₂O₂ 30%.

Marcadores	FrMeOH	
	t ₀	24 horas
Ácido clorogênico	9,38	7,84
Isoorientina	68,77	52,51
Isovitecina	86,88	67,20

^aValores expressos em mg/g de EB.

Figura 34: Teores^a dos marcadores presentes na FrMeOH durante o experimento de oxidação com H₂O₂ 30%.

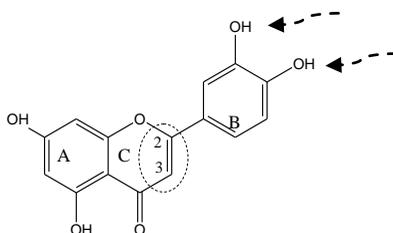


^aValores expressos em mg/g de FrMeOH.

Segundo RICE-EVANS (2001), os flavonoides são relatados como agentes antioxidantes por meio de diversas propriedades, entre elas, a ação como *scavengers* de espécies ativas de oxigênio (EAO). As

características estruturais principais atribuídas a esta atividade, estão relacionadas ao número e posição de suas hidroxilas fenólicas ligadas ao núcleo flavônico, como por exemplo, o grupo catecol (3', 4'- dihidroxi) no anel B, e a insaturação entre os carbonos 2 e 3 do anel C (Figura 35). Neste caso, o grupo catecol está presente nos flavonoides de núcleo luteolina (isoorientina e orientina). Por outro lado, os compostos isovitexina, composto A e composto B não apresentam a hidroxila do C-3', característica estrutural típica de núcleos apigenina, além da insaturação entre os carbonos 2 e 3 do anel C, característica de flavonoides de núcleo flavona.

Figura 35: Características estruturais atribuídas à atividade antioxidante dos flavonoides.



Fonte: Adaptado de RICE-EVANS (2001).

O EB e a FrMeOH mostraram-se resistentes a oxidação imposta por meio do agente peróxido de hidrogênio nas concentrações de 3 e 10%. No entanto, os flavonoides presentes de forma majoritária na FrMeOH após seis horas de experimento com H₂O₂ 30% tiveram seus teores diminuídos, enquanto o composto B no EB, também se mostrou sensível a esta condição de oxidação.

5.3.2 Estudos sob condições de refrigeração

O perfil quali e quantitativo das duas amostras também foi avaliado em condições de refrigeração com temperatura de 4 °C (± 2 °C) durante o período de 30 dias. Para análise dos teores dos marcadores foi atribuída uma faixa de teor considerando novamente a exatidão do método analítico em relação ao tempo zero do experimento (Tabela 15).

Tabela 15: Faixa de teor^a dos marcadores considerada como inalterada/semelhante no EB e FrMeOH para o experimento de temperatura de refrigeração.

Composto	EB	FrMeOH
Ácido clorogênico	10,37 – 11,46	8,39 – 9,27
Isoorientina	4,93 – 5,45	58,29 – 64,43
Isovitexina	6,12 – 6,77	75,22 – 83,14

^aValores expressos em mg/g de EB/FrMeOH

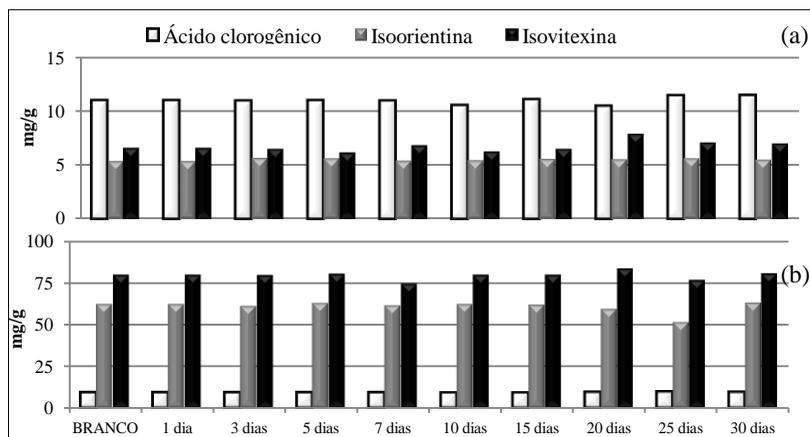
As soluções das duas amostras não apresentaram mudanças na sua característica visual, e o perfil qualitativo manteve-se inalterado durante todo experimento. Adicionalmente, também não foram identificadas alterações relevantes nos teores (Tabela 16) dos três marcadores avaliados (Figura 36).

Tabela 16: Teores^a dos marcadores no EB e FrMeOH durante o experimento de temperatura a 4 °C (± 2 °C).

Marcadores	EB		FrMeOH	
	t ₀	30 dias	t ₀	30 dias
Ácido clorogênico	10,92	11,40	8,83	9,09
Isoorientina	5,19	5,39	61,36	62,21
Isovitexina	6,45	6,73	79,18	79,93

^aValores expressos em mg/g de EB/FrMeOH.

Figura 36: Teores^a dos marcadores presentes (a) EB e (b) FrMeOH durante o experimento sob condições de refrigeração (4 °C).

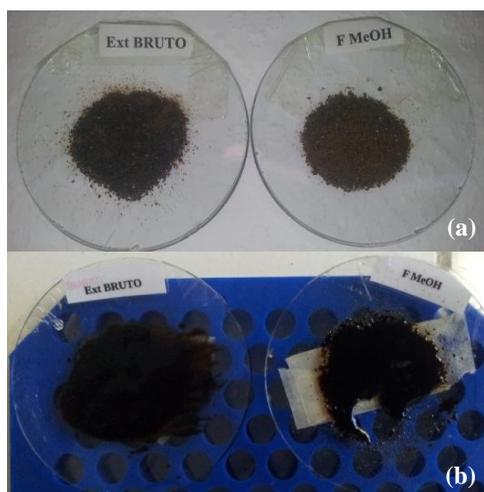


^aValores expressos em mg/g de EB/FrMeOH.

5.3.3 Estudo de Estabilidade Acelerada

Conforme RDC 45 (Brasil, 2012) “*os estudos de estabilidade acelerada são projetados para acelerar possível degradação química ou física e/ou mudanças físicas de insumos ativo em condições forçadas de armazenamento*”. As condições climáticas previstas para a realização dos estudos acelerados são $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) e 75% ($\pm 5\%$) de umidade relativa para insumos farmacêuticos ativos em condições de até $30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nestas condições as amostras apresentaram características visuais distintas já no primeiro mês do estudo. O EB adquiriu característica de líquido enquanto a FrMeOH ficou completamente aderida a superfície (Figura 37).

Figura 37: Fotografias ilustrativas das amostras durante o estudo de estabilidade acelerada ($40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ / $75\% \pm 5\%$ de umidade relativa) (a) tempo zero, (b) sexto mês.



Fonte: O autor.

O perfil cromatográfico do EB também apresentou modificações no primeiro mês do experimento, sendo possível perceber uma degradação total dos compostos que possuem tempo de retenção superior a 30 minutos (Figura 38). Comportamento semelhante foi observado para a FrMeOH (Figura 39), porém a degradação total destes compostos foi verificada apenas a partir do quarto mês do experimento. Não foi observada formação de produtos de degradação, e tampouco a

formação das agliconas apigenina e luteolina durante o período do experimento.

Figura 38: Cromatogramas do EB em (a) t_0 e (b) primeiro mês do estudo de estabilidade acelerada ($40\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ / $75\% \pm 5\%$ de umidade relativa). Em destaque, degradação da isoquecitrina e do composto B.

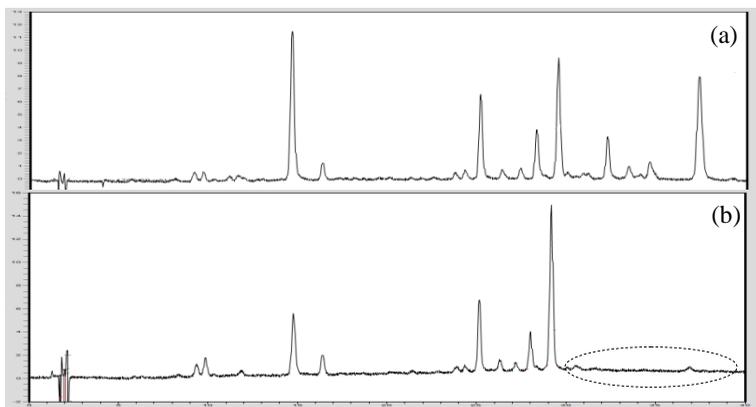
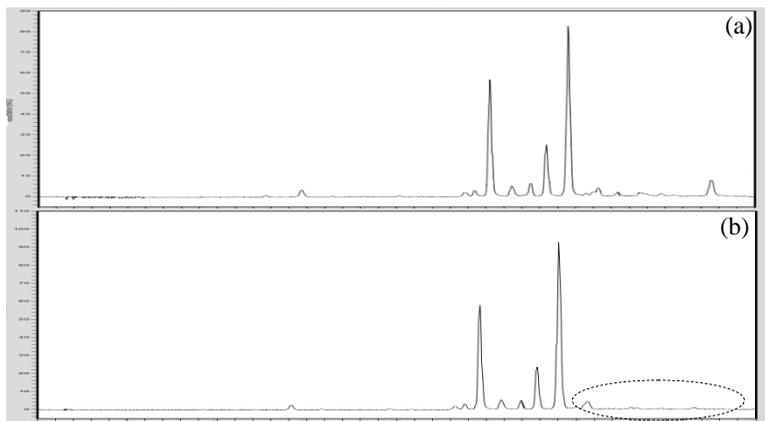


Figura 39: Cromatogramas da FrMeOH em (a) t_0 e (b) quarto mês do estudo de estabilidade acelerada ($40\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ / $75\% \pm 5\%$ de umidade relativa). Em destaque, degradação da isoquecitrina e composto B.



No EB, os três compostos utilizados como marcadores apresentaram degradação significativa ao final do experimento (Tabela 17). O ácido clorogênico apresentou uma diminuição superior a 50% de seu teor inicial (55,57%) já na análise do primeiro mês. A isoorientina

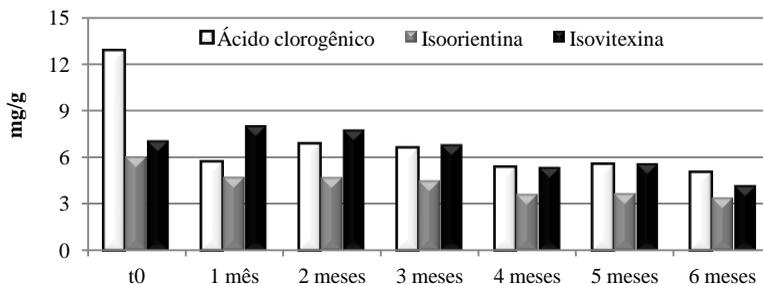
demonstrou redução no teor durante todo o experimento. A isovitexina apresentou um aumento cerca de 14% no primeiro mês do experimento, porém nas análises dos meses seguintes foi observado decaimento gradativo destes teores até o final do experimento (Figura 40).

Tabela 17: Teores^a dos metabólitos no EB durante o estudo de estabilidade acelerada ($40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}/75\% \pm 5\%$ de umidade relativa).

Marcadores	EB	
	t_0	6 meses
Ácido clorogênico	12,83	5,70
Isoorientina	5,98	3,38
Isovitexina	7,02	4,17

^aValores expressos em mg/g de EB.

Figura 40: Teores^a dos marcadores presentes no EB durante o estudo de estabilidade acelerada ($40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C} / 75\% \pm 5\%$ de umidade relativa).



^aValores expressos em mg/g de EB.

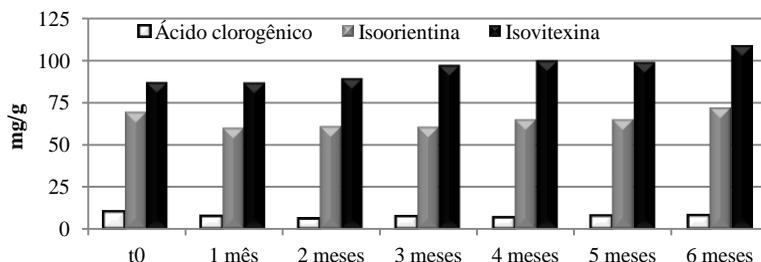
A FrMeOH apresentou comportamento diferenciado para os flavonoides quando comparado ao EB (Figura 41). O composto isoorientina não apresentou diferença de teor relevante no final do experimento (Tabela 18). O teor de isovitexina manteve-se sem alterações relevantes até o segundo mês do experimento (86,88 – 89,09 mg/g), porém, a partir do terceiro mês houve aumento relevante, sendo que ao final do sexto mês este flavonoide apresentou teor aproximadamente 25% maior comparado ao t_0 . O ácido clorogênico mostrou comportamento semelhante ao EB, demonstrando degradação a partir do primeiro mês do experimento sendo verificada uma diminuição de 21% no sexto mês quando comparada ao t_0 .

Tabela 18: Teores^a dos metabólitos na FrMeOH durante o estudo de estabilidade acelerada (40 °C ± 2 °C / 75% ± 5% de umidade relativa).

Marcadores	FrMeOH	
	t ₀	6 meses
Ácido clorogênico	9,38	5,70
Isoorientina	68,77	71,31
Isovitexina	86,88	108,63

^aValores expressos em mg/g de FrMeOH.

Figura 41: Teores^a dos marcadores presentes na FrMeOH durante o estudo de estabilidade acelerada (40 °C ± 2 °C / 75% ± 5% de umidade relativa).



^aValores expressos em mg/g de FrMeOH.

Os resultados deste experimento sugerem que o ácido clorogênico, ácido fenólico presente nas duas amostras, apresenta certa instabilidade, porém na FrMeOH sua degradação foi aproximadamente duas vezes menor, quando comparada ao EB, possivelmente pelos teores inferiores deste composto na FrMeOH em relação ao EB. Em relação os flavonoides, foi observada maior estabilidade destes compostos em relação ao ácido fenólico, sendo que a fração enriquecida (FrMeOH) demonstrou maior estabilidade para os três compostos avaliados em relação ao seu extrato de origem (EB).

Considerando os estudos realizados sob condições de refrigeração (4 °C), em que as amostras mantiveram-se estáveis, sugere-se que as condições de armazenamento do EB e fração sejam entre 2 e 8 °C. Desta forma, novos estudos acelerados devem ser realizados, utilizando as seguintes condições: 25 °C ± 2 °C/60% ± 5% de umidade relativa, conforme previsto na resolução (BRASIL, 2012).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conclusões e Perspectivas

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os medicamentos fitoterápicos consistem em misturas complexas de diversos componentes, e, na maioria dos casos, os compostos responsáveis pelos efeitos terapêuticos são desconhecidos (EMEA, 2009). Dessa forma, a padronização do perfil químico é o primeiro passo para o estabelecimento de uma atividade biológica segura e reprodutível (MAITI et al., 2011).

Os produtos naturais, assim como qualquer substância farmacologicamente ativa, podem estar propensos à degradação, especialmente durante o seu período de armazenamento, levando a uma possível perda dos componentes ativos, produção de metabólitos sem atividade, e em casos extremos, produção de metabólitos tóxicos. Com o avanço da utilização de produtos à base de plantas, foi observado que muitos constituintes podem reagir entre si, despertando a preocupação sobre a estabilidade destes compostos e formulações (THAKUR et al., 2011).

A aplicação dos testes de estabilidade em produtos com base natural é um desafio, pois o extrato vegetal em sua totalidade é considerado matéria-prima ativa, independente dos componentes responsáveis pela atividade terapêutica serem conhecidos (MAITI et al., 2011). Segundo uma publicação do European Medicines Agency (EMEA, 2009), estabelecer cenários específicos em relação à estabilidade de preparações a base de produtos naturais é considerada de importância primária.

Admitindo as considerações acima, a proposta de realização deste trabalho teve como base conhecer o comportamento dos compostos presentes na matéria-prima vegetal quando submetidos a condições de estabilidade aceleradas e também a condições de estresse, realizados no extrato bruto e em uma fração enriquecida nos compostos majoritários e biologicamente ativos do extrato, neste caso, os flavonoides. Os estudos de estabilidade realizados forneceram informações relevantes que podem auxiliar no desenvolvimento de uma formulação com maior conhecimento das propriedades químicas da matriz vegetal.

O extrato aquoso de *Cecropia glaziovii* é constituído por compostos fenólicos, e, entre eles estão presentes duas classes de metabólitos secundários, os ácidos fenólicos e os flavonoides. Em relação aos ácidos fenólicos, o ácido clorogênico faz parte dos compostos majoritários do extrato aquoso. Considerando os flavonoides,

esses compostos estão presentes em sua forma conjugada a moléculas de açúcar, destacando-se como compostos majoritários os flavonoides C-glicosídeos isoorientina e isovitexina, e em menor escala, a orientina e a isoquercitrina, sendo este último um flavonoide tipo *O*-glicosídeo. Ainda são encontrados outros dois compostos, codificados como compostos A e B, sendo também o composto B um dos constituintes majoritários do extrato bruto.

A respeito dos compostos desconhecidos no extrato bruto, análises cromatográficas e espectrofotométricas permitiram inferir que estes compostos também pertencem à classe dos flavonoides. Para o composto A, foi possível observar características estruturais por RMN ^1H que confirmam a ocorrência de um flavonoide pertencente à classe das flavonas com núcleo do tipo apigenina, e a partir da massa total do composto obtida por espectrometria de massas sugere-se a presença de dois resíduos de açúcar ligados a este flavonoide. Já para o composto B, sugere-se a ocorrência também de um flavonoide pertencente às flavonas com núcleo do tipo apigenina, mas a presença de um resíduo de açúcar e de uma acetila na molécula.

Análises da fração enriquecida (FrMeOH) confirmaram que esta era constituída majoritariamente pelos compostos isovitexina, isoorientina, composto A, composto B e orientina. O ácido clorogênico também está presente, porém, ao contrário do extrato bruto, este é minoritário na FrMeOH quando comparado aos flavonoides.

Em relação aos estudos de estabilidade realizados, cabe destacar que nos testes envolvendo estresse, são utilizadas condições extremas, as quais fornecem informações sobre as rotas de degradação dos produtos que poderiam ser produzidos durante o período de armazenamento (SINGH; BAKSHI, 2002; SILVA et al., 2009). Os estudos de estabilidade acelerada tiveram como objetivo acelerar a degradação química e/ou gerar mudanças físicas em condições forçadas de armazenamento, dados que poderiam permitir estabelecer um prazo de validade dependendo da redução do teor da substância ativa (NETTO et al., 2006; SILVA et al., 2009).

Devido à grande variabilidade climática, o mundo foi subdividido em zonas com diferentes especificações de temperatura e umidade, para possibilitar a comercialização dos produtos em zonas climáticas distintas (BOTT; OLIVEIRA, 2007). O Brasil internalizou as condições estabelecidas para zona IV pela OMS, característica de região quente e úmida, com temperatura de $30\text{ }^\circ\text{C}$ ($\pm 2\text{ }^\circ\text{C}$) e 75% ($\pm 5\%$) de umidade relativa (BRASIL, 2005). A partir disso, foram estabelecidas as condições climáticas para realização dos estudos de estabilidade

acelerada ($40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $75\% \text{ UR} \pm 5\% \text{ UR}$) para insumos farmacêuticos ativos com condição de armazenamento de até $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ (BRASIL, 2012).

A umidade imposta neste experimento demonstrou influenciar nas características físicas das duas amostras, pois ambas perderam o aspecto de pó já no primeiro mês do experimento. Adicionalmente, também foi verificado que no primeiro mês de experimento com o EB, ocorreu desaparecimento do composto B e do flavonoide *O*-glicosídeo isoquercitrina, demonstrando a sensibilidade destes compostos frente às condições forçadas de armazenamento. Ao final dos seis meses de experimento, os três metabólitos selecionados (ácido clorogênico, isoorientina e isovitexina) apresentaram degradação.

Especificamente para a isovitexina foi verificado um aumento relevante de teor em parte dos experimentos realizados (Tabela 19) especialmente para o extrato bruto, amostra na qual o composto B é o constituinte majoritário.

Tabela 19: Experimentos nos quais foi detectado aumento no teor de isovitexina.

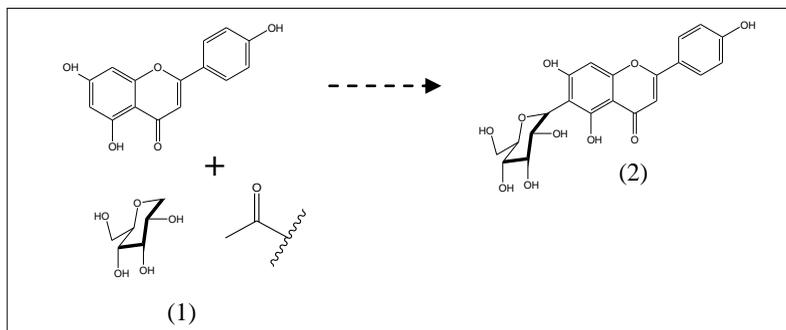
Experimento	Amostra e período da análise	Teor^a
Temperatura $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ - Solução	EB – 0 a 12 horas	1,68%
Temperatura $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ - Pó	EB – 7 a 60 dias	7,70%
Hidrólise ácida (Refluxo)	EB – 1 a 8 horas	65,59%
Hidrólise alcalina (Refluxo)	EB – t_0 a 1 hora	21,43%
Hidrólise neutra	EB – t_0 a 8 horas	26,95%
Oxidação (H_2O_2 30%)	EB – t_0 a 24 horas	28,24%
Estabilidade acelerada	EB – t_0 a 1 mês	3,36%
Estabilidade acelerada	FrMeOH – 3 a 6 meses	13,67%

^aValores expressos em percentual de aumento correspondentes ao t_0 de EB/FrMeOH.

Com auxílio das técnicas disponíveis para identificação do composto B, e a partir das observações realizadas durante os experimentos, é possível sugerir que esse composto possui estrutura química semelhante ao flavonoide isovitexina, ou seja, o açúcar presente seria uma glicose alocada no C_6 do anel A do núcleo flavônico. A presença de uma acetila na estrutura é especulada com base no valor de massa total obtido por espectrometria de massas, sendo este grupamento possivelmente o responsável pela degradação do composto B e formação da isovitexina (Figura 41). Entretanto, são necessárias maiores

investigações para elucidar a estrutura do composto B e confirmar essa hipótese.

Figura 42: Hipótese de (1) estrutura para o composto e possível conversão em (2) isovitexina.



Entre os experimentos desenvolvidos com o extrato bruto, somente a condição de temperatura de refrigeração (4 °C) não promoveu alterações no perfil quali e quantitativo da amostra. Em relação às condições que promoveram alterações significativas, a temperatura de 80 °C e a exposição a luz UV (254 nm) foram avaliadas para as duas amostras teste e, de maneira geral, as soluções apresentaram-se mais instáveis quando comparadas ao pó. Nas análises qualitativas por CLAE durante os experimentos, foram observadas a formação de produtos de degradação (t_r 4,6 minutos; 9,5 minutos; 17,9 minutos) os quais apresentaram comprimento de onda inespecífico no espectro de UV/DAD.

Para a FrMeOH foram verificados comportamentos distintos em relação ao EB durante os experimentos realizados. No experimento de estabilidade acelerada, por exemplo, o ácido clorogênico apresentou uma degradação cerca de duas vezes menor em comparação ao EB, o que se repete nos demais experimentos, considerando também os outros dois metabólitos avaliados. Entre os experimentos de estresse realizados, o pó da FrMeOH apresentou alteração somente no teor de ácido clorogênico sob temperatura de 80 °C. Em temperatura de refrigeração (4 °C) não foram observadas alterações relevantes dos metabólitos avaliados.

Entre os objetivos envolvidos na realização de testes de estresse é priorizado o desenvolvimento e validação de metodologias indicativas

de estabilidade (SILVA et al., 2009; SEHRAWAT; MAITHANI; SINGH, 2010). Considerando os resultados obtidos nos experimentos de estresse foi possível estabelecer que o método utilizado pode ser classificado como indicativo de estabilidade, uma vez que foram observadas alterações no teor dos marcadores bem como a formação de produtos de degradação (Tabela 20).

Tabela 20: Estudos de estabilidade submetidos ao EB e FrMeOH e formação de produto de degradação.

Amostra	Experimento	Período da análise	Produto de degradação (t _r) ^a
EB	Temperatura 80 °C (solução)	12 horas	9,5
EB	Temperatura 80 °C (pó)	7 dias	4,6
EB	Hidrólise ácida (refluxo)	1 hora	17,9
EB	Hidrólise ácida (refluxo)	1 hora	9,5
EB	Hidrólise alcalina (refluxo)	1 hora	17,9
EB	Hidrólise neutra	1 hora	9,5
FrMeOH	Hidrólise ácida (refluxo)	1 hora	17,9
FrMeOH	Hidrólise alcalina (refluxo)	1 hora	17,9

^a: tempo de retenção expresso em minutos.

A possível formação das agliconas (apigenina e luteolina) dos flavonoides glicosilados durante a realização dos experimentos de estabilidade foi monitorada, no entanto, não foi verificada a formação destes compostos. Contudo, outra possibilidade poderiam ser os compostos originados por meio da abertura do anel C, os ácidos hidroxifenilpropionícos (ácido florético e ácido hidrocafeico) e floroglucinol (1,3,5-trihidroxibenzeno) que foram descritos como produtos do metabolismo *in vivo* de alguns flavonoides (RICE-EVANS, 2001; ZHANG et al., 2007). O desenvolvimento de um método analítico para verificar a possível formação destes compostos pode ser considerado uma perspectiva para a continuidade deste trabalho.

A padronização química completa da matriz vegetal é complexa, laboriosa e por vezes de custo elevado (EMEA, 2009;

SAHOO; MANCHIKANTI; DEY, 2010). Estudos relatam que na ausência de uma substância específica identificada, é possível executar a quantificação de vários marcadores e estabelecer uma relação fixa entre eles que caracterize o extrato e o produto final. Como exemplo de componentes inespecíficos, os flavonoides do *Ginkgo biloba* L. são padronizados pela relação fixa entre quercetina, canferol e isoramnetina, além de lactonas terpênicas (bilobalídeo, gincolídeo A, B, C e E) sendo que todos estes componentes devem ser quantificados (NETTO et al., 2006). Nos experimentos realizados, de maneira geral, foi verificada variações nos teores dos compostos escolhidos para monitorar o perfil quantitativo das amostras (EB e FrMeOH).

Os estudos desenvolvidos com o extrato aquoso e com uma fração enriquecida em flavonoides de *C. glaziovii* demonstram que a investigação da estabilidade destes compostos é importante, visto que o perfil quantitativo não se manteve o mesmo em diversas situações, sendo verificada aumento/diminuição dos marcadores analisados assim como a formação de produtos de degradação. Considerando os aspectos anteriores, a possibilidade do estabelecimento de um teor de flavonoides totais por CLAE para estas amostras, paralela a estudos bioquímicos, pode tornar-se não só uma alternativa, mas também uma ferramenta na busca de uma metodologia mais eficaz para analisar a matriz estudada no presente trabalho.

7 CONCLUSÕES

- Foram isolados dois compostos ainda não descritos para a espécie *C. glaziovii* que apresentam características de flavonoides pertencentes à classe das flavonas e com núcleo tipo apigenina.

Em relação aos experimentos de estabilidade desenvolvidos é possível concluir que:

- O método utilizado para análise das amostras por CLAE pode ser classificado como indicativo de estabilidade, uma vez que foram observadas alterações no teor dos marcadores bem como a formação de produtos de degradação durante os experimentos de estabilidade realizados.

- Os experimentos de estabilidade realizados no EB e FrMeOH demonstraram que o flavonoide *O*-glicosídeo (isoquercitrina), e o ácido fenólico (ácido clorogênico) apresentaram maior sensibilidade às condições de estresse e de estabilidade acelerada empregadas em relação aos flavonoides *C*-glicosídeos (isoorientina, isovitexina).

- As soluções do EB e FrMeOH mostraram-se de modo geral mais instáveis quando comparadas ao pó, considerando que para as amostras em solução foram observadas alterações nos teores dos marcadores selecionados (ácido clorogênico, isoorientina, isovitexina) superiores às alterações observadas para o pó.

- A técnica de hidrólise por micro-ondas, realizada na ordem de minutos, demonstrou-se efetiva como a metodologia tradicional de refluxo, realizada na ordem de horas.

- Em condições de refrigeração (4 °C), foi verificada a manutenção do perfil quali e quantitativo do EB e FrMeOH, visto que não foram observadas alterações relevantes nos marcadores investigados durante os trinta dias de experimento.

8 PERSPECTIVAS

- Isolar maiores quantidades dos compostos A e B para viabilizar a elucidação completa das estruturas por espectroscopia de ressonância magnética nuclear.

- Avaliar a influência das amostras submetidas aos experimentos de estabilidade na citotoxicidade e na atividade anti-herpética (HSV-1) detectada previamente para o EB e FrMeOH (SILVA et al., 2010).

- Desenvolver novos estudos acelerados para o EB e FrMeOH utilizando as condições previstas para produtos com armazenamento de 2 a 8 °C ($25\text{ °C} \pm 2\text{ °C}/60\% \pm 5\%$ de umidade relativa).

- Desenvolver e validar metodologia analítica para quantificação de fenólicos totais e flavonoides totais por CLAE/DAD.

- Desenvolver método para verificar durante os experimentos de estabilidade a possível formação dos compostos ácido florético, ácido hidrocafeico e floroglucinol por CLAE/DAD.

REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, H.; KAUL, N.; PARADKAR, A.R.; MAHADIK, K.R. HPTLC method for guggulsterone: II. Stress degradation studies on guggulsterone. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 36, n. 1, p. 23-31, 2004.
- ANDERSEN, O. M.; MARKHAM, K. M. **Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications**. Boca Raton: CRC Press, 2006.
- ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN-JR, L. V. Farmacotécnica: formas farmacêuticas & sistemas de liberação de fármacos. 8. ed. Porto Alegre: Artmed; 2007.
- AQUILA, S.; GINER, R. M.; RECIO, M. C.; SPEGAZZINI, E. D.; RÍOS, J. L. Anti-inflammatory activity of flavonoids from *Cayaponia tayuya* roots. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 121, n. 2, p. 333-337, 2009.
- BAKSHI, M.; SINGH, S. Development of validated stability-indicating assay methods - Critical review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 28, n. 6, p. 1011-1040, 2002.
- BERG, C.C.; ROSSELLI, P.F. **Cecropia**. New York: Flora Neotropica / The New York Botanical Garden, 2005.
- BILIA, A. R.; BERGONZI, M. C.; MORGENNI, F.; 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, n. 1-2, p. 199-208, 2001.
- BOTT, R. F.; OLIVEIRA, W. P. Storage conditions for stability testing of pharmaceuticals in hot and humid regions. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 33, n. 4, p. 393-401, 2007.
- BRASIL, **Resolução nº 01, de 29 de julho de 2005**. Guia para a realização de estudos de estabilidade. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Poder Executivo, Brasília, DF, Diário Oficial da União, 2005. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/>>

BRASIL, **Resolução da Diretoria Colegiada – RDC N° 45, de 9 de agosto de 2012.** Dispõe sobre a realização de estudos de estabilidade de insumos farmacêuticos ativos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Poder Executivo, Brasília, DF, Diário Oficial da União, 2012. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/>

BRAGA, F. C.; SERRA, C. P.; VIANA JÚNIOR, N. S.; OLIVEIRA, A. B.; CÔRTEZ, S. F.; LOMBARDI, J. A. Angiotensin-converting enzyme inhibition by Brazilian plants. **Fitoterapia**, v. 78, n. 5, p. 353-358, 2007.

CARSTENSEN J.T.; RHODES C.T. **Drug Stability: Principles and Practices.** 3 ed. Marcel Dekker, Inc., New York, 2000.

CAZAROLLI, L. H.; FOLADOR, P.; MORESCO, H. H.; BRIGHENTE, I. M. C.; PIZZOLATTI, M. G.; SILVA, F. R. M. B. Stimulatory effect of apigenin-6-C- β -l-fucopyranoside on insulin secretion and glycogen synthesis. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 11, p. 4668-4673, 2009.

CHANDRASEKARAN, S.; RAMANATHAN, S.; BASAK, T. Microwave material processing-a review. **AIChE Journal**, v. 58, n. 2, p. 330-363, 2012.

CHOPIN, J.; BOUILLANT, M. L. **C-glycosylflavonoids.** In HARBORNE, J. B.; MABRY, T. J.; MABRY, H. The Flavonoids. 1 ed. Londres: Chapman and Hall Ltd, 1975.

CHOPIN, J.; BOUILLANT, M. L.; BESSON, E. **C-glycosylflavonoids.** In HARBORNE, J. B.; MABRY, T. J. The flavonoids: Advances in Research. 1 ed. Londres: Chapman and Hall Ltd, 1982.

COSTA, G. M.; ORTMANN, C. F.; SCHENKEL, E. P.; REGINATTO, F. H. An HPLC-DAD method to quantification of main phenolic compounds from leaves of *Cecropia* species. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 6, p. 1096-1102, 2011.

CYSNEIROS, R. M. **Mecanismo da ação hipotensora do extrato aquoso e frações purificadas de *Cecropia glazoui* Sneth.** São Paulo: Programa de Pós-graduação em Farmacologia da Universidade Federal de São Paulo, 1996, 72p. (Tese de Doutorado).

DAVIDSON, D. W. **Cecropia and its biotic defenses**. In BERG, C. C.; ROSSELLI, P. F. *Cecropia*. New York: Flora Neotropica / The New York Botanical Garden, 2005.

DE OLIVEIRA ARAGÃO, D. M.; DE ASSIS LIMA, I. V.; DA SILVA, J. M.; BELLOZI, P. M. Q.; DE CARVALHO DA COSTA, J.; CARDOSO, G. M. M.; DE SOUZA-FAGUNDES, E. M.; SCIO, E. Anti-Inflammatory, Antinociceptive and Cytotoxic Effects of the Methanol Extract of *Cecropia Pachystachya* Trécul. **Phytotherapy Research**, 2012.

DELARCINA, S.; LIMA-LANDMAN, M. T. R.; SOUCCAR, C.; CYSNEIROS, R. M.; TANAE, M. M.; LAPA, A. J. Inhibition of histamine-induced bronchospasm in guinea pigs treated with *Cecropia glaziovii* Sneth and correlation with the in vitro activity in tracheal muscles. **Phytomedicine**, v. 14, n. 5, p. 328-332, 2007.

EMEA. Committee on herbal medicinal products (HMPC). **Reflection paper on stability testing of herbal medicinal products and traditional herbal medicinal products**, p. 2. 2009.

FOLADOR, P.; CAZAROLLI, L. H.; GAZOLA, A. C.; REGINATTO, F. H.; SCHENKEL, E. P.; SILVA, F. R. M. B. Potential insulin secretagogue effects of isovitexin and swertisin isolated from *Wilbrandia ebracteata* roots in non-diabetic rats. **Fitoterapia**, v. 81, n. 8, p. 1180-1187, 2010.

GALATI, G.; O'BRIEN, P. J. Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: Significance for their chemopreventive and anticancer properties. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 37, n. 3, p. 287-303, 2004.

GERENUTTI, M.; ROLLO OLIVEIRA PRESTES, A. F.; GLAUZER SILVA, M.; DE SA DEL FIOL, F.; OSHIMA FRANCO, Y.; VENANCIO, P. C.; GROppo, F. C. The effect of *Cecropia glaziovii* Snethlage on the physical and neurobehavioral development of rats. **Pharmazie**, v. 63, n. 5, p. 398-404, 2008.

GROTEWOLD, E. (ed.) **The science of flavonoids**. Nova York: Springer, 2006

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

HARBORNE, J. B.; MABRY, T. J. **The flavonoids: Advances in Research**. 1 ed. Londres: Chapman and Hall Ltd, 1982.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 96, n. 2-3, p. 67-202, 2002.

HAYES, B. L. **Microwave Synthesis, Chemistry at the Speed of Light**. CEM Publishing, 2002.

ICH – Stability Testing: Photostability Testing of New Drug Substances and Products Q1B, **International Conference on Harmonization Of Technical Requirements For Registration of Pharmaceuticals for Human Use**, 1996.

ICH - Stability Testing Of New Drug Substances and Products Q1A(R2), **International Conference on Harmonization Of Technical Requirements For Registration of Pharmaceuticals for Human Use**, 2003.

KAPPE, C. O.; PIEBER, B.; DALLINGER, D. Microwave effects in organic synthesis: Myth or reality? **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 52, n. 4, p. 1088-1094, 2013.

KOPLEMAN, S. H.; NGUYENPHO, A.; ZITO, W. S.; MULLER, F. X.; AUGSBURGER, L. L. et al. Selected physical and chemical properties of commercial *Hypericum perforatum* extracts relevant for formulated product quality and performance. **AAPS PharmSci**, v. 3, n. 4, 2001.

KIM, H. P.; SON, K. H.; CHANG, H. W.; KANG, S. S. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 96, n. 3, p. 229-245, 2004.

LACAILLE-DUBOIS, M. A.; FRANCK, U.; WAGNER, H. Search for potential angiotensin converting enzyme (ACE)-inhibitors from plants. **Phytomedicine**, v.8, p. 47-52, 2001.

LIMA-LANDMAN, M. T. R.; BORGES, A. C. R.; CYSNEIROS, R.M.; DE LIMA, T. C. M.; SOUCCAR, C.; LAPA, A. J. Antihypertensive effect of a standardized aqueous extract of *Cecropia glaziovii* Sneth in rats: an in vivo approach to the hypotensive mechanism. **Phytomedicine**, v.14, p.314-320, 2007.

LIN, Y. L.; KUO, Y. H.; SHIAO, M. S.; CHEN, C. C.; OU, J. C. **Flavonoid glycosides from terminalia catappa L.** Journal of the Chinese Chemical Society, v. 47, n. 1, p. 253-256, 2000 **apud** ANDERSEN, O. M.; MARKHAM, K. M. Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications. Boca Raton: CRC Press, 2006.

LIU, R. H. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: Mechanism of action. **Journal of Nutrition**, v. 134, n. 12 SUPPL., p. 3479S-3485S, 2004.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas.** Nova Odessa: Instituto Plantarium de Estudos da Flora Ltda, p.520-521, 2008.

LUENGAS-CAICEDO, P. E.; BRAGA, F. C.; BRANDÃO, G. C.; OLIVEIRA, A. B. Seasonal and intraspecific variation of flavonoids and proanthocyanidins in *Cecropia glaziovi* Sneth. leaves from native and cultivated specimens. **Zeitschrift für Naturforschung**, v.62, p.701-709, 2007.

MAITI, B.; NAGORI, B.P.; SINGH, R.; KUMAR, P.; UPADHYAY N. Recent trends in herbal drugs: a review. **International Journal of Drug Research and Technology**, v. 1, n. 1, p. 17-25, 2011.

MARKHAM, K. R. **Techniques of Flavonoids Identification.** Londres: Academic Press, 1982.

MICHAEL, H. N.; GUERGUES, S. N.; SANDAK, R. N. Some Polyphenolic Constituents of *Triticum aestivum* (Wheat bran, Sakha 69) and Their Antibacterial Effect. **Asian Journal of Chemistry**, v. 10, n. 2, p. 256-263, 1998.

MONTANHA, J. A.; SCHENKEL, E. P.; CARDOSO-TAKETA, A. T.; DRESCH, A. P.; LANGELOH, A.; DALLEGRAVE, E. Chemical and anti-ulcer evaluation of *Jodina rhombifolia* (Hook. & Arn.) Reissek extracts. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 1 A, p. 29-32, 2009.

MORS, W. B.; RIZZINI, C. T.; PEREIRA, N. A. **Medicinal Plants of Brazil**. Algonac: Reference Publications, p. 247, 2000.

MORIWAKI, C.; BRESCANSIN E. G.; HIOKA, N.; MAIONCHI, F.; MATIOLI, G. Estudo da degradação do fármaco Nabumetona por fotólise direta. **Acta Scientiarum**, v. 23, n. 3, p. 651-654, 2001.

NINAHUAMAN, M. F. M. L.; SOUCCAR, C.; LAPA, A. J.; LIMA-LANDMAN, M. T. R. ACE activity during the hypotension produced by standardized aqueous extract of *Cecropia glaziovii* Sneth: a comparative study to captopril effects in rats. **Phytomedicine**, v.14, p.321-327, 2007.

NETTO, E. M.; SHUQAIR, N.S.M.S.A.Q., BALBINO, E. E.; CARVALHO, A. C. B. Comentários sobre o Registro de Fitoterápicos. **Revista Fitos**, v. 1, n. 3, p. 9-17, 2006.

NEWMAN, D. J. Natural products as leads to potential drugs: An old process or the new hope for drug discovery? **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, n. 9, p. 2589-2599, 2008.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 3, p. 461-477, 2007.

ORREGO, R.; LEIVA, E.; CHEEL, J. Inhibitory effect of three C-glycosylflavonoids from *Cymbopogon citratus* (lemongrass) on human low density lipoprotein oxidation. **Molecules**, v. 14, n. 10, p. 3906-3913, 2009.

PATIL, D.; GAUTAM, M.; JADHAV, U.; MISHRA, S.; KARUPOTHULA, S.; GAIROLA, S.; JADHAV, S.; PATWARDHAN, B. Physicochemical stability and biological activity of *Withania somnifera* Extract under Real-Time and Accelerated Storage Conditions. **Planta Médica**, v. 75, p. 1-8, 2009.

PETRONILHO, F.; DAL-PIZZOL, F.; COSTA, G. M.; KAPPEL, V. D.; DE OLIVEIRA, S. Q.; FORTUNATO, J.; CITTADINI-ZANETTE, V.; MOREIRA, J. C. F.; SIMÕES, C. M. O.; REGINATTO, F. H. Hepatoprotective effects and HSV-1 activity of the hydroethanolic extract of *Cecropia glaziovii* (embaúba-vermelha) against acyclovir-resistant strain. **Pharmaceutical Biology**, v. 50, n. 7, p. 911-918, 2012.

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

PIO-CORRÊA, M. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas**, Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, p. 200-212, 1978.

RICE-EVANS, C. Flavonoid antioxidants. **Current Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 7, p. 797-807, 2001.

ROCHA, F. F.; LAPA A. J.; De LIMA T. C. M. Evaluation of the anxiolytic-like effects of *Cecropia glazioui* Sneth in mice. **Pharmacology and Biochemical and Behavior**, v.71, p.183-190, 2002.

ROCHA, F. F.; LIMA-LANDMAN, M. T. R.; SOUCCAR, C.; TANAE, M. M.; DE LIMA, T. C. M.; LAPA, A. J. Antidepressant-like effect of *Cecropia glazioui* Sneth and its constituents-*In vivo* and *in vitro* characterization of the underlying mechanism. **Phytochemistry**, v.14, p.396-402, 2007.

RUDNICKI, M.; SILVEIRA, M. M.; PEREIRA, T. V.; OLIVEIRA, M. R.; REGINATTO, F. H.; DAL-PIZZOL, F.; MOREIRA, J. C. F. Protective effects of *Passiflora alata* extract pretreatment on carbon tetrachloride induced oxidative damage in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, n. 4, p. 656-661, 2007.

SAHOO, N.; MANCHIKANTI, P.; DEY, S. Herbal drugs: Standards and regulation. **Fitoterapia**, v. 81, n. 6, p. 462-471, 2010.

SANSEVERINO, A. M. Microondas em síntese orgânica. **Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 660-667, 2002.

SEHRAWAT, R.; MAITHANI, M.; SINGH, M. Regulatory Aspects in Development of Stability-Indicating Methods: A Review. **Chromatographia**, v. 72, p. 1-6, 2010.

SENA, L. M. et al. Neuropharmacological activity of the pericarp of *Passiflora edulis flavicarpa* Degener: Putative involvement of C-glycosylflavonoids. **Experimental Biology and Medicine**, v. 234, n. 8, p. 967-975, 2009.

SCHENKEL E.P.; GOSMANN G.; PETROVICK, P. R. **Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamento**. In SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL; E. P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6 ed. Florianópolis: Editora da UFSC, 2011.

SONAWANE, S.; GIDE, P. Optimization of forced degradation using Experimental design and development of a stability-indicating liquid chromatographic assay method for rebamipide in bulk and tablet dosage form. **Scientia Pharmaceutica**, v. 79, n. 1, p. 85-96, 2011.

SOUCCAR, C.; CYSNEIROS, R. M.; TANAE, M. M.; TORRES, L. M. B.; LIMA-LANDMAN, M. T. R.; LAPA, A. J. Inhibition of gastric acid secretion by a standardized aqueous extract of *Cecropia glaziovii* Sneth and underlying mechanism. **Phytomedicine**, v. 15, n. 6-7, p. 462-469, 2008.

SINGH, S.; BAKSHI, M. Guidance on Conduct of Stress Tests to Determine Inherent Stability of Drugs. **Pharmaceutical Technology On-Line**, p. 1-14, 2000.

SINGH, S.; KUMAR, V. Recent Developments on Long-Term Stability Test Conditions. **The pharma review**, p. 61-68, 2006.

SILVA, K. E. R.; ALVES, L. D. S.; SOARES, M. F. R.; PASSOS, R. C. S.; FARIA, A. R.; ROLIM NETO, P. J. Modelos de Avaliação da Estabilidade de Fármacos e Medicamentos para a Indústria Farmacêutica. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, p. 1-8, 2009.

SILVA, I. T.; COSTA, G. M.; STOCO, P. H.; SCHENKEL, E. P.; REGINATTO, F. H.; SIMÕES, C. M. O. In vitro antiherpes effects of a C-glycosylflavonoid-enriched fraction of *Cecropia glaziovii* Sneth. **Letters in Applied Microbiology**, v. 51, p. 143-148, 2010.

TALHI, O.; SILVA, A. M. S. Advances in C-glycosylflavonoid research. **Current Organic Chemistry**, v. 16, n. 7, p. 859-896, 2012.

TANAE, M. M; LIMA-LANDMAN, M. T. R; De LIMA, T. C. M; SOUCCAR, C.; LAPA, A. J. Chemical standardization of the aqueous extract of *Cecropia glaziovii* Sneth endowed with antihypertensive, bronchodilator, antiacid secretion and antidepressant-like activities. **Phytomedicine**, v. 14, p.309-313, 2007.

THAKUR, L.; GHODASRA, U.; PATEL, N.; DABHI, M. Novel approaches for stability improvement in natural medicines. **Pharmacognosy Review**, v. 5, p. 48-54, 2011.

VRINDA, B.; UMA DEVI, P. Radiation protection of human lymphocyte chromosomes in vitro by orientin and vicenin. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 498, n. 1-2, p. 39-46, 2001.

WANG, J.; YUE, Y.; TANG, F.; SUN, J. TLC Screening for Antioxidant Activity of Extracts from Fifteen Bamboo Species and Identification of Antioxidant Flavone Glycosides from Leaves of *Bambusa. textilis* McClure. **Molecules**, v. 17, n. 10, p. 12297-12311, 2012.

WEST, M. E.; MAUER, L. J. Development of an integrated approach for the stability testing of flavonoids and ascorbic acid in powders. **Food Chemistry**, v. 129, n. 1, p. 51-58, 2011.

YATSU, F. K. J.; BORGHETTI, G. S.; BASSANI, V. L. Technological characterization and stability of *Ilex paraguariensis* St. Hil. Aquifoliaceae (maté) spray-dried powder. **Journal of Medicinal Food**, v. 14, n. 4, p. 413-419, 2011.

ZHANG, Y.; TIE, W.; BAO, B.; WU, X.; ZHANG, Y. Metabolism of flavone C-glucosides and p-coumaric acid from antioxidant of bamboo

leaves (AOB) in rats. **British Journal of Nutrition**, v. 97, n. 3, p. 484-494, 2007.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. **Flavonoides**. In SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6 ed. Florianópolis: Editora da UFSC, 2011.

ZUCOLOTTO, S. M.; GOULART, S.; MONTANHER, A. B.; REGINATTO, F. H.; SCHENKEL, E. P.; FRÖDE, T. S. Bioassay-guided isolation of anti-inflammatory C-glucosylflavones from *Passiflora edulis*. **Planta Medica**, v. 75, n. 11, p. 1221-1226, 2009.