

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE FARMÁCIA**

FABIANA FERNANDES DE SANTANA E SILVA CARDOSO

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

Goiânia

2008

FABIANA FERNANDES DE SANTANA E SILVA CARDOSO

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

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

Área de concentração: Fármacos e Medicamentos

Orientadora: Profa. Dra. Kênnia Rocha Rezende.

Goiânia

2008

FABIANA FERNANDES DE SANTANA E SILVA CARDOSO

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

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

Profa. Dra. Kênnia Rocha Rezende – UFG
Presidente da Banca Examinadora

Prof. Dr. Eric de S. Gil – UFG

Profa Dra. Dione Marçal Lima – UFG

A Deus pela presença constate em minha vida,

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Muito Obrigada!

RESUMO

O 4-nerolidilcatecol (4-NRC) é o principal metabólito secundário da espécie *Pothomorphe umbellata* L. Miq. com comprovadas ações antioxidante, antiinflamatória e fotoprotetora. No entanto, após isolamento e armazenamento deste observam-se evidências de fotoinstabilidade de modo que, a caracterização dos fatores que influenciam tal instabilidade torna-se imperativa mediante a perspectiva do desenvolvimento de um novo fármaco. Assim, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar um método cromatográfico capaz de analisar a cinética de degradação do 4-NRC, na presença dos produtos gerados, empregando-se a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector com arranjos de fotodiodos (CLAE-PDA). Os resultados obtidos demonstraram que as condições cromatográficas desenvolvidas utilizando gradiente de eluição contendo MeOH:ACN:H₂O como fase móvel possibilitou adequada sensibilidade (5 µg/mL), linearidade (5-500 µg/mL), precisão intra (0,02 – 2,83%) e inter-dias (0,59 – 4,89%), além de exatidão (98,46 - 104,88%) e robustez. O estudo fotolítico demonstrou rápida degradação do 4-NRC (t_R = 26 min), com formação de um produto majoritário (t_R = 8 min). Dados do estudo hidrolítico evidenciaram elevada instabilidade do 4-NRC em meio alcalino (pH 13,00), observando-se um produto majoritário com t_R próximo a 26 min. Na condição ácida (pH 1,00), a degradação do 4-NRC foi lenta e parcial, mesmo após 72 horas de exposição, sob aquecimento. O principal produto de degradação ácida apresentou t_R próximo a 12 min. A cinética de degradação do 4-NRC, em meio ácido e sob condição fotolítica, analisada segundo o método gráfico do decaimento da concentração do 4-NRC, aponta que ambas reações apresentam perfil sugestivo de 2ª ordem. Neste contexto, sugere-se o armazenamento da substância em pH neutro, sob condições refrigeradas e protegidas da incidência da luz de modo a prevenir a degradação. Deve-se evitar ainda, o armazenamento em soluções, principalmente alcalinas, pois a velocidade de degradação torna-se acelerada.

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

ABSTRACT

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

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

LISTA DE FIGURAS

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

	ACN: TFA 0,1%, coluna C18 (250 mm x 4,6 mm) e fluxo de 1,0 mL/min. C: Espectro de varredura UV do pico do 4-NRC em t_R 25,45 min.....	60
Figura 14	Cromatogramas da fase móvel com sistema gradiente 4 (MeOH: ACN: TFA 0,1%), com fluxo 1 mL/min, obtido em CLAE-PDA (A: 282 nm; B: 254 nm) e coluna C18 (250 mm x 4,6 mm).....	62
Figura 15	Cromatogramas do solvente (EtOH) com sistema gradiente 4 (MeOH: ACN: TFA 0,1%), com fluxo 1 mL/min, obtido em CLAE-PDA (A: 282 nm; B: 254 nm) e coluna C18 (250 mm x 4,6 mm).....	63
Figura 16	Cromatogramas da solução etanólica do 4-NRC (50 µg/mL) com sistema gradiente 4 (MeOH: ACN: TFA 0,1%), com fluxo 1 mL/min, obtido em CLAE-PDA (A: 282 nm; B: 254 nm) e coluna C18 (250 mm x 4,6 mm).....	64
Figura 17	Curva de calibração da análise do 4-NRC, no intervalo de concentração nominal 5,0 a 500,0 µg/mL, referente à faixa linear do método.....	65
Figura 18	Cromatogramas da amostra intacta do 4-NRC/EtOH (500 µg/mL), com sistema gradiente 4 (MeOH: ACN: TFA 0,1%), com fluxo 1 mL/min, obtido em CLAE-PDA (A: 282 nm; B: 254 nm) e coluna C18 (250 mm x 4,6 mm). C: Avaliação da pureza do pico pela varredura espectral (UV) no início, meio e fim do pico.	69
Figura 19	Cromatogramas das amostras do 4-NRC após 6, 24, 72 e 144 horas de exposição fotolítica do 4-NRC, com sistema gradiente 4 (MeOH: ACN: TFA 0,1%), fluxo 1 mL/min, em CLAE-PDA, coluna C18 (250 mm x 4,6 mm), 282 nm.....	70
Figura 20	A: Espectro de ultravioleta do pico (1), com t_R 3,92 min, após 24 horas de exposição fotolítica. B: Avaliação da pureza do pico (t_R 3,92 min).....	71

Figura 21	A: Espectro de ultravioleta do produto de degradação fotolítica (5), com $t_R = 8,26$ min, após 144 horas de exposição. B: Avaliação da pureza do pico ($t_R = 8,26$ min).....	73
Figura 22	Cromatogramas da amostra controle do 4-NRC, após 144 h de exposição, protegido com papel alumínio, com sistema gradiente 4 (MeOH: ACN: TFA 0,1%), com fluxo 1 mL/min, obtido em CLAE-PDA (A: 282 nm; B: 254 nm) e coluna C18 (250 mm x 4,6 mm).....	74
Figura 23	Cromatogramas das amostras do 4-NRC após 1, 6, 12 e 24 horas de exposição alcalina, com sistema gradiente 4 (MeOH: ACN: TFA 0,1%), com fluxo 1 mL/min, obtido em CLAE-PDA, coluna C18 (250 mm x 4,6 mm) e monitorado em 282 nm.....	75
Figura 24	A: Espectro de ultravioleta do produto de degradação majoritário (1), com $t_R = 25,6$ min, após 1 hora de exposição alcalina. B: Avaliação da pureza do pico ($t_R = 25,6$ min).....	76
Figura 25	A: Espectro de ultravioleta do 4-NRC, com $t_R = 25,08$ min, após 1 h de exposição em meio alcalino. B: Avaliação da pureza do pico ($t_R = 25,08$ min).....	77
Figura 26	A: Espectro de ultravioleta do produto majoritário (1), $t_R = 25,8$ min, após 24 horas em meio alcalino. B: Avaliação da pureza do pico ($t_R = 25,8$ min).....	78
Figura 27	Cromatogramas das amostras do 4-NRC após 1, 6, 12, 24, 40 e 48 horas de exposição ácida, a 60° C, com sistema gradiente 4 (MeOH: ACN: TFA 0,1%), com fluxo 1 mL/min, obtido em CLAE-PDA, coluna C18 (250 mm x 4,6 mm) e monitorado em 282 nm.....	79
Figura 28	A: Espectro de absorção UV do produto de degradação ácida (1) do 4-NRC, com $t_R = 11,84$ min, após 48 horas de exposição em meio ácido, a 60° C. B: Avaliação da pureza do pico com $t_R = 11,84$ min.....	81

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

LISTA DE QUADROS

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

LISTA DE TABELAS

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

LISTA DE ESQUEMAS

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

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

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

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

SUMÁRIO

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

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

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

Referências Bibliográficas

7. Referências bibliográficas

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

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

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

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

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

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

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

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

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

BARROS, S. M.; TEIXEIRA, D. S.; AZNAR, A. E.; MOREIRA JÚNIOR. J. A.; ISHII, I.; FREITAS, P. C. D. Antioxidant activity of ethanolic extracts of *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. (Pariparoba). *J. Assoc. Adv. Sci.*, v.48, p.114-116, 1997.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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