

Métodos analíticos para avaliação da estabilidade de rutina e análise da formação de seus produtos de degradação: uma revisão

Analytical methods for evaluating the stability of rutin and analyzing the formation of its degradation products: a review

Métodos analíticos para evaluar la estabilidad de la rutina y analizar la formación de sus productos de degradación: una revisión

Recebido: 28/08/2022 | Revisado: 06/08/2022 | Aceito: 10/09/2022 | Publicado: 18/09/2022

José Izak Ribeiro de Araújo

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0675-5485>
Universidade Federal de Pernambuco, Brasil
E-mail: joseizakra@hotmail.com

Jabson Herber Profiro de Oliveira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0356-8083>
Universidade Federal de Pernambuco, Brasil
E-mail: jabson_f16@yahoo.com.br

José Wellithom Viturino da Silva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0604-1025>
Universidade Federal de Pernambuco, Brasil
E-mail: w.viturino@hotmail.com

Dayanne Tomaz Casimiro da Silva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3872-3813>
Universidade Estadual da Paraíba, Brasil
E-mail: dayannecasimiro@hotmail.com

Mônica Felts de La Roca Soares

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4873-915X>
Universidade Federal de Pernambuco, Brasil
E-mail: mfs.ufpe@gmail.com

José Lamartine Soares-Sobrinho

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3280-0294>
Universidade Federal de Pernambuco, Brasil
E-mail: joselamartine@hotmail.com

Resumo

A rutina (RUT) é um flavonóide encontrado em uma ampla variedade de vegetais. Possui múltiplas propriedades terapêuticas, sendo especialmente indicada como venotônico para o tratamento da insuficiência venosa crônica (IVC). Para obtenção de medicamentos compostos pela RUT ou associados com outros fármacos é necessário avaliar inicialmente a estabilidade do insumo farmacêutico ativo (IFA), a fim de garantir a eficácia e qualidade dos produtos, bem como a segurança dos consumidores. Apesar de ser um pressuposto para o registro de medicamentos, há na literatura escassez de dados referentes a estabilidade do IFA de RUT e seus produtos derivados, portanto este trabalho teve como objetivo realizar uma análise crítica das publicações que abordam essa temática. Diante da prospecção foi possível dividir as informações em três grupos: avaliação da estabilidade decorrida do processo extrativo em derivados vegetais, de sistemas de liberação desenvolvidos com a finalidade de contornar limitações físico-químicas intrínsecas da molécula e em meios reativos e condições ambientais projetados para degradar a molécula. Os resultados demonstraram que os estudos de estabilidade são desafiadores do ponto de vista técnico e analítico, uma vez que para condução dos testes de degradação forçada e desenvolvimento de métodos indicativos de estabilidade (MIEs), apesar da existência de guias, resoluções e compêndios internacionais com as diretrizes para nortear os ensaios, cada molécula tem uma natureza química única. Portanto é fundamental a construção de um perfil de estabilidade, a fim de propor o controle dos processos e o desenvolvimento de formulações que contenham adjuvantes que permitam a formação de produtos mais estáveis.

Palavras-chave: Rutina; Estabilidade físico-química; Produtos de degradação; Método indicativo de estabilidade.

Abstract

Rutin (RUT) is a flavonoid found in a wide variety of vegetables. It has multiple therapeutic properties, being especially indicated as a venotonic for the treatment of chronic venous insufficiency (CVI). To obtain medicines composed by RUT or associated with other drugs, it is necessary to initially evaluate the stability of the active

pharmaceutical ingredient (API), with the objective guarantee the effectiveness and quality of the products, as well as the safety of consumers. Despite being a presupposition for drug registration, there is a scarcity of data in the literature regarding the stability of the API of RUT and its derived products, so this work aimed to perform a critical analysis of publications that address this issue. In view of the prospection, it was possible to divide the information into three groups: evaluation of the stability resulting from the extractive process in plant derivatives, of release systems developed with the purpose of circumventing intrinsic physicochemical limitations of the molecule and in reactive media and environmental conditions designed to degrade the molecule. The results showed that stability studies are challenging from a technical and analytical point of view, since for conducting forced degradation tests and developing stability indicative methods (SIMs), despite the existence of guides, resolutions, and international compendia with the guidelines for guiding the tests, each molecule has a unique chemical nature. Therefore, it is essential to build a stability profile, to propose the control of processes and the development of formulations that contain adjuvants that allow the formation of more stable products.

Keywords: Rutin; Physicochemical stability; Degradation products; Stability indicative method.

Resumen

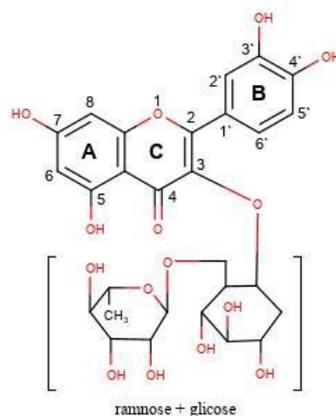
La rutina (RUT) es un flavonoide que se encuentra en una amplia variedad de vegetales. Tiene múltiples propiedades terapéuticas, estando especialmente indicado como venotónico para el tratamiento de la insuficiencia venosa crónica (IVC). Para la obtención de medicamentos compuestos por RUT o asociados a otros fármacos, es necesario evaluar inicialmente la estabilidad del principio activo farmacéutico (PAF), con el fin de garantizar la eficacia y calidad de los productos, así como la seguridad de los consumidores. A pesar de ser un presupuesto para el registro de medicamentos, existe escasez de datos en la literatura con respecto a la estabilidad de la PAF de RUT y sus productos derivados, por lo que este trabajo tuvo como objetivo realizar un análisis crítico de las publicaciones que abordan este tema. En vista de la prospección, fue posible dividir la información en tres grupos: evaluación de la estabilidad resultante del proceso extractivo en derivados vegetales, de sistemas de liberación desarrollados con el fin de sortear limitaciones fisicoquímicas intrínsecas de la molécula y en medios reactivos y condiciones ambientales diseñadas para degradar la molécula. Los resultados mostraron que los estudios de estabilidad son un reto desde el punto de vista técnico y analítico, ya que para la realización de pruebas de degradación forzada y el desarrollo de métodos indicativos de estabilidad (MIEs), a pesar de la existencia de guías, resoluciones y compendios internacionales con los lineamientos para orientar las pruebas, cada molécula tiene una naturaleza química única. Por lo tanto, es fundamental construir un perfil de estabilidad para proponer el control de procesos y el desarrollo de formulaciones que contengan adyuvantes que permitan la formación de productos más estables.

Palabras clave: Rutina; Estabilidad fisicoquímica; Productos de degradación; Método indicativo de estabilidad.

1. Introdução

A rutina (RUT) (quercetin-3-O-rutinoside) é um flavonóide, pertencente à subclasse dos flavonóis de nome originário da espécie *Ruta graveolens*, que contém em abundância esse composto em sua constituição, assim como outros vegetais utilizados na alimentação como o *Fagopyrum esculentum*, (trigo sarraceno), além de outras fontes que incluem os botões de flores da árvore da espécie *Styphnolobium japonicum* e das folhas de várias espécies de *Eucalyptus* (Lukšič et al., 2016). Os flavonóides são metabólitos secundários componentes de uma ampla variedade de vegetais, quimicamente são classificados como derivados benzo- γ -pirano, estruturalmente possuem em comum um núcleo fenilcromanoma (C6-C3-C6), com uma ou mais hidroxilas acrescidas ao núcleo. Na RUT, temos quatro grupos (-OH), compondo este anel e através de uma ligação glicosídica na posição 3 do anel C, está ligado um dissacarídeo composto por ramnose e glicose (Becho et al., 2009). Figura 1. Os principais grupos relacionados às suas funções são: o-dihidroxi no anel B (catecol), como potencial alvo para os radicais; a dupla ligação entre as posições 2 e 3 no anel C conjugado com o grupo ceto na posição 4, devido a sua capacidade de deslocalizar o elétron desacoplado do radical do flavonóide e os grupos (-OH) ligados a C5 e C7 como potenciais capturadores de radicais livres (Zvezdanović et al., 2012).

Figura 1. Estrutura química da molécula de rutina.



Fonte: Elaborado pelos autores, utilizando o software MarvinSketch® (2022).

A RUT é um ácido polibásico fraco. Sua primeira constante de dissociação (pK_{a1}) = 7,21; a partir deste dado pode-se concluir que esse composto existe na forma molecular em $pH < 5$ e como mistura de formas moleculares e desprotonadas em $pH > 5$. A RUT possui baixa biodisponibilidade, causada principalmente por sua baixa solubilidade aquosa e permeabilidade limitada à membrana. Estes fatores dificultam os efeitos biológicos *in vivo*. Além disso, a sua baixa lipossolubilidade limita seu emprego para aplicações tópicas (Gullón et al., 2017; Lipkovskaya et al., 2014).

RUT desempenha atividade terapêutica venotônica, anti-inflamatória e antiedematosa, sendo especialmente recomendada para o tratamento da insuficiência venosa crônica (IVC) e seus desdobramentos clínicos. As doses orais comuns variam de 500 mg e 2000 mg por dia e podem ser mantidas com segurança por longos períodos, até seis meses. Belcaro et al. (2008), após aplicação de um gel composto pelo ativo em pacientes com IVC severa, constataram uma melhora significativa na microcirculação, através do aumento da pressão de O_2 e redução da pressão de CO_2 local. Cesarone et al. (2005) observaram a redução do edema venoso, através da administração oral da RUT. Cosco et al. (2016) desenvolveram um sistema de liberação composto por microesferas de quitosana carregadas por RUT, onde foi observado a redução das interleucinas IL-1 β e IL-6, produzidas no processo inflamatório, nas patas de ratos *wistar*. Mascaraque et al. (2014) comprovaram em modelos experimentais para colite intestinal, a diminuição da secreção de citocinas pró-inflamatórias (IFN γ e TNF α) pelas células dos linfonodos mesentéricos observadas *ex vivo*; atividades reduzidas da mieloperoxidase colônica e fosfatase alcalina e redução da expressão de genes pró-inflamatórios (IFN γ , TNF α , CXCL1, S100A8 e IL-1 β).

Apesar de ser utilizada comercialmente em especial para o tratamento de distúrbios vasculares, outras propriedades terapêuticas foram comprovadas. Gęgotek et al. (2018) observaram as atividades antioxidante e citoprotetora, após análise do perfil proteômico de fibroblastos da pele humana irradiados com luz UV-A e UV-B para indução da expressão máxima de proteínas que desempenham papel antioxidante. A irradiação das células da pele por UV-B, promoveu a formação de um aduto de RUT, que leva a ativação de Nrf 2, fator responsável pela síntese de proteínas protetoras. Além disso, preveniu parcialmente a apoptose induzida por UV, restaurando os níveis fisiológicos da proteína p 53, citocromo c e a proteína 2 reguladora do ciclo celular. Bachelor & Yang (2019) demonstraram através de um biomaterial composto pelo carregamento do ativo em membrana de fibra de acetato de celulose/poli (óxido de etileno), a capacidade de eliminação de radicais livres e atividade antibacteriana contra *E. coli* e *S. aureus*, para um percentual de RUT equivalente a 2% do sistema total.

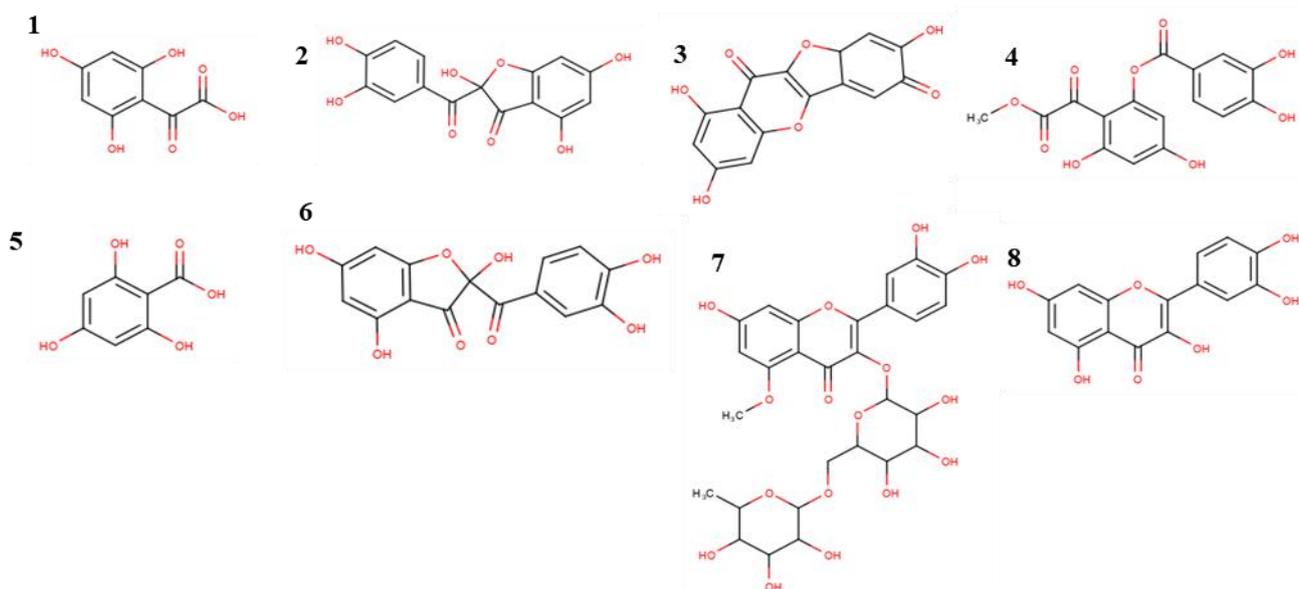
Chéron et al. (2015) em estudo de reposicionamento de fármacos com potencial de exercerem atividade antinoroviral realizaram testes antivirais com a RUT em modelos murinos e comprovaram o desempenho desta atividade. Ainda não se tem o mecanismo de ação totalmente elucidado, entretanto foi sugerido que o ativo pode agir ao nível da replicação ou

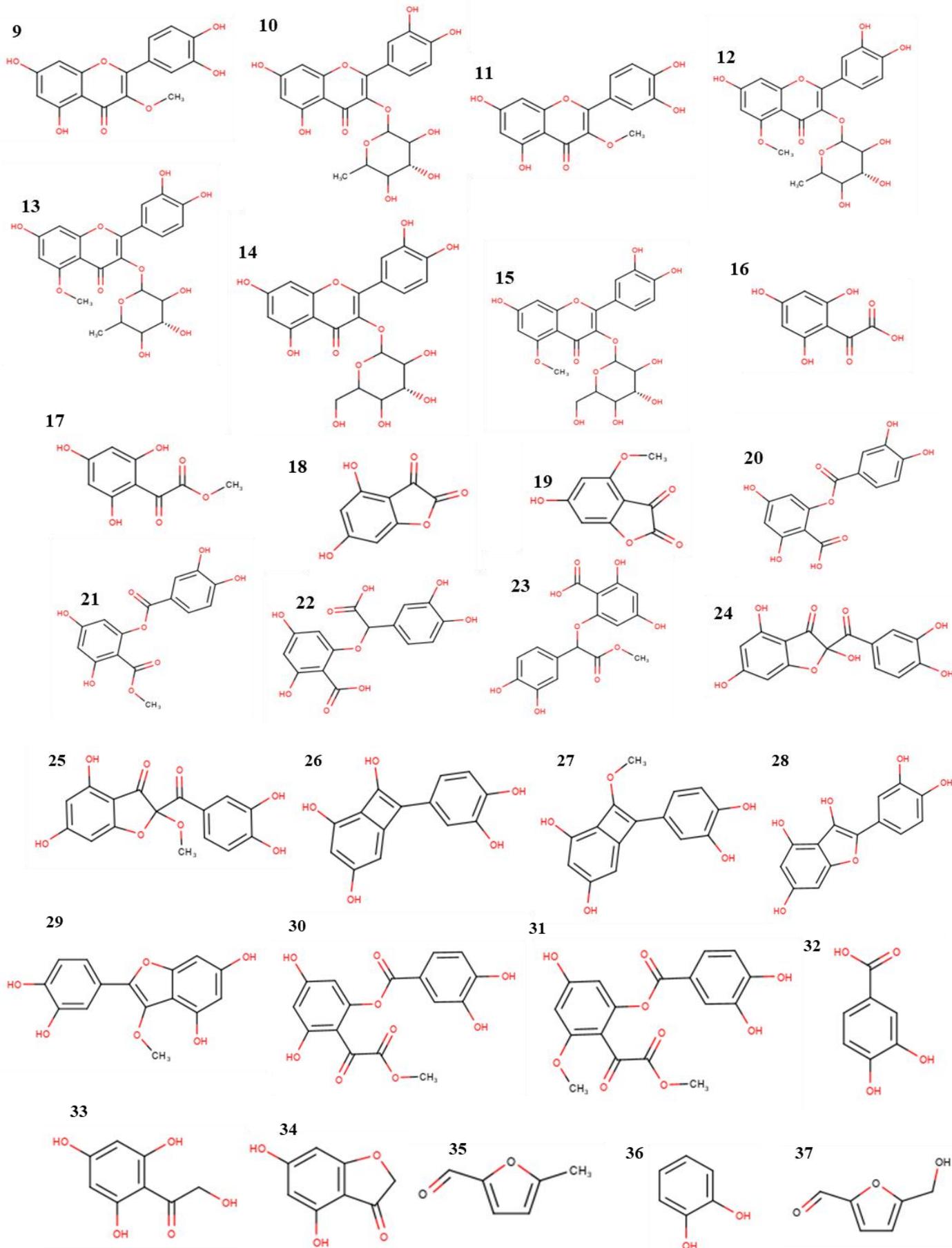
posteriormente no ciclo de vida viral. Nassiri-asl et al. (2013) avaliaram os efeitos de RUT, sobre o estresse oxidativo a partir de um possível mecanismo molecular de neurotoxicidade induzida por ácido cáfnico em camundongos. Este mecanismo está associado à morte celular do hipocampo. O pré-tratamento com RUT, reduziu significativamente os níveis de malondialdeído e tiol, que são indicadores de peroxidação lipídica e do estresse oxidativo, respectivamente, nas fases inicial e tardia, após crises induzidas pelo ácido cáfnico. Além disso, observou-se o exercício de atividade anticonvulsivante sugerida pela ativação do sistema gabaérgico, ao ativo ligar-se no receptor GABA_A, do sistema nervoso central.

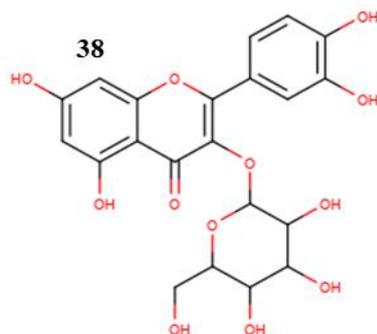
Peng et al. (2018) avaliaram a capacidade da RUT afetar o quórum sensing (QS) da *E.coli* patogênica aviária (APEC). O QS é caracterizado pela liberação de sinais químicos secretados pelas células, capazes de promover uma série de alterações, como a regulação de expressão de genes. RUT interferiu no QS, através da redução da secreção de auto-indutor 2 (AI-2), um composto sinalizador entre espécies, que regula uma série de comportamentos patológicos, inibição da formação de biofilme e redução da expressão de genes de virulência da APEC. Além disso, diminuiu acentuadamente a adesão e os danos da APEC em pneumócitos do tipo II em frangos, estes resultados sugeriram que RUT reduz o dano celular das pessoas infectadas com APEC. Atualmente existem centenas de formulações no mercado compostas por RUT em diferentes formas de dosagem, isoladamente ou em combinação com outros IFAs. O banco de dados norte-americano que contabiliza o registro dos suplementos dietéticos, abrange 1.465 produtos que incluem RUT, atualmente comercializados nos Estados Unidos (National Institute of Health [NIH], 2020).

Diante da extensão de suas propriedades terapêuticas, deve-se investigar: os métodos mais eficazes de isolamento, uma vez que o ativo pode ser encontrado em uma variedade de vegetais; sistemas de liberação que possam minimizar a limitação de suas propriedades biofarmacêuticas e análise dos meios reacionais e condições ambientais que podem alterar estruturalmente a RUT, portanto o objetivo deste artigo é proporcionar um panorama da estabilidade intrínseca da molécula de RUT que contemple esses parâmetros, através da descrição dos métodos analíticos indicativos de estabilidade, capazes de identificar, separar e quantificar a RUT e seus produtos de degradação (PDs), e a partir daí construir o espectro de abrangência desses PDs, bem como analisar de forma crítica as rotas de degradação e os mecanismos reacionais envolvidos em suas formações. A Figura 2, corresponde a estrutura molecular dos principais PDs de RUT e de sua forma agliconada, representada pela quercetina (QUERC).

Figura 2. Representação estrutural dos PDs originados da degradação de RUT e QUERC.







Fonte: Elaborado pelos autores, utilizando o software MarvinSketch®, (2022).

Diante da variedade de PDs derivados da molécula de RUT, observados na Figura 2, podemos caracterizar duas etapas principais que fundamentam os mecanismos de degradação: a primeira refere-se ao rompimento da ligação glicosídica que une o núcleo fenilcromanona (A-C-B) ao dissacarídeo formado por ramnose e glicose (Wang et al., 2011) e a segunda caracteriza-se pela alteração do núcleo fenilcromanoma que apresenta o anel B, como locus inicial de maior probabilidade para o ataque dos agentes degradantes promotores da hidrólise, por caracterizar-se como região de menor ressonância eletrônica comparada aos anéis A-C, que possuem alta ressonância eletrônica decorrente das duplas ligações presentes nos anéis, bem como dos grupos hidroxila e carbonila que contribuem para a deslocalização eletrônica e maior estabilidade dessa região da molécula (Islam, 2015). O Quadro 1 contém a sequência numérica dos PDs representados na Figura 2, com a respectiva nomenclatura química, seguida da razão massa/carga, conforme será apresentado no decorrer deste trabalho.

Quadro 1. Relação numérica dos PDs originados da degradação de RUT e QUERC, com as respectivas denominações químicas e valor de razão massa/carga.

Referências	Número do PD	Nomenclatura	Massa (m/z)
Zvezdanovic et al. (2012)	1	*Ácido di-hidroxi-fenil-glioxílico	199
Zvezdanovic et al. (2012)	2	*2-(3,4-dihidroxibenzoil) -2,4,6-trihidroxi-3(2H) - benzofuranona	303
Zvezdanovic et al. (2012)	3	*Ácido tri-hidroxi-fenil-glioxílico	306
Zvezdanovic et al. (2012)	4	*Metil 2- {2- [(3,4- dihidroxibenzoil) oxi] -4,6-dihidroxifenil } -2-oxoacetato	349
Qiao et al. (2014)	5	*Ácido 2-4-6-trihidroxibenzoico	169
Quiao et al. (2014)	6	*2-(3,4-dihidroxibenzoil) -2,4,6-trihidroxi-3- (2H) - benzofuranona	317
Quiao et al. (2014)	7	*Metil-3,4-dihidroxifenil-glioxilato	195
Quiao et al. (2014)	8	*Ácido 2- (3,4-dihidroxibenzoil) -4,6-dihidroxi-benzóico	305
Dawidowicz et al. (2016)	9	Metil-rutina	623
Zvezdanovic et al. (2012) Dawidowicz et al. (2016) Koyu & Haznedaroglu (2016) Ravber et al. (2016) Paczkowska et al. (2017)	10	Quercetina	301
Dawidowicz et al. (2016)	11	Metil-quercetina	315
Dawidowicz et al. (2016)	12	Quercitrina	447
Dawidowicz et al. (2016)	13	Metil-quercitrina	461
Wang et al. (2011) Dawidowicz et al. (2016)	14	Isoquercitrina	463
Dawidowicz et al. (2016)	15	Metil-isoquercitrina	477
Dawidowicz et al. (2016)	16	OTA	197
Dawidowicz et al. (2016)	17	Metil-OTA	211
Dawidowicz et al. (2016)	18	DBD	179
Dawidowicz et al. (2016)	19	Metil-DBD	193
Dawidowicz et al. (2016)	20	DDA	305
Dawidowicz et al. (2016)	21	Metil-DDA	319
Dawidowicz et al. (2016)	22	CDA	335
Dawidowicz et al. (2016)	23	Metil-CDA	349
Dawidowicz et al. (2016)	24	DTB	317
Dawidowicz et al. (2016)	25	Metil-DTB	331
Dawidowicz et al. (2016)	26	DBOT	257
Dawidowicz et al. (2016)	27	Metil-DBOT	271
Dawidowicz et al. (2016)	28	DBT	275
Dawidowicz et al. (2016)	29	Metil-DBT	287
Dawidowicz et al. (2016)	30	DPD	347
Dawidowicz et al. (2016)	31	Metil-DPD	361
Ravber et al. (2016)	32	Ácido 3,4-dihidroxibenzoico	153
Ravber et al. (2016)	33	2-hidroxi-1-(2,4,6-trihidroxifenil etanona)	183
Ravber et al. (2016)	34	4,6-di-hidroxi-3-benzofuranona	165
Ravber et al. (2016)	35	5-metilfurfural	109
Ravber et al. (2016)	36	Catecol	109
Ravber et al. (2016)	37	5-hidroximetilfurfural	125
Wang et al. (2011) Ravber et al. (2016) Paczkowska et al. (2017)	38	Isoquercetina	464

Legenda: *PDs originados diretamente da degradação de QUERC. Fonte: Autores (2022).

De acordo com o Quadro 1, o produto de degradação derivado de RUT, referenciado com maior frequência foi a QUERC, sendo mencionada em cinco publicações analisadas e o estudo desenvolvido por Dawidowicz et al. (2016) foi o que apresentou a maior extensão de PDs formados, contabilizando 23 estruturas químicas de um total de 38 compostos apresentados.

2. Metodologia para Construção do Estado da Arte dos Estudos de Estabilidade da RUT

O presente estudo consiste em uma revisão integrativa (Souza et al., 2010) subsidiado pela abordagem qualitativa, com objetivos exploratórios e descritivos (Silveira & Córdova, 2009) que abrange os diferentes métodos analíticos para avaliação da estabilidade da RUT. Nesse contexto, para contemplar o estado da arte, foi realizado um levantamento bibliográfico, a fim de selecionar os estudos de estabilidade desenvolvidos com a RUT e seus possíveis PDs. De acordo com Cronin e George (2020), uma revisão integrativa pode fornecer informações importantes sobre o estado atual da pesquisa de um determinado tema, conecta diferentes comunidades científicas que compartilham o mesmo objeto de estudo e trabalham de modo paralelo. Através da representação equilibrada do conhecimento construído por cada grupo de pesquisa é possível recomendar direcionamentos futuros sobre como as pesquisas podem ser aprimoradas.

Inicialmente foram definidos os termos-chave, com base na temática do estudo e na leitura prévia de alguns trabalhos sobre o assunto. A busca dos arquivos foi realizada com base nas produções científicas indexadas na coleção principal do Web of Science Clarivate Analytics[®]. Os termos-chave e a estratégia de busca utilizada, combinados com os conectores booleanos “OR” e “AND”, são apresentados no Quadro 2.

Quadro 2. Termos utilizados nas etapas de busca.

Busca	Sintaxe da busca
1	TS = (Rutin OR rutoside OR "quercetin-3-O-rutinoside" OR sophorin OR troxerrutin)
2	TS = ("Degradation product*" OR "Degradation kinetics" OR "Stress testing" OR "Oxidation test" OR "Thermal stability" OR "Hydrolysis test" OR "metal ion testing" OR "Hydrolysis acid and basic" OR "Photo*" OR "Hidroximetilfurfural" OR "Isoquercitrin")
Total	Combinação da busca 1 com a busca 2 (1 AND 2)

Legenda: TS = Termo codificador indicativo que a busca foi realizada pelo título e assunto. Fonte: Autores (2022).

Os critérios de inclusão definidos foram: artigos publicados até o limite datado em 30 de maio de 2022, não sendo estabelecido um período inicial, em idioma inglês, com títulos, resumos e textos disponibilizados na íntegra através do banco de dados informatizado selecionado ou que puderam ser apresentados pela fonte de origem, que tivessem abordado o tema estabilidade do IFA e suas variantes, conforme elencado pelos termos selecionados no rastreamento das publicações, ainda que este não fosse o objetivo central do artigo.

Os critérios de exclusão foram: artigos que não apresentaram as condições ambientais ou meios reativos utilizados nos estudos de estabilidade, sejam estes de aspecto pontual ou àqueles que norteiam os testes de degradação forçada, também foram eliminadas as publicações que se propuseram a desenvolver sistemas de liberação contendo RUT ou processos de extração do ativo em derivados vegetais, mas que não delimitaram parâmetros para avaliar a estabilidade do IFA, frente aos meios de liberação ou as soluções extrativas, respectivamente.

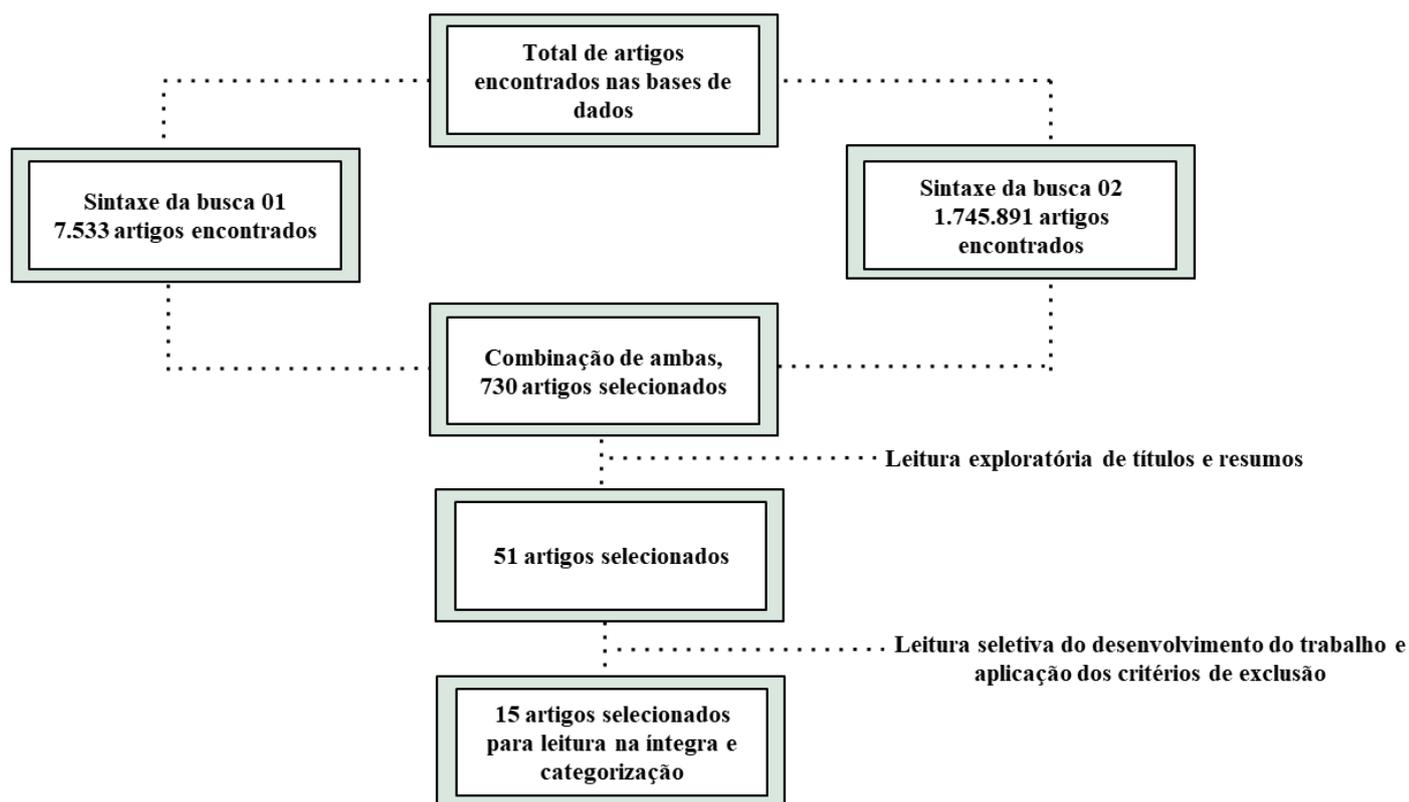
Durante a coleta de dados, os artigos que compreendiam os critérios de inclusão determinados, foram submetidos a leitura exploratória em que foi analisado o título e o resumo de cada publicação, para avaliar se o conteúdo estaria dentro do escopo, proposto pelo trabalho. Desse processo foram selecionadas publicações para leitura seletiva de seu desenvolvimento. Em sequência os artigos designados nessa etapa foram lidos na íntegra, o que possibilitou categorizá-los.

Com base na categorização dos artigos elencados, foram elaborados quadros sinóticos com o objetivo de descrever as principais características dos métodos utilizados como ferramentas analíticas para avaliar a estabilidade de RUT. A partir dessa abordagem, os leitores obterão um panorama do impacto dessas publicações na construção do perfil de estabilidade de RUT e na discussão crítica das lacunas ainda existentes, que podem ser atenuadas através do encorajamento dos pesquisadores no desenvolvimento de novos métodos indicativos de estabilidade fundamentados nos delineamentos historicizados.

3. Resultados e Discussão

A estratégia de sintaxe da busca após a combinação dos termos-chave reportou um total de 730 artigos. A partir destes trabalhos, foi realizada uma leitura exploratória em que foi analisado o título e o resumo de cada publicação, para avaliar se o conteúdo estaria dentro do escopo, proposto pelo trabalho. Conforme definição dos critérios de inclusão, desse processo, foram selecionados 51 artigos para leitura seletiva do desenvolvimento das publicações. Na sequência, ao aplicar os critérios de exclusão, 15 artigos foram selecionados para leitura na íntegra. A Figura 3, representa um fluxograma das publicações selecionadas em cada etapa, conforme a descrição anterior.

Figura 3. Fluxograma das publicações selecionadas para a revisão integrativa.



Fonte: Autores.

Os artigos selecionados na última etapa foram lidos na íntegra e posteriormente categorizados em três grupos, conforme o tema central em que o estudo de estabilidade de RUT estava integrado. Para compreensão efetiva dos parâmetros analíticos as publicações foram agrupadas nas seguintes seções: Otimização de processos e monitoramento de extratos de derivados vegetais; desenvolvimento de sistemas de liberação estabilizantes e avaliação físico-química em diferentes meios

reativos. Os artigos foram organizados no Quadro 3, onde são apresentados: autores e ano de publicação, título, objetivo do estudo e categorização.

Quadro 3. Síntese das publicações selecionadas que contém estudos de estabilidade da RUT.

n°	Autor/ Ano	Título	Objetivo do estudo	Categorização
1	Chen et al. (2010)	Chemical stability of yellow pigment extracted from the flower bud of <i>Sophora japonica</i> L. (Huaimi).	Analisar a estabilidade química do extrato da planta, que contém a RUT como um dos principais pigmentos amarelos, a partir da variação de pH, temperatura e íons metálicos nos meios extratores.	Otimização de processos e monitoramento de extratos de derivados vegetais.
2	Silveira et al. (2014)	The effect of the duration of infusion, temperature, and water volume on the rutin content in the preparation of mate tea beverages: An optimization study.	Otimizar o preparo da infusão de chá mate derivado da planta <i>Ilex paraguariensis</i> , a partir da variação da temperatura e o volume de água, tendo como marcador a alteração da concentração de RUT.	Otimização de processos e monitoramento de extratos de derivados vegetais.
3	Qiao et al. (2014)	Sonochemical effects on 14 flavonoids common in citrus: Relation to stability.	Investigar as alterações de estabilidade de 14 flavonóides, após processos que utilizam o tratamento por ultrassom sob a influência de fatores comuns como: solvente, temperatura, intensidade de ultrassom, entre outros.	Otimização de processos e monitoramento de extratos de derivados vegetais.
4	Dawidowicz et al. (2016)	Rutin Transformation During Its Analysis Involving Extraction Process for Sample Preparation.	Avaliar a estabilidade de RUT, após processamento de extração líquido-sólido e isolamento do IFA, a partir da flor de <i>Sambucus nigra</i> L. sob variação dos fatores: concentração de metanol, tempo de extração, temperatura, pH da solução e componentes da matriz.	Otimização de processos e monitoramento de extratos de derivados vegetais.
5	Koyu & Haznedaroglu (2016)	Investigation of impact of storage conditions on <i>Hypericum perforatum</i> L. dried total extract.	Investigar o impacto das condições de armazenamento na estabilidade do extrato seco de <i>Hypericum perforatum</i> sob a variação de fatores: temperatura, umidade. Incidência de luminosidade e soluções do extrato em meio metanólico.	Otimização de processos e monitoramento de extratos de derivados vegetais.
6	Almeida et al. (2010)	Nanostructured Systems Containing Rutin: In Vitro Antioxidant Activity and Photostability Studies.	Avaliar a atividade antioxidante <i>in vitro</i> e a fotoestabilidade de sistemas nanoestruturados contendo RUT.	Desenvolvimento de sistemas de liberação estabilizadores.
7	Nguyen et al. (2013)	An investigation into the supramolecular structure, solubility, stability and antioxidant activity of rutin/cyclodextrin inclusion complex.	Avaliar a habilidade de complexos de inclusão formados por RUT e variados tipos de ciclodextrina promoverem modificações na solubilidade, estabilidade e capacidade oxidativa do IFA.	Desenvolvimento de sistemas de liberação estabilizadores.
8	Savic et al. (2016)	Enhancement of solubility and photostability of rutin by complexation with beta-cyclodextrin and (2-hydroxypropyl)-beta-cyclodextrin.	Avaliar o aumento da solubilidade e a fotoestabilidade de RUT complexada com diferentes tipos de β -ciclodextrinas.	Desenvolvimento de sistemas de liberação estabilizadores
9	Ahmad et al. (2016)	Rutin phospholipid complexes confer neuro-protection in ischemic-stroke rats.	Desenvolver complexos fosfolipídicos de RUT, para avaliar o desempenho da atividade neuroprotetora em ratos, além de analisar as alterações das propriedades biofarmacêuticas do IFA e sua estabilidade via testes de degradação forçada.	Desenvolvimento de sistemas de liberação estabilizadores
10	Dammak & Sobral (2018)	Investigation into the physicochemical stability and rheological properties of rutin emulsions stabilized by chitosan and lecithin.	Investigar a estabilidade físico-química, as propriedades reológicas de emulsões compostas por RUT e estabilizadas por quitosana e lecitina em diferentes concentrações e condições de	Desenvolvimento de sistemas de liberação estabilizadores

			armazenamento diferenciadas.	
11	Wojciak-Kosior et al. (2004)	Densitometric determination of kinetics of hydrolysis of flavonoid glycosides.	Avaliar a determinação densitométrica da cinética de hidrólise ácida de glicosídeos de flavonóides.	Avaliação físico-química em diferentes meios reativos.
12	Wang et al. (2011)	A comparison of acidic and enzymatic hydrolysis of rutin.	Desenvolver um estudo comparando a degradação de RUT em meio ácido e por hidrólise enzimática.	Avaliação físico-química em diferentes meios reativos.
13	Zvezdanovic et al. (2012)	Irreversible UV-induced quercetin and rutin degradation in solution studied by UV spectrophotometry and HPLC chromatography.	Avaliar a degradação irreversível de RUT e QUERC, em diferentes soluções induzida por radiação UV-B e UV-C.	Avaliação físico-química em diferentes meios reativos.
14	Ravber et al. (2016)	Hydrothermal Degradation of Rutin: Identification of Degradation Products and Kinetics Study.	Avaliar a estabilidade hidrotérmica e identificar a cinética e a rota de degradação da RUT, em atmosferas de diferentes gases: nitrogênio (N ₂) e dióxido de carbono (CO ₂).	Avaliação físico-química em diferentes meios reativos.
15	Paczkowska et al. (2017)	Kinetic of rutin degradation and its determination in dietary supplements.	Desenvolver um método indicativo de estabilidade para avaliar a estabilidade de RUT em meio ácido, básico, oxidativo, termolítico e fotolítico, além de determinar a cinética de degradação em meio ácido e básico, sob diferentes concentrações do IFA e temperaturas de meio reacional	Avaliação físico-química em diferentes meios reativos.

Fonte: Autores.

Diante das publicações selecionadas que compõem o Quadro 3, podemos observar que a estabilidade da RUT é avaliada sob diferentes aspectos, a partir da determinação da variação da concentração do ativo e monitoramento dos PDs formados. A primeira categoria, retrata a variação dos parâmetros críticos, na otimização de processos e monitoramento de extratos de derivados vegetais como: temperatura, tipo e volume de solvente utilizado, umidade, luminosidade, pH das soluções, condições de armazenamento entre outros. A RUT pode ser extraída de uma variedade de espécies vegetais e não há padronização durante a produção desses extratos. Em busca da obtenção de maior rendimento; os parâmetros mencionados são ajustados, entretanto dependendo do nível de exposição a determinado fator, a estabilidade da RUT e de outros marcadores presentes pode ser afetada, através da redução de teor dos mesmos e produção de PDs, que podem ser potencialmente tóxicos.

Em sequência, a segunda categoria, abrange os trabalhos que visavam desenvolver sistemas de liberação contendo RUT, para finalidades terapêuticas diversas mais eficazes, a partir da liberação controlada do fármaco em alvos específicos e em contrapartida avaliaram a capacidade desses sistemas afetarem as propriedades biofarmacêuticas e desempenharem atividade protetiva da estrutura química da RUT: em meios reativos ácidos, básicos, oxidativos e fotolíticos, sob condições variadas de armazenamento.

Por fim a última categoria, reuniu os trabalhos destinados especificamente a compreensão do comportamento molecular da RUT, em diferentes meios reativos. A compreensão das rotas de degradação molecular, permite o desenvolvimento de produtos mais seguros, através da adoção de controles físico-químicos ou adição de adjuvantes farmacotécnicos e são delimitadores dos critérios de armazenamento adequados. A elucidação adequada dos mecanismos de degradação da RUT, também podem propiciar vantagens econômicas, uma vez que seu subproduto o 5-hidroximetilfurfural pode ser utilizado como agente flavorizante (Ravber et al., 2016).

3.1 Otimização de processos e monitoramento de extratos de derivados vegetais.

Com objetivo de proporcionar o método e as condições mais eficientes para extração de novos compostos ou de constituintes já conhecidos em derivados vegetais é imprescindível investigar os parâmetros de maior impacto nesse processo.

A extração líquido-sólido é o método mais empregado para o isolamento de compostos bioativos, sua efetividade está correlacionada a temperatura, pH, tipo e mistura de solventes utilizados, o volume ocupado nos instrumentos, tempo do processo, uso de ultrassom, a presença ou ausência de agitação (Gullón et al., 2017). Outros fatores que antecedem o contato dos derivados vegetais com os solventes e que são importantes para obtenção de uma boa rentabilidade e estabilidade são o armazenamento, luminosidade, capacidade de manter em temperatura adequada para evitar a perda de compostos voláteis, umidade, bem como os procedimentos mecânicos como corte, trituração, prensagem que determinam o tamanho de partícula (Abubakar & Haque, 2020; Gullón et al., 2017).

Os flavonóides, dentre os quais está inclusa a RUT são instáveis durante esse processo em razão de sua grande estrutura composta por grupos hidroxila, cetona e ligações duplas insaturadas (Biesaga, 2011). A padronização na obtenção de extratos de uma série de vegetais que possuem RUT em sua composição e outros variados compostos é importante para definir de forma qualitativa e quantitativa, quais substâncias são derivadas da espécie vegetal, os produtos de degradação formados durante o processo originados desses metabólitos (Nafiu et al., 2017; Pandey & Tripathi, 2014) e assim promover uma maior segurança terapêutica na administração de produtos fitoterápicos e para suplementação alimentar, em virtude da redução dos riscos de toxicidade e definição da concentração efetiva que irá desencadear a resposta farmacológica ótima, representando de forma mais próxima a composição nativa real do material na escala preparativa, industrial o que possibilita a orientação do procedimento ideal de preparo e armazenamento de chás, infusões, tinturas derivadas de plantas medicinais e consumidos tradicionalmente com finalidade terapêutica (Kunle et al., 2012; Rizwan et al., 2019).

Como veremos nos estudos à seguir, as misturas de metanol e metanol-água, são as mais frequentes empregadas como extraentes para o isolamento de RUT das plantas e conforme os parâmetros de condução foi possível estabelecer a variabilidade da composição química dos extratos obtidos e vislumbrar possíveis rotas de degradação à partir do auxílio de técnicas cromatográficas (cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos - CLAE-DAD) e espectroscópicas (espectrometria de massas - EM e ressonância magnética nuclear- RMN), que possibilitaram a separação dos compostos naturais dos vegetais, seus possíveis produtos de degradação e sua identificação estrutural, respectivamente. O Quadro 4, contém os métodos, condições analíticas e tempos de retenção de RUT e seu principal produto de degradação a quercetina e se encontram disponíveis para possibilitar uma rápida análise crítica no caso dos leitores sejam encorajados a reproduzi-los para ampliar informações do perfil de estabilidade de RUT até então não exploradas, ou aplicação para condução da extração otimizada dos derivados vegetais analisados.

Quadro 4. Descrição dos métodos analíticos aplicados para a avaliação dos estudos de estabilidade, durante a otimização de processos de extração em derivados vegetais que contêm RUT.

n°	Referência	Método	Condições analíticas	Tempo de retenção
1	Chen et al. (2010)	CLAE-DAD e UV-VIS	Coluna: C18 (250 x 4,6 mm, 5,0 µm). Fase móvel: MeOH: H ₂ O: ácido acético glacial (40:59:1, v/v). Modo: isocrático. Fluxo: 0,8 mL/min. Temperatura: 30°C. Comp. onda: 200-700 nm.	RUT: 4,9 min
2	Silveira et al. (2014)	CLAE-DAD	Coluna: C18 (250 x 4,6 mm, 5,0 µm). Fase móvel: H ₂ O; 0,1% de ácido fórmico em solução aquosa (0,1% v/v): MeOH (47,5:2,5:50 v/v/v). Modo: isocrático. Fluxo: 1,0 mL/min. Temperatura: 50°C. Comp. onda: 360 nm.	RUT: 5,75 min
3	Qiao et al. (2014)	CLAE-UV-EM-ESI	Coluna: C18 (100 x 2,0 mm, 2,9 µm). Fase móvel: H ₂ O (0,1% de ácido fórmico): MeOH. Modo: gradiente. Fluxo: 0,7 mL/min. Temperatura: 25°C. Comp. onda: 283-367 nm. A detecção por EM, foi realizada por infusão direta em coluna: C18 (250 x 4,6 mm, 5,0 µm). Fase móvel: H ₂ O (0,1% de ácido fórmico): ACN (0,1% de ácido fórmico). Modo: gradiente. Fluxo: 0,2 mL/min. Temperatura: 40°C.	RUT: N/C QUERC: 27 min
4	Dawidowicz et al. (2016)	CLAE-EM-ESI	Coluna: C18 (100 x 4,6 mm, 3,0 µm). Fase móvel: H ₂ O: ACN tamponada com ácido fórmico (25 mM). Modo: gradiente. Fluxo: 0,4 mL/min. Temperatura: N/C. Comp. onda: N/C.	RUT: 45 min QUERC: 60 min
5	Koyu & Haznedaroglu (2016)	CLAE-DAD	Coluna: C18 (250 x 4,6 mm, 5,0 µm). Fase móvel: H ₂ O: ácido acético 0,3%: ACN: MeOH. Modo: gradiente. Fluxo: 1,0 mL/min. Temperatura: 30°C. Comp. onda: N/C.	RUT: 22,71 min QUERC: 36,56 min

Legenda: N/C = Não consta. Fonte: Autores (2022).

Chen et al. (2010) apresentaram um estudo sobre a estabilidade química de um pigmento amarelo extraído da flor de *Sophora japonica L.* (Huaimi). O extrato desta planta possui vários pigmentos, sendo que dentre eles, RUT é o predominante, representando 42,56% do total, após ser quantificado no extrato via CLAE, conforme o método 1, descrito no Quadro 4. Segundo os autores, apesar das amplas propriedades, grande parte desses corantes naturais são instáveis ao contato com o maquinário industrial. Alguns fatores foram elencados como fontes de instabilidade: estrutura química, concentração dos pigmentos, pH e temperatura do meio, associado com a presença de co-compostos como fenóis e íons metálicos. Para análise das alterações dos extratos vegetais, de uma forma geral a espectrofotometria ultravioleta visível (UV-VIS) foi empregada. A absorção em faixas de comprimento de onda visível específicas está relacionada aos grupamentos químicos que compõe os pigmentos. A partir da análise espectral, foi possível definir a concentração ideal de extrato que seria utilizada nos estudos de estabilidade (0,05 mg. mL⁻¹).

Nesse estudo, extratos contendo pigmentos amarelos foram preparados e o método UV-VIS foi utilizado para analisar a sua estabilidade química a partir da variação de pH entre 2,0 e 9,0; em banho-maria sob aquecimento a temperatura entre 50°C a 90°C, por um período entre 1h e 6 h; e a interferência dos íons metálicos, observada através da adição de sais metálicos nos extratos individualmente como: nitrato de alumínio, cloreto de potássio, sulfato de magnésio, sulfato de manganês, sulfato de cobre, cloreto de sódio, cloreto de cálcio e tricloreto férrico. As concentrações dos sais variaram na faixa entre (1,0 x 10⁻⁵ M - 1,0 x 10⁻² M). O efeito dos íons deu-se por meio das alterações na absorbância e coloração das amostras.

Os resultados dos espectros de UV-VIS, mostraram os extratos com duas bandas de absorção majoritária, banda I em 265 nm e banda II em 360 nm. O efeito do pH entre 6,0 a 2,0 foi o aumento lentamente da intensidade de absorbância das bandas I e II. Durante esse processo, houve uma mudança hipocrômica da banda I de 265 nm para 254 nm e a banda II ficou inalterada. A coloração da solução permaneceu amarela. Na faixa de pH ente 7,0 à 9,0; as intensidades das bandas I e II aumentaram muito e a banda II sofreu deslocamento batocrômico de 360 nm para 404 nm. A coloração da solução se tornou mais brilhante acima de pH 7,0. Segundo os autores, essa mudança ocorreu devido a alteração estrutural dos compostos. RUT em condições mais alcalinas se transformou em uma chalcona, que contribuiu com a coloração amarela e o efeito batocrômico. Também foi demonstrado um aumento progressivo do percentual da RUT degradada, conforme acréscimo de temperatura. A cinética da reação foi classificada como de primeira ordem.

Em relação, a influência iônica sobre a estabilidade, os íons (Na^+ , K^+ , Ca^{+2} , Mg^{+2} e Mn^{+2}), praticamente não exerceram efeito sobre os espectros e a coloração das soluções. Contudo, os íons (Al^{+3} , Cu^{+2} e Fe^{+3}), modificaram os espectros e alteraram a coloração das soluções, sendo que Al^{+3} e Cu^{+2} , de forma similar promoveram efeito batocrômico, quando suas concentrações foram aumentadas, fazendo a banda II ter absorção em 406 nm e 409 nm, respectivamente. A solução adquiriu um aspecto mais brilhante. Para os íons Fe^{+3} , à medida que a sua concentração foi aumentada, a absorbância da banda II, em 360 nm registrou maior intensidade. Em concentrações superiores à 10^{-3} M, ocorre efeito hipocrômico. A solução resultante obteve coloração marrom.

O estudo menciona outra interação capaz de afetar a estabilidade do extrato, através da contribuição dos íons metálicos para o efeito de co-pigmentação, fenômeno caracterizado pela interação entre os íons e os compostos orgânicos, através de ligações químicas que podem formar novos complexos e melhorar a coloração das soluções pigmentadas. No caso do extrato que foi objeto de estudo, os grupos químicos; O-di-hidroxi, pertencentes a RUT tiveram afinidade quelante com os íons metálicos formando complexos. Nesta condição, houve mudança das características espectrais da molécula devido a formação do complexo $\pi=\pi$, alterando a intensidade da absorção (efeito hipocrômico) e o comprimento de onda (batocrômico), em paralelo a coloração amarela das soluções se tornou mais vibrante.

Esse trabalho merece destaque pela habilidade dos autores na observação das alterações espectrais de UV-VIS, por espectrofotometria, uma técnica acessível e de menor custo, que foi utilizada como indicativa indireta de estabilidade ao demonstrar a alteração dos compostos em contato com variados meios reacionais, bem como a observação visual através da mudança da intensidade e brilho da coloração nas soluções extrativas. Neste estudo, o método cromatográfico foi utilizado apenas, para detecção e quantificação do teor de RUT inicial no extrato, não sendo objetivo detectar e separar possíveis PDs originados, após a submissão as condições de degradação como geralmente são esperados para métodos indicativos de estabilidade (MIEs), entretanto esse método pode ser utilizado como ponto de partida para ampliar esse perfil de estabilidade, uma vez que o mesmo demonstra vantagens analíticas como: tempo de retenção da RUT menor que 10 minutos, sistema de eluição isocrático, composto de maior proporção de solvente aquoso, o que minimiza o impacto ambiental decorrente das análises.

Silveira et al. (2014) em estudo sobre a otimização do preparo da infusão de chá mate, derivado da planta *Ilex paraguariensis*, avaliaram o efeito da temperatura, tempo de obtenção e o volume de água sobre o teor de RUT contido nas folhas deste vegetal. Conforme, planejamento experimental multivariado foram avaliadas as seguintes faixas: 3,8 min-15 min de duração de infusão; 58,1°C-90°C para a temperatura da água e 100 mL-400 mL para o volume de água. Segundo os autores, o aumento da temperatura proporciona maior solubilidade e difusão dos compostos fenólicos. Contudo, em temperaturas mais altas, (81,9°C-90°C), a concentração de RUT diminuiu, conforme análise pelo método 2, Quadro 4 e alcança níveis não quantificáveis, o que sugere a degradação deste flavonóide. Após ser avaliado a interação entre os fatores: temperatura e volume de água, verificou-se que havendo o aumento do volume de água e da temperatura em faixas mais amenas, ocorreu um

aumento do teor de RUT na infusão, fato inverso foi observado quando foi aumentado o volume de água e a temperatura em faixas mais elevadas. Segundo os autores essa degradação pode ser explicada pela menor taxa de perda de calor em bebidas preparadas com maiores volumes de água. O trabalho mostrou que as condições ideais para a preparação da extração de RUT eram as seguintes: 9 minutos de duração, temperatura da água em 72°C e o seu volume de 100 mL. O estudo não avaliou os possíveis PDs formados durante as alterações desse processo.

Em outro estudo com produtos alimentícios, Qiao et al. (2014) investigaram as alterações da estabilidade de 14 flavonóides majoritários presentes em frutas cítricas, após processos que utilizam o tratamento por ultrassom (efeitos sonoquímicos). Segundo os autores, o ultrassom é bastante utilizado no processo de extração de compostos bioativos devido a sua acessibilidade e eficiência neste processo, entretanto a ultrasonicação pode degradar e/ou oxidar os flavonóides. O objetivo deste estudo foi determinar a influência dos fatores comuns (solvente, temperatura, intensidade do ultrassom, altura do líquido, duração do pulso e ciclo de serviço) sobre a estabilidade desses flavonóides. Este trabalho, não teve como objeto de estudo a RUT, entretanto, alguns flavonóides analisados possuem estrutura semelhante a RUT, como por exemplo a narirutina, bem como a quercetina que é considerado o principal produto de degradação hidrolítica de RUT.

Entre os flavonóides submetidos ao ultrassom em diferentes solventes comuns do processo extrativo (100 % metanol; 100 % etanol; 100 % água; 80 % metanol e 80 % etanol), apenas a quercetina foi degradada extensivamente. O tratamento em solução de 80% de etanol, causou fortes efeitos químicos e produziu a menor concentração de quercetina (56 %) entre todos os solventes analisados. Em relação a variação de temperatura, neste meio, apenas a quercetina teve decaimento de teor, quando submetida a temperaturas entre -5°C e 45°C e manteve-se estável em 45 °C e 65 °C. Segundo os autores, a instabilidade no grupo 3-hidroxila nos flavonóides resulta na oxidação das agliconas de flavonol e seus 7-glicosídeos. Em contrapartida, os grupamentos: flavonol-3-glicosídeo, flavonas e flavanonas permanecem estáveis durante a ultrasonicação.

Os flavonóides que possuem em sua estrutura uma maior quantidade de grupos sacarídeos e metoxila como (hesperidina, narirutina, eriocitrina) estão mais protegidos da degradação via ultrassom. Em relação a temperatura, afirmaram que com o seu aumento é permitido que a cavitação seja alcançada em intensidade acústica mais baixa, como consequência direta do aumento da pressão de vapor que ocorre quando a temperatura de um líquido é aumentada, por isso não houve decaimento do teor de quercetina nas temperaturas superiores acima testadas. Outro efeito estudado, refere-se à altura do meio analisado em 80 % de etanol, em que a amostra é acondicionada (topo ao fundo do tubo) para o tratamento sobre ultrassom. Verificou-se uma redução de 12,5% na degradação da quercetina, se comparado às alturas de 2 cm e 12 cm, da amostra no tubo. Este resultado é atribuído a redução da intensidade de cavitação com o aumento da altura devido a atenuação das ondas causada pela absorção e espalhamento.

O resultado da separação dos PDs das amostras de QUERC submetidas ao tratamento por ultrassom via CLAE-DAD e identificação por EM, mostram os picos com os seguintes tempos de retenção (TR): TR₁= 6,5 min; TR₂= 13,3 min; TR₃= 16,4 min; TR₄= 19,5 min; correspondente as respectivas massas, fórmulas moleculares e denominações químicas: PD₁= 169 m/z, (C₇H₆O₅), ácido 2,4,6-trihidroxibenzóico; PD₂= 316,9 m/z, (C₅H₁₀O₈), 2-(3,4-dihidroxibenzoil)-2,4,6-trihidroxil-3(2H)-benzofuranona; PD₃= 195 m/z, (C₉H₉O₅), metil-3,4-dihidroxil-fenil-glioxilato; PD₄= 304,8 m/z, (C₁₄H₁₀O₈), ácido 2-(3,4-dihidroxibenzoyloxy)-4,6-dihidroxil-benzóico. Outros quatro picos foram formados e correspondem a formação de adutos entre a molécula de QUERC, os solventes utilizados e o dímero do ativo em questão.

Através dos experimentos de fragmentação estrutural de ESI-MS/MS, identificou-se que o PD₁ é originário do PD₄. Os autores sugeriram uma rota de degradação, menciona-se que o anel heterocíclico fundido de QUERC é o locus de reação para a formação de todos os PDs originados, após tratamento por ultrassom. Nas reações houve perda ou adição de substituintes nos carbonos do anel originário. Apesar desse trabalho ter como objetivo avaliar o processo extrativo, é importante observar que a ultrasonicação é uma técnica que em geral é utilizada para acelerar a solubilização das amostras, em

diferentes meios para posteriormente serem degradadas nos testes de estresse, sendo a técnica com suas variantes, demonstradas anteriormente, possível fator de instabilidade para determinado composto, seu emprego deve ser monitorado.

Para avaliar a estabilidade de RUT, após processamento de extração líquido-sólido e isolamento do ativo a partir da flor de *Sambucus nigra L.*, Dawidowicz et al. (2016), encontraram 23 PDs derivados de RUT, dentre estes, 12 PDs ainda não tinham sido relatados. A nomenclatura química e as razões massa/carga desses produtos obtidos são as seguintes: 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-3-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxochromen-4-one (isoquercitrina) - m/z 463; 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5-methoxy-7-hydroxy-3-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxochromen-4-one (metil-isoquercitrina) - m/z 477; 2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-3-[[2S,3R,4R,5R,6S]-3,4,5-trihydroxy-6-methyl-2-tetrahydropyranyl]oxy]-4-chromenone (quercitrina) - m/z 447; 2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-5-methoxy-7-hydroxy-3-[[2S,3R,4R,5R,6S]-3,4,5-trihydroxy-6-methyl-2-tetrahydropyranyl]oxy]-4-chromenone (metil-quercitrina) - m/z 461; 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5-methoxy-7-hydroxy-3-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-[(2R,3R,4R,5R,6S)-3,4,5-trihydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxymethyl]oxan-2-yl]oxochromen-4-one (metil-rutina) - m/z 623; 2-(3,4-Dihydroxybenzoyl)-2,4,6-trihydroxy-1-benzofuran-3(2H)-one (DTB) - m/z 317.

Em continuação foram detectados: 2-[(3,4-Dihydroxyphenyl)carbonyl]-4,6-dihydroxy-2-methoxy-1-benzofuran-3(2H)-one (metil-DTB) - m/z 331; Oxo (2,4,6-trihydroxyphenyl) acetic acid (OTA) - m/z 197; methyl oxo (2,4,6-trihydroxyphenyl) acetate (metil-OTA) - m/z 211; 2-[Carboxy(3,4-dihydroxyphenyl)methoxy]-4,6-dihydroxybenzoic acid (CDA) - m/z 335; 2-[1-(3,4-Dihydroxyphenyl)-2-methoxy-2-oxoethoxy]-4,6-dihydroxybenzoic acid (metil-CDA) - m/z 349; 2-[(3,4-Dihydroxybenzoyl)oxy]-4,6-dihydroxybenzoic acid (DDA) - m/z 305; Methyl 2-[(3,4-dihydroxybenzoyl)oxy]-4,6-dihydroxybenzoate (metil-DDA) - m/z 319; 4,6-Dihydroxy-1-benzofuran-2,3-dione (DBD) - m/z 179; 6-Hydroxy-4-methoxy-1-benzofuran-2,3-dione (metil-DBD) - m/z 193; 7-(3,4-Dihydroxyphenyl)bicyclo[4.2.0]octa-1,3,5,7-tetraene-2,4,8-triol (DBOT) - m/z 257; 7-(3,4-Dihydroxyphenyl)-8-methoxybicyclo[4.2.0]octa-1,3,5,7-tetraene-2,4-diol (metil-DBOT) - m/z 271; 3,5-Dihydroxy-2-[methoxy(oxo)acetyl]phenyl-3,4-dihydroxybenzoate (DPD) - m/z 347; 5-Hydroxy-3-methoxy-2-[methoxy(oxo)acetyl]phenyl 3,4-dihydroxybenzoate (metil-DPD) - m/z 361; 2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxy-4H-chromen-4-one (quercetina) - m/z 301; 2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-3-methoxy-4H-chromen-4-one (metil-quercetina) - m/z 315; 2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-1-benzofuran-3,4,6-triol (DBT) - m/z 273 e 2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-3-methoxy-1-benzofuran-4,6-diol (metil-DBT) - m/z 287.

Nesse estudo foi observado que a concentração de metanol, o tempo de extração, a temperatura e o pH da solução, bem como os componentes da matriz da planta, influenciam na quantidade e nos tipos de PDs formados. As amostras submetidas às condições variadas de extração foram analisadas pelo método 4, Quadro 4 e em seguida por espectrometria de massas de alta resolução (EMAR). Os PDs formados a partir de RUT foram classificados como derivados metilados e não-metilados. Em relação ao mecanismo de formação destes PDs, a substituição de hidrogênio no grupo OH ligado ao anel aromático é mais provável do que a substituição análoga no grupo OH ligado à estrutura alifática.

Avaliou-se a influência do aquecimento na formação de PDs sobre a solução metanólica de RUT isolada (A) e a solução metanólica do extrato das flores da planta contendo RUT (A'). Neste caso, observou-se a ausência de seis PDs (DTB, CDA, DDA, DBOT, DBD e metil-DBD) em (A') em comparação a (A). Segundo os autores alguns motivos podem ser elencados: 1) Redução da concentração de RUT em solução. 2) Influência catalítica dos componentes da matriz vegetal na formação de PDs metilados a partir da reação de PDs não-metilados com metanol. 3) Influência inibidora dos componentes da matriz vegetal na formação dos PDs de RUT, quando os PDs metilados desempenham o papel de compostos intermediários e são finalmente transformados em PDs não-metilados.

Em outro momento foi avaliado a formação de PDs sob aquecimento da solução de RUT em meio metanol/água (50/50 v/v) (B) e a solução metanol/água do extrato das flores da planta contendo RUT (50/50 v/v) (B'). Neste caso, observou-

se a ausência de dois PDs (metil-DBD and metil-DBOT em (B´) em comparação a (B), justificada pela menor concentração de metanol no sistema extrativo. Também foi avaliado a formação de PDs sob aquecimento da solução de RUT em meio metanol/água tamponada (pH = 6,5); (75/25 v/v) (C) e a solução metanol/água tamponada (pH = 6,5) do extrato das flores da planta contendo RUT (75/25 v/v) (C´). Neste caso, observou-se a ausência de um PD (metil-DBOT) em (C´) em comparação a (A e B) e um PD a mais (metil-DBD) em comparação a (B).

Foi observado que em faixa de pH mais ácido, as amostras do extrato de RUT, eram favorecidas para a formação de PDs derivados de metila. Este trabalho surpreende, ao afirmar que alguns desses compostos equivocadamente eram quantificados como se fossem naturais das plantas, contudo eram PDs formados durante o processo de extração. Portanto, esses resultados são relevantes para as pesquisas voltadas para determinação do metabolismo vegetal e a investigação para descoberta de novos compostos derivados de vegetais e apesar de não haver sugestão das rotas de degradação que geraram tais PDs, a separação e identificação das estruturas por CLAE-DAD e EMAR, poderá nortear a construção do perfil de estabilidade para RUT (IFA) ou em produtos acabados, durante a condução dos testes de degradação forçada, ainda que o meio reativo seja diferenciado daquele adotado no processo extrativo.

No último artigo classificado para esse grupo, os pesquisadores Koyu & Haznedaroglu (2015) investigaram o impacto das condições de armazenamento na estabilidade do extrato seco de *Hypericum perforatum* L. Foram analisadas as variações de temperatura, umidade e incidência de luminosidade sob as soluções do extrato metanólico, posteriormente os seus constituintes (RUT, ácido clorogênico, isoquercitrina, quercitrina, quercetina, amentoflavona, pseudo-hipericina e hiperforina) foram quantificados pelo método 5, descrito no Quadro 4, para determinação do teor de degradação ao decorrer de seis meses, seguindo as diretrizes da International Council Harmonization (ICH). As condições de armazenamento foram as seguintes: (1) 25°C, umidade não controlada e luminosidade do ambiente; (2) 25°C, umidade não controlada e sem luminosidade; (3) 25°C, umidade de 65%; (4) 40°C, umidade de 75%; (5) -20°C; (6) 4°C.

Sob a condição (1) RUT e QUERC, após quatro meses já apresentavam degradação avançada de 17,4% e 23,2% e no sexto mês de 40,6% e 42,7%. Em (2), RUT e QUERC, em quatro meses tiveram um percentual de degradação de 1,4% e 5,0%, respectivamente. Uma queda acentuada da estabilidade de ambos foi identificada no sexto mês, ao apresentarem 45,2% e 47,0% de degradação. Ao analisar os dados, fica evidente que a ausência de luminosidade retardou o processo de degradação de ambos os ativos, porém não foi suficiente para sustentar a estabilidade dos compostos ao longo do tempo de estudo predefinido, equiparando-se aos resultados obtidos na presença de luminosidade.

Em (3), RUT e QUERC, após quatro meses degradaram 22,0% e 22,1%, respectivamente e no sexto mês 46,6% e 46,9%. Em (4), RUT e QUERC, no quarto mês degradaram 15,1% e 0,1%, respectivamente. Em contrapartida, no sexto mês a degradação atingiu 52% e 40,1%, obtendo-se percentuais de degradação próximos a condição (3). Neste caso, como os autores promoveram mudanças em dois parâmetros (temperatura e umidade) de forma simultânea, não ficou evidente qual fator promove maior instabilidade. Além disso, não foi justificado, o fato da QUERC em condições mais drásticas de temperatura e umidade ter se apresentado mais estável.

Em sua última condição testada analisou-se a variação de temperatura: -20°C (5) e 4°C (6), sob o extrato, até o quarto mês em (5), obteve-se uma degradação de RUT e QUERC de 1,1% e 2,8%, respectivamente. Decorrido o mesmo intervalo para (6), RUT e QUERC haviam degradado 8,1% e 8,9%. No sexto mês, as degradações para RUT e QUERC de 34,5% e 39,6% em (5) e para (6) de 44,8% e 45,5%, respectivamente. Ou seja, o estudo aponta que a refrigeração em baixas temperaturas reduz a degradação de ambos os ativos nos extratos, entretanto é insuficiente para mantê-los estáveis por seis meses, sendo necessário a condução de estudos posteriores em menores temperaturas para verificar se uma maior estabilidade é alcançada.

3.2 Desenvolvimento de sistemas de liberação estabilizadores

As características físico-químicas intrínsecas da molécula de RUT, como grande tamanho molecular, baixa solubilidade em meio aquoso e permeabilidade limitada a membrana, justifica sua reduzida biodisponibilidade oral ou tópica tornando-se uma desvantagem para o desenvolvimento farmacotécnico adequado de novas formulações (Gullón et al., 2017; Lipkovskaya et al., 2014). Diante dessas restrições, nos últimos anos foram desenvolvidos uma série de sistemas de liberação para contorná-las e tornar mais eficaz a administração oral, tópica ou parenteral de futuros medicamentos que possuam RUT em sua composição (Asfour & Mohsen, 2018; Basaran et al., 2022; Saha & Mishra, 2020). Esses sistemas também detém a capacidade em direcionar o ativo para alvos específicos em tecidos e órgãos, o que pode permitir o ajuste para doses menores pela capacidade de proteção da degradação prévia do ativo, por exemplo no fluido gástrico e liberação apenas em meio intestinal, essa característica também minimiza os efeitos de toxicidade e causa mais impacto em tratamentos prolongados com fármacos que possuem baixo índice terapêutico e/ou que produzem uma série de metabólitos com potencial tóxico (de Oliveira et al., 2022; Ghanbari-Movahed et al., 2022)

Além desses benefícios, a natureza química dos materiais e a forma de concepção dos sistemas, podem conferir a RUT uma maior estabilidade físico-química a fatores ambientais como luminosidade, umidade, temperatura bem como aos meios reacionais que mimetizam de uma forma acelerada o processo de degradação em condições ideais de armazenamento ao longo do prazo de validade ou período de utilização de um determinado produto, como ocorre na submissão de IFAs ou produtos acabados aos meios hidrolíticos ácidos, básicos e oxidativos. Os artigos selecionados para discussão desta seção, possuem em comum o desenvolvimento de sistemas de liberação e podem ser divididos em duas partes: a primeira aborda a discussão teórica e os resultados em que foi comprovada a otimização das propriedades biofarmacêuticas e a segunda está voltada para avaliação da estabilidade dos sistemas sob variadas condições. Conforme o Quadro 5, a técnica predominante para quantificação de RUT, foi a CLAE-DAD, uma característica unânime nos trabalhos analisados foi a ausência ou abordagem limitada dos dados cromatográficos obtidos das amostras degradadas, que em geral, além de fornecer informações para estabelecer a correlação quantitativa para determinação da redução do teor do ativo, demonstram a detecção e separação adequada de PDs, que afetam a qualidade analítica e a construção do perfil de estabilidade.

Quadro 5. Descrição dos métodos analíticos aplicados para a avaliação da estabilidade durante o desenvolvimento de sistemas de liberação que contém RUT.

n°	Referência	Método	Condições analíticas	Tempo de retenção
1	Almeida et al. (2010)	CLAE-DAD	Coluna: C18 (150 x 4,6 mm, 5,0 µm). Fase móvel: MeOH:H ₂ O (55:50 v/v) acidificada com ácido fosfórico (pH 4,0). Modo: isocrático. Fluxo: 1,0 mL/min. Temperatura: N/C. Comp. onda: N/C.	N/C
2	Nguyen et al. (2013)	CLAE-DAD	Coluna: C18 (150 x 4,6 mm, 5,0 µm). Fase móvel: H ₂ O: MeOH (40:60 v/v). Modo: isocrático. Fluxo: 0,8 mL/min. Temperatura: N/C. Comp. onda: N/C.	N/C
3	Savic et al. (2016)	UV-VIS	Comp. onda: 358 nm	Não se aplica
4	Ahmad et al. (2016)	CLAE-DAD	Coluna: C18 (250 x 4,0 mm, 5,0 µm). Fase móvel: ACN: ácido acético 1% (20:80 v/v). Modo: isocrático. Fluxo: 1,0 mL/min. Temperatura: 30°C. Comp. onda: N/C.	N/C
5	Dammak & Sobral (2017)	CLAE-DAD	Coluna: C18 (250 x 4,6 mm; 5,0 µm). Fase móvel: H ₂ O: MeOH (40:60 v/v). Modo: isocrático. Fluxo: 1,0 mL/min. Temperatura: N/C. Comp. onda: N/C.	N/C

Legenda: N/C = Não consta. Fonte: Autores (2022).

Almeida et al. (2010) publicaram um estudo sobre a avaliação de atividade antioxidante *in vitro* e fotoestabilidade de sistemas nanoestruturados (nanocápsulas e nanoemulsões) contendo RUT. Para a quantificação de RUT foi desenvolvido o método utilizando as condições analíticas, descritas no método 1, Quadro 5. O sistema de irradiação UV das amostras: nanocápsulas de RUT (NC-RUT), nanoemulsões de RUT (NE-RUT) e a solução etanólica de RUT (SE-RUT); consistiu em uma lâmpada de mercúrio de 400 w, sistema de refrigeração baseado na circulação de ar e termorregulador para controle da temperatura, suporte para tubos de quartzo onde foram acondicionadas as amostras envoltas por um bloco à base de alumínio. As amostras foram irradiadas durante 30 min e a cada 5 min eram retiradas dos tubos e analisadas por CLAE para determinar o teor de RUT. A degradação de RUT nas nanoestruturas, obedeceu a cinética de primeira ordem. A constante de velocidade de degradação (k) de RUT em NC-RUT e NE-RUT foi de aproximadamente seis e sete vezes menor, respectivamente se comparado à SE-RUT, portanto ambas as formulações apresentaram um aumento da fotoestabilidade de RUT, durante o tempo avaliado.

A maior estabilidade atribuída a NE-RUT, pode ser explicada pela presença de nanocristais de RUT adsorvidos na superfície, observados através de imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET). A formação desses nanocristais ocorreram através do vazamento de RUT da nanoemulsão devido à ausência da camada polimérica ao redor das gotículas e sua subsequente cristalização no meio aquoso disperso. Este estudo mostrou-se pioneiro no desenvolvimento de sistemas de liberação, ao incorporar RUT em sistemas nanoestruturados, reduzindo a susceptibilidade do ativo à radiação UV e prolongando a sua atividade antioxidante. Além disso, demonstrou que a presença do polímero não apresentou influência significativa no aumento da fotoestabilidade de RUT, no entanto sua presença em NC-RUT, levou a uma taxa de liberação mais lenta e a uma atividade antioxidante *in vitro* prolongada, o que torna o sistema promissor para o tratamento de uma série de doenças relacionadas ao estresse oxidativo causado pela ação dos radicais livres.

Nguyen et al. (2013) desenvolveram um estudo para avaliar as modificações na solubilidade, estabilidade e capacidade antioxidante de RUT, método 2 do Quadro 5, em complexos de inclusão com variados tipos de ciclodextrina (CD):

β -ciclodextrina (β -CD), (2-hidroxiopropil)- β -ciclodextrina (HP- β -CD), (2-hidroxiopropil)- α -ciclodextrina (HP- α -CD) e (2-hidroxiopropil)- γ -ciclodextrina (HP- γ -CD). Dentre as CDs avaliadas foram calculadas as constantes de estabilidade aparente para os complexos de RUT formados, sendo estabelecida a seguinte ordem: HP- γ -CD > HP- β -CD > β -CD > HP- α -CD. Segundo os autores esta ordem pode ser parcialmente explicada pela diferença do tamanho da cavidade das diferentes CDs, que também obedece a sequência anterior, como a molécula de RUT possui um tamanho molecular relativamente grande, devido às suas duas subunidades de monossacarídeos, uma cavidade de CD maior facilita a formação do complexo de inclusão. Em relação as cavidades moleculares de HP- β -CD e β -CD, que são semelhantes, a capacidade de inclusão de RUT em HP- β -CD é superior a β -CD, devido a presença de grupos hidroxiopropil que contribuem com a restrição de RUT encapsulada dentro da cavidade por meio da formação de ligações de hidrogênio.

Em avaliação da estabilidade física dos complexos formados com HP- γ -CD, esses são levemente maiores comparados com HP- β -CD, sugere-se que devido ao tamanho excessivo da cavidade de HP- γ -CD, da mesma forma que é facilitada a inserção total ou parte da molécula de RUT, também é oportuna a sua saída. Como a constante de estabilidade do complexo de RUT com HP- γ -CD foi apenas ligeiramente superior à HP- β -CD e a cavidade superdimensionada de HP- γ -CD, viabiliza o trânsito da molécula de RUT, o presente estudo optou pela HP- β -CD para avaliar a capacidade de proteger a RUT do calor e da radiação UV por um período de 18 dias em solução aquosa. Não foi especificado no estudo a quantidade de lux/hora que as amostras de RUT livre e complexada foram submetidas. Quando expostas à luz UV e ao aquecimento a 45°C, as amostras de RUT livre e complexada degradaram, entretanto, a segunda em uma velocidade moderadamente mais lenta que a primeira, em ambos os casos, o que sugere a capacidade de HP- β -CD proteger a RUT, além disso este complexo aumentou significativamente sua capacidade antioxidante.

Com uma proposta de trabalho semelhante ao estudo anterior, Savic et al. (2016) avaliaram o aumento da solubilidade e a fotoestabilidade de RUT complexada com β -CD e HP- β -CD. RUT foi quantificada por UV-VIS (358 nm), pelo método 3, do Quadro 5. As amostras em solução metanólica de RUT-livre; RUT- β -CD; RUT-HP- β -CD foram irradiadas pela luz UV-B, durante 120 min, com um total de fluxo energético de 14,5 W.m⁻². Assim como em Nguyen et al. (2013), a estabilidade foi crescente conforme a sequência: RUT-livre < RUT- β -CD < RUT-HP- β -CD; com decaimento do teor de RUT em 13,8%; 5,44% e 2,52%, respectivamente e houve aumento da capacidade antioxidante e da solubilidade. Nesses trabalhos, os complexos formados com RUT não foram submetidos à degradação em meio ácido, básico, oxidativo, bem como não foram avaliados a formação de PDs e os cromatogramas das amostras submetidas as condições de estresse mencionadas.

Com o objetivo de desenvolver um novo sistema de liberação, Ahmad et al. (2016), incorporaram RUT, em fosfolipídios modificados (PLCs), a partir de metodologias que utilizavam meios em excesso de etanol e tetrahidrofurano, por isso esses novos fosfolipídios foram denominados EPLC e TPLC, respectivamente. Os complexos fosfolipídicos RUT-EPLC e RUT-TPLC, desempenharam atividade neuroprotetora em ratos, após acidente vascular cerebral isquêmico e possibilitaram a melhoria nas propriedades biofarmacêuticas de RUT: solubilidade, dissolução, bem como na sua estabilidade que foi analisada via testes de degradação forçada. RUT livre e os complexos foram individualmente colocados sob refluxo à 40°C; com três diferentes reagentes (NaOH 0,1 M), (HCl 0,1 M) e (H₂O₂ 3%), para degradação básica, ácida e oxidativa, respectivamente. Após uma hora sob tais condições foram neutralizadas. O estresse fotolítico dos complexos seguiu as diretrizes dos guias da ICH. As amostras foram armazenadas em câmara de fotoestabilidade, a exposição à luz visível e à UV, foram de 318 h e 75,57 h, respectivamente para alcançar 1,2 x 10⁶ lux. Para quantificação de RUT foi utilizado o método 4 do Quadro 5.

Foi observado nos testes de estresse um maior percentual de degradação conforme à ordem dos meios: básico > oxidativo > ácido, para RUT livre e complexada (EPLC-RUT e TPLC-RUT). Contudo nos sistemas fosfolipídicos a magnitude de degradação é menor, indicando que a formulação pode proteger a RUT do estresse induzido, sendo que RUT-EPLC, oferece maior proteção em comparação à RUT-TPLC, nos três meios analisados. Em relação a degradação fotolítica, houve alta

redução do teor de RUT livre submetida ao tratamento por UV (86,82%) e pela luz visível (70,73%). A redução do teor do ativo foi minimizada para 69,34% e 62,95%, em RUT-TPLC e de 63,28% e 48,98% em RUT-EPLC, conforme sequência anterior. Após o conjunto de resultados, inferiu-se que RUT complexada com os fosfolipídios são menos susceptíveis à fotodegradação em comparação a RUT-livre e como nos testes anteriores: RUT-EPLC foi mais estável comparada a RUT-TPLC.

Dammak e Sobral (2018), investigaram a estabilidade físico-química e as propriedades reológicas das emulsões de RUT estabilizadas por quitosana e lecitina. A cinética de degradação de RUT foi avaliada, a partir do efeito da concentração de quitosana 0%-2% (m/m), nas temperaturas de 4°C, 25°C e 40°C e a concentração de lecitina 0,5%-7% (m/m) na emulsão. As formulações com concentração de lecitina inferior à 0,5% foram consideradas instáveis, quando à 5% são estáveis. Nessa concentração as moléculas de lecitina são adsorvidas na superfície das gotículas de óleo e exercem a função emulsificante de forma mais eficiente. Segundo os autores, devido a estrutura altamente insaturada, RUT é sensível a degradação oxidativa durante o processamento de emulsificação e armazenamento.

A degradação rápida de RUT (>75%) foi observada em todas as amostras de emulsões armazenadas à 40°C, durante 7 dias, através do método 5, do Quadro 5. A concentração de quitosana tem efeito significativo na degradação de RUT devido a formação de multicamadas nas emulsões. Neste trabalho, as emulsões estabilizadas com lecitina e armazenadas à 25°C, durante duas semanas, contendo quitosana à 2% (m/m) tiveram redução na degradação de RUT em 36%. Essa maior estabilidade, favorecida pelas emulsões estabilizadas com lecitina à concentração de quitosana acima de 0,5% (m/m), ocorreu devido ao maior tamanho médio da gotícula, portanto RUT era encapsulada por uma interface mais espessa. Assim a difusão de pró-oxidantes ou radicais livres pode ser limitada pela cobertura espessa da interface lecitina-quitosana. O aumento percentual de quitosana na formulação também propiciou uma menor sensibilidade à temperatura. As cinéticas de degradação, nas condições variando (%) quitosana e temperatura foram classificadas como de primeira ordem. Segundo os autores esse sistema pode ser útil para a indústria alimentícia na elaboração de emulsões com estabilidade térmica melhorada.

3.3 Avaliação físico-química em diferentes meios reativos

Esse conjunto de artigos aborda a execução de testes com finalidade específica de avaliar a estabilidade do IFA de RUT e dos produtos acabados em condições reacionais mais próximas aos preconizados pelos guias e resolução sanitárias internacionais. A estabilidade dos IFAs e dos produtos farmacêuticos é definida como o período que vai do estoque ao uso, em que são mantidas as condições e características especificadas no processo de fabricação, em termos quantitativos o produto com estabilidade ideal não deve ter sua potência reduzida a índices superiores à 10% e seus produtos de degradação precisam ser analisados qualitativamente e quantitativamente (Sengupta et al., 2018; Silva et al., 2009). Para avaliação analítica dos IFAs e dos produtos acabados de forma eficaz ao longo do prazo de validade em condições ideais de armazenamento com temperatura e umidade adequadas, é necessário anteriormente submetê-los aos testes de degradação forçada também conhecido como teste de estresse. Os objetos de estudo devem ser submetidos à meios em condições mais drásticas comparadas aos ensaios de estabilidade acelerada (Sharma & Murugesan, 2017; Zhou et al., 2017).

Após a submissão, a ferramenta analítica desenvolvida denominado método indicativo de estabilidade (MIE) deve ter a capacidade de detectar, separar e quantificar o maior número de PDs formados, ainda que nem todos sejam observados nos estudos de estabilidade (acelerada, longa duração e acompanhamento) (Blessy et al., 2014; Liu et al., 2019). Esses testes devem proporcionar a degradação em um nível adequado para avaliação da formação de PDs e inferior àquele que promoveria a degradação excessiva e completa da amostra do IFA ou produto acabado. O excesso de degradação poderá desencadear a formação de PDs secundários que não são formados durante o período de utilização ou prazo de validade do produto acabado,

portanto não são de interesse analítico e podem dificultar a determinação de PDs que são majoritários (Agência Nacional de Vigilância Sanitária [ANVISA], 2019; Sharma & Murugesan, 2017; Tembhare et al., 2019).

É indicado submeter às condições seguintes de degradação forçada: aquecimento, umidade, soluções ácida, básica e oxidante, exposição fotolítica e íons metálicos. A avaliação dos resultados deve contemplar uma análise do perfil de degradação, através da verificação da pureza cromatográfica do pico do IFA e a determinação dos fatores críticos que podem interferir na estabilidade do produto (Rao et al., 2015; Singh et al., 2013). O método analítico mais empregado para alcançar tais objetivos é a cromatografia líquida de alta eficiência com detector de ultravioleta por meio de arranjo de fotodiodos (CLAE-DAD), devido a versatilidade proporcionada, a partir da variação de seus componentes (fase móvel, coluna cromatográfica e outros parâmetros analíticos) é possível separar compostos estruturalmente diversificados (Maggio et al., 2013).

Recomenda-se para avaliação da qualidade e eficiência da separação cromatográfica do método, o monitoramento dos parâmetros de adequabilidade do sistema como a resolução, pureza de pico, assimetria e número de pratos teóricos. Uma limitação do emprego de CLAE-DAD, provém da possibilidade da formação de PDs que não possuem grupos cromóforos ou que são voláteis, por isso é importante avaliar o emprego de detectores alternativos com CLAE, como o espectrômetro de massas (EM), que possui a capacidade de fornecer informações estruturais inequívocas, uma vez sendo de alta resolução e a ressonância magnética nuclear (RMN), que também possui esta aplicação e pode auxiliar na diferenciação de PDs com grande similaridade estrutural como no caso de isômeros e epímeros (Maheswaran, 2012; Singh et al., 2013). O Quadro 6, contém os métodos, condições analíticas e tempos de retenção de RUT e QUERC, para avaliação da estabilidade da RUT nos diferentes meios degradantes.

Quadro 6. Descrição dos métodos analíticos aplicados para a determinação da estabilidade durante a avaliação físico-química em diferentes meios em que RUT foi submetida.

n°	Referência	Método	Condições analíticas	Tempo de retenção
1	Wojciak-Kosior et al. (2004)	Cromatografia de camada fina de alto desempenho (HPTLC)	*Fase estacionária: Placa de sílica 60 F ₂₅₄ Fase móvel: Acetato de etila: MeOH (90:10 v/v) com 0,1% de ácido fórmico. Comp.onda: 254 nm	Não se aplica
2	Wang et al. (2011)	CLAE-UV	Coluna: C18 (250 x 4,6 mm; 5,0 µm). Fase móvel (RUT): ACN: 0,02% de ácido fosfórico (20:80 v/v). Fase móvel (QUERC): ACN: tampão acetato de amônio pH 4,0 (27:73 v/v). Modo: isocrático. Fluxo: 1,0 mL/min. Temperatura: N/C. Comp.onda: N/C.	N/C
3	Zvezdanovic et al. (2012)	CLAE-DAD	Coluna: C18 (250 x 4,6 mm; 5,0 µm). Fase móvel: H ₂ O com 0,15% de H ₃ PO ₄ : MeOH (77:23 v/v) com 0,1% de ácido fórmico. Modo: isocrático. Fluxo: 1,0 mL/min. Temperatura: N/C. Comp.onda: 200-400 nm	RUT: 41 min QUERC: 55 min
4	Ravber et al. (2016)	CLAE-EM-ESI	Coluna: C18 (150 x 4,6 mm; 1,8 µm). Fase móvel: MeOH: H ₂ O com 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA). Modo: gradiente. Fluxo: 0,55 mL/min. Temperatura: N/C. Comp.onda: N/C. A detecção por EM, foi realizada em: Modo: ESI (+ e -). Scan: 60-650 m/z	RUT: 15,01 min QUERC: 16,98 min
5	Paczekowska et al. (2017)	UCLAE-DAD	Coluna: C18 (100 x 2,1 mm; 1,7 µm). Fase móvel: H ₂ O: ACN (80:20 v/v) com 0,1% de ácido fórmico. Modo: gradiente. Fluxo: 0,4 mL/min. Temperatura: N/C. Comp.onda: 353 nm	RUT: 1,1 min QUERC: 6,41 min

Legenda: * Em HPTLC, a coluna cromatográfica é substituída pela placa de sílica. Fonte: Autores, (2022).

Wojciak-Kosior et al. (2004) desenvolveram um estudo sobre a determinação densitométrica da cinética de hidrólise de flavonóides glicosídeos por cromatografia de camada fina de alto desempenho (HPTLC), método 1, do Quadro 6. Os autores investigaram o curso da hidrólise ácida destes ativos, entre eles a RUT em ácido clorídrico 1,5 M. RUT foi solubilizada em meio metanólico e submetida ao aquecimento por refluxo à 60°C, entre 15 min-105 min. Após submetidas a este processo, as amostras foram distribuídas em placas de vidro 10 x 10 cm, pré-revestidas com camadas de 0,25 mm de sílica gel, através de aplicador automático. A detecção foi realizada por UV (254 nm). Os pontos ou "manchas" formados nos densitogramas, que representam os flavonóides obtiveram qualidade, sem a presença de caudas. Neste trabalho, o densitograma representativo de RUT, demonstra ao longo do processo de hidrólise a redução da intensidade dos pontos das amostras. Em contrapartida, na mesma placa em posição perpendicular, verificou-se o surgimento de pontos que representavam QUERC, onde foi observado o aumento da intensidade. A degradação hidrolítica de RUT foi classificada como de primeira ordem, sendo iniciada após 45 min de aquecimento e quase totalizada, após aproximadamente 90 min. Os autores afirmaram que a cinética de degradação pode ocorrer em duas etapas, para isso seria necessário estudos complementares.

Wang et al. (2011) desenvolveram um estudo comparativo da degradação de RUT em meio ácido e por hidrólise enzimática, método 2 do Quadro 6. Neste trabalho analisou-se as condições de hidrólise de RUT, de modo que fosse otimizado a produção de isoquercitrina (ISOQUERC), um metabólito secundário encontrado de forma limitada em espécies vegetais e que pode ser obtido de forma economicamente mais viável, a partir da hidrólise de RUT. A ISOQUERC, possui ampla gama de atividades biológicas descritas (antioxidante, ateroprotetora, anti-inflamatória), entre outras e tem seu uso aprovado como aditivo alimentar pelas agências sanitárias americana e japonesa (Valentová et al., 2014). A avaliação crítica da produção de compostos secundários, após submissão de RUT em meio ácido, ainda que o objetivo principal não seja descrever a estabilidade de RUT, pode ser um norteador para a condução de testes de degradação forçada. Conforme a análise dos resultados obtidos é possível determinar os agentes degradantes, concentrações ideais, tempo de reação, elucidação das rotas de degradação e principais PDs formados.

Experimentalmente, observou-se o efeito dos ácidos (agentes catalisadores) em cinco concentrações diferentes, sendo que houve produção máxima de ISOQUERC, conforme as concentrações seguintes: ácido fosfórico (H_3PO_4 ; 2,5%), produziu 11,1% de QUERC e 9,6% de ISOQUERC, ácido clorídrico (HCl; 1%), produziu 100% de QUERC e 0,69% de ISOQUERC e ácido sulfúrico (H_2SO_4 ; 0,5%), produziu 2,57% de QUERC e 1,25% de ISOQUERC, a partir de soluções metanólicas de RUT, posteriormente diluídas com H_2O e pelo respectivo ácido, mantendo-se em banho-maria à 70°C, por 20 h com agitação eletromagnética (120 rpm). QUERC foi obtida facilmente pela hidrólise de RUT por HCl quando comparada com ISOQUERC, isso ocorre porque o segmento aglicona dos flavonóides são obtidos pela preferência de HCl em quebrar a ligação beta-D-glucoside de RUT, em detrimento da ligação alfa-L-rhamnoside. No caso do H_3PO_4 , em concentrações superiores à 2,5%, ocorre instabilidade e a concentração de QUERC e ISOQUERC formadas começa a diminuir. Já o H_2SO_4 , possui menor capacidade de catalisar hidrólise em altas concentrações em comparação ao H_3PO_4 , devido a oxidação do ácido pela polarização iônica, portanto ele se tornava mais seletivo para a degradação de RUT, quando diluído. O estudo mostrou que em hidrólise no meio ácido, RUT é facilmente deglicosilada para sua forma aglicona (QUERC), mas seu glicosídeo secundário (ISOQUERC) é obtido com maior dificuldade.

Zvezdanović et al. (2012) estudaram a degradação irreversível de RUT e QUERC em solução aquosa e metanólica, induzida por UV (UV-B e UV-C) e analisada através do método 3 do Quadro 6. O total de fluxo energético emitido foi de 10,5 $W.m^{-2}$ (UV-B) e 12,5 $W.m^{-2}$ (UV-C), com as amostras acondicionadas em cubetas de quartzo em suporte circular rotativo. As análises por espectrofotometria possibilitaram o acompanhamento da mudança do espectro de absorção devido a reatividade dos grupamentos químicos que compõem as moléculas de RUT e QUERC às radiações. De uma forma geral, a absorção espectral dos flavonóides está na faixa entre 240-400 nm. O anel B possui absorção máxima entre 350-370 nm e o sistema

benzoil A-C, entre 260-270 nm. Uma banda fraca em torno de 300 nm é atribuída apenas ao anel C. O efeito da radiação UV-B e UV-C contínua em QUERC e RUT, no meio metanólico promoveu uma queda gradual na intensidade de absorção. Esse resultado é reflexo da degradação de QUERC e RUT, que aumentou ao longo do tempo de irradiação. No entanto, RUT sofreu uma degradação mais lenta em comparação com a QUERC em MeOH. Segundo os autores, a partir desses dados é possível afirmar que a ausência dos grupos 3-OH em RUT, proporciona uma maior estabilidade. Em QUERC, a presença desses grupos, reduz a sua estabilidade frente à UVB-UVC.

Após as amostras serem submetidas as radiações foram observadas alterações na absorbância. Houve aumento entre 270 nm e 325 nm para QUERC, com um máximo em 295 nm para ambas as faixas (UV-B e UV-C). Esta alteração pode indicar a formação de PDs. Por esse motivo o comprimento de onda em 295 nm foi escolhido para monitorar as alterações das amostras de QUERC e RUT via CLAE-DAD. Para RUT irradiada por UV-C em MeOH e H₂O, essa alteração não foi tão evidente.

A irradiação de QUERC em MeOH por UV-C, em 30 min e UV-B em 120 min, resultou no decaimento de 95% e 50% do teor de QUERC, respectivamente e a formação de quatro produtos de degradação principais. Os autores propuseram as possíveis estruturas dos PDs, comparando seus espectros de absorção com outros disponíveis na literatura, relacionadas a diferentes métodos de oxidação de QUERC. Os PDs 1 e 3 tem máxima absorbância em 294 nm e 300 nm, respectivamente e podem ser resultantes da oxidação eletroquímica de QUERC em ácido di-hidroxi-fenil-glioxílico (PD 1), originado da abertura do anel C e ácido tri-hidroxi-fenil-glioxílico (PD 3), formado a partir de um rearranjo molecular, obtendo-se uma estrutura fechada tipo furano com apenas uma dupla ligação. PD 2 possui três bandas com absorbância máxima em 236 nm, 294 nm e 325 nm e o PD 4 tem duas bandas com absorbância máxima em 275 nm e 297 nm, ambos tiveram sua formação sugerida pela abertura do anel C, com consequente rearranjo molecular resultando na formação de 2-(3,4-dihidroxibenzoil)-2,4,6-trihidroxil-3(2H)-benzofuranona (PD 2) e estabilização da molécula para formar metil 2-{2-[(3,4-dihidroxibenzoil) oxi]-4,6-dihidroxifenil}-2-oxoacetato (PD 4).

Para a RUT, a irradiação em meio metanólico e aquoso por UV-C, durante 90 min, resultou em um decaimento de cerca de 85% e 30% do teor inicial de RUT, respectivamente e houve a formação de dois PDs. O PD 1 formado em meio metanólico, teve espectro de absorbância máximo em 287 nm. O PD 2 formado em meio aquoso, teve espectro com duas bandas de absorbância máxima, em 253 nm a mais intensa e 298 nm. RUT foi mais susceptível à UV-C em meio metanólico, devido a maior solubilidade de oxigênio em MeOH e menor viscosidade deste, em comparação com a água. Os autores não sugeriram estruturas para os possíveis PDs formados e afirmaram que apesar da degradação ser praticamente incontestável, os possíveis mecanismos de reação são questionáveis e raramente publicados. Apesar desta informação, este trabalho descreve que os seis PDs formados, têm em semelhança uma clara ausência da banda 1 dos flavonóides, atribuída ao anel B do sistema AC-B. Foi sugerido que a estrutura dos flavonóides foi irreversivelmente decomposta e provavelmente em moléculas de tamanho menor.

Ravber et al. (2016) avaliaram a estabilidade hidrotérmica e definiram a cinética e a via de degradação da RUT, em água subcrítica na faixa de temperatura entre 120-220°C, por 2 horas. As amostras foram armazenadas em reatores sob altas pressões em atmosferas de diferentes gases: nitrogênio (N₂) e dióxido de carbono (CO₂), posteriormente analisadas pelo método 4 do Quadro 6. Ao analisar as amostras degradadas foram identificados sete PDs: PD 1 = 309 m/z com alta intensidade, correspondente a QUERC. PD 2 = 153 m/z, de menor intensidade, referente ao ácido 3,4-dihidroxibenzóico, como provável PD da QUERC. PD 3 = 183 m/z e PD 4 = 165 m/z, correspondem ao 2-hidroxi-1-(2,4,6-tri-hidroxifenil) etanona; 4,6-di-hidroxi-3-benzofuranona, respectivamente, sendo o último originado a partir da perda de uma molécula de H₂O de PD 3 e 5-metilfurfural (5-MF), produto da desidratação da unidade de rhamnose, corresponde a estrutura do PD 5 = 109 m/z,

confirmada após a sua separação e isolamento para posterior caracterização via ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN H^1).

Com menor intensidade foi observado o PD 6 = 109 m/z, que corresponde ao anel catecol formado da descarboxilação de PD 2. Por fim, foi identificado o PD 7 = 125 m/z, correspondente ao 5-hidroxi-metilfurfural (5-HMF), sendo este segundo os autores, derivado da unidade de glicose pertencente a isoquercetina, após o processo de desidratação. Os resultados deste estudo demonstraram que o 5-metilfurfural (5-MF), um agente flavorizante, bastante utilizado na indústria alimentícia (Xu et al., 2021) pode ser obtido de forma ambientalmente sustentável via degradação hidrotérmica da RUT se comparado com outros métodos de síntese que utilizam componentes altamente tóxicos. RUT ao ser degradada em QUERC obedeceu a uma cinética de primeira ordem. Na análise da cinética de degradação observou-se que RUT degrada-se mais rapidamente em meio hidrotérmico em CO_2 . Esta maior reatividade ocorre devido a formação de ácido carbônico, que reduz o pH do meio aquoso e favorece a catalização de RUT. No entanto, em temperaturas mais altas, a formação dos PDs 2 e 6 são promovidos quando N_2 é utilizado.

Paczkowska et al. (2017) desenvolveram um MIE, método 5 do Quadro 6, para avaliar a estabilidade do IFA de RUT, bem como em produtos para suplementação alimentar que incorporam o ativo. Dentre os artigos disponíveis na literatura, este é o mais abrangente em relação a extensão dos testes de degradação forçada ao qual a RUT foi submetida, como preconizado pelos guias e resoluções das agências regulatórias de vigilância sanitária internacionais. Foi estudada a susceptibilidade da RUT, através da degradação em soluções e no estado sólido. A avaliação da estabilidade, cinética e termodinâmica da degradação de RUT foi conduzida pela submissão das amostras em solução a hidrólise ácida, básica e oxidação nas seguintes condições: ácido clorídrico (0,5 mol/L), entre 50-80°C, hidróxido de sódio (0,2 mol/L), entre 30-45°C e H_2O_2 (25%) à 80°C, respectivamente. As amostras em estado sólido foram submetidas a temperaturas elevadas (umidade relativa = 0% e superior à 50%) para análise da termólise e exposição à radiação UV (300-400 nm), em uma iluminação geral de aproximadamente 210 wh/m², por 24 h para determinação da fotodegradação.

No desenvolvimento do MIE, foram utilizados os padrões de RUT e suas principais impurezas: ISOQUERC e QUERC. Foi enfatizado a qualidade cromatográfica obtida a partir da avaliação da adequabilidade do sistema, para RUT, ISOQUERC e QUERC, através dos parâmetros: resolução (superior à 1,0 para todos os picos separados e relacionados), fator de cauda de 1,35; 1,13 e 1,35 e número de pratos teóricos de 4.780; 3.365; 25.632, respectivamente. Os tempos de retenção dos ativos, conforme sequência anterior foram: 1,10 min; 1,44 min e 6,41 min, portanto o MIE mostrou-se rápido, com todos os componentes separados em tempo inferior à 10 min. Esses aspectos são importantes para determinação da aplicabilidade do método na rotina analítica para detecção de RUT e seus PDs, em IFA ou no produto acabado, neste caso os suplementos dietéticos.

Em relação aos testes de degradação forçada, segundo os autores RUT mostrou-se instável em todas as condições testadas. Apesar desta afirmação, o trabalho apresenta apenas o cromatograma que representa a hidrólise ácida (HCl 0,5 M; 80°C), em que a QUERC foi o único PD formado. Também foi avaliada a cinética de degradação de RUT em meio ácido e básico, sendo classificada de primeira ordem para ambas, sob diferentes concentrações de RUT e temperaturas do meio racional (44,85°C-79,85°C). Segundo os autores, a confirmação dos diferentes mecanismos de degradação da RUT durante a hidrólise ácido-básica está indicada pela determinação da entropia da reação com sinais opostos, sendo negativa para a hidrólise ácida e positiva para a hidrólise básica. Um valor negativo de entropia pode indicar um caráter bimolecular da degradação. A formação de QUERC foi predominante em meio ácido devido a susceptibilidade a hidrólise da ligação glicosídica entre a estrutura chromen e o anel mano/gluco-piranosil. A falta de grupamentos cromóforos nos PDs formados resultantes da hidrólise básica, sugere vias de degradação multidirecionais. A temperatura pode ser um fator contribuinte para a degradação em multidireções e teve uma influência mais acentuada na degradação básica.

Encorajamos os pesquisadores que porventura reproduzam este método, que seja realizada uma varredura em outros comprimentos de onda de UV para leitura das amostras degradadas, uma vez que pode haver diferença entre o comprimento de onda ótimo do ativo em comparação aos seus PDs, antes de propor modificações nas condições analíticas para tentar reter outros PDs. Esse direcionamento é pertinente, em virtude das publicações antecedentes mencionarem outros PDs, mesmo as amostras sendo submetidas em ambiente químico diferente daquele proposto para a condução dos testes de degradação forçada e RUT possuir uma rota de degradação composta de uma série de intermediários de reação, cabe através de uma análise de balanço de massas (BM) avaliar a capacidade que o método possui em recuperar os PDs formados, seja através da promoção de ajustes no método desenvolvido ou utilização de técnicas complementares como a espectrometria de massas, cromatografia gasosa entre outras, para tentar restituir de forma mais fidedigna o BM para ampliar nossa perspectiva através da detecção de PDs que possuam retenção limitada em razão das interações com a coluna cromatográfica ou que são efêmeros devido a sua reatividade química ou volatilidade (Maheswaran, 2012; Rawat & Pandey, 2015; Riddhiben et al., 2011). No desenvolvimento do MIE, o analista deve fazer a reflexão se a ferramenta analítica em questão atinge o objetivo pretendido e detém a qualidade para os outros parâmetros como: especificidade, precisão, robustez; mesmo quando um BM com alta recuperação não é atingido. Para fins de registro, as dificuldades encontradas podem ser indicadas para avaliação das autoridades sanitárias que definirão se os possíveis PDs não detectados pelo MIE, poderão comprometer a segurança e eficácia do produto (Bakshi & Singh, 2002; Sengupta et al., 2018).

4. Considerações Finais

Apesar da RUT, compor um extenso rol de produtos para suplementação alimentar e de forma mais específica para medicamentos e ter um potencial promissor para a composição de futuras formulações, em virtude de seu amplo arsenal terapêutico demonstrado em pesquisas discutidas anteriormente, existe na literatura uma lacuna em relação a descrição da estabilidade físico-química destes produtos disponíveis comercialmente. Embora as agências regulatórias de vigilância sanitária de cada país exijam a realização dos estudos de estabilidade para o registro dos produtos com finalidade medicamentosa, esses dados obtidos nas indústrias não transpõem os relatórios de estabilidade para literatura científica dificultando a construção de um histórico disponível que poderia nortear de forma mais eficiente o desenvolvimento de novas formulações. A partir dos artigos analisados, foi realizada uma retrospectiva a respeito do estado da arte da estabilidade de RUT, frente a otimização de processos de extração em derivados vegetais, desenvolvimento de sistemas de liberação e avaliação físico-química em diferentes meios.

Ainda assim, novas ferramentas analíticas podem ser desenvolvidas para obtermos dados já conhecidos de forma mais eficiente e avançarmos em questões ainda não totalmente elucidadas como: a estrutura dos PDs gerados e seus mecanismos de formação, durante os estudos de degradação forçada, que são a base para o desenvolvimento de métodos robustos, capazes de detectar, quantificar e identificar PDs durante os estudos de estabilidade acelerado, de longa duração e de acompanhamento que seguem parâmetros específicos de temperatura e umidade para armazenamento e são fundamentais para projeção do prazo de validade de um determinado produto, bem como norteadores dos potenciais riscos toxicológicos advindos da formação de compostos nocivos à saúde. Por fim, a partir desse panorama é possível preconizar controles físico-químicos, orientar o acréscimo de adjuvantes farmacotécnicos ou até mesmo propor o desenvolvimento de novos sistemas que possam colaborar com a formulação de produtos mais estáveis e seguros para serem administrados.

Conforme discutido, diante da diversidade de métodos analíticos desenvolvidos para avaliação da estabilidade de rotina, encorajamos que o planejamento das novas ferramentas analíticas, baseadas na técnica de cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD), seja compatível ao acoplamento com a espectrometria de massas (EM). A obtenção dessa característica abrange uma discussão que vai além do escopo do trabalho, porém a definição da

composição da fase móvel e do tipo de tampão, caso seja utilizado são imprescindíveis. A CLAE-DAD, possui a capacidade de separar de forma eficaz o IFA e seus produtos de degradação e a EM oferece informações que são utilizadas para sugerir as estruturas químicas dos PDs formados. Ambas fornecem dados quantitativos de forma eficaz. Portanto, o acoplamento fornece uma ferramenta versátil. Para auxiliar na sugestão do *locus* de ataque do agente degradante na estrutura molecular e as possíveis rotas de degradação, que por vezes são complexas e multidirecionais, métodos *in silico*, através da modelagem molecular são capazes de calcular de forma precisa, as regiões de maior instabilidade na molécula e podem ser utilizados para corroborar os dados obtidos experimentalmente. Antes de promover qualquer modificação (composição de fase móvel, troca de coluna, temperatura) no método por CLAE-DAD, devido a decomposição do IFA e não detecção dos PDs formados, recomenda-se a verificação do comprimento de onda ótimo de absorvância no UV para os PDs, que pode ser alterado, em relação ao valor utilizado como referência para leitura do IFA. Isso ocorre porque alguns grupos cromóforos podem ser modificados frente ao ataque dos agentes degradantes. Um método analítico ideal para análise da estabilidade da RUT, deve ser capaz de separar e identificar o IFA e seus PDs, nos diferentes testes de degradação forçada: hidrólise ácida e básica, oxidação, fotólise e exposição aos íons metálicos, com variações nos parâmetros de temperatura e umidade, conforme orientado pelos guias internacionais, exceto se houver determinada incompatibilidade técnica justificada.

Referências

- Abubakar, A. R., & Haque, M. (2020). Preparation of medicinal plants: Basic extraction and fractionation procedures for experimental purposes. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 12(1), 1–10. https://doi.org/10.4103/jpbs.JPBS_175_19
- Ahmad, H., Arya, A., Agrawal, S., Mall, P., Samuel, S. S., Sharma, K., Singh, P. K., Singh, S. K., Valicherla, G. R., Mitra, K., Gayen, J. R., Paliwal, S., Shukla, R., & Dwivedi, A. K. (2016). Rutin phospholipid complexes confer neuro-protection in ischemic-stroke rats. *RSC Advances*, 6(99), 96445–96454. <https://doi.org/10.1039/c6ra17874j>
- Almeida, J. S., Lima, F., Ros, S. D., Bulhões, L. O. S., de Carvalho, L. M., & Beck, R. C. R. (2010). Nanostructured Systems Containing Rutin: In Vitro Antioxidant Activity and Photostability Studies. *Nanoscale Research Letters*, 5(10), 1603–1610. <https://doi.org/10.1007/s11671-010-9683-1>
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária [ANVISA]. (2019). Resolução RDC nº 318, de 6 de novembro de 2019. Dispõe sobre os critérios para a realização dos estudos de estabilidade de insumos farmacêuticos ativos e medicamentos exceto biológicos, e dá outras providências. *Diário Oficial da União*, Seção 1 (216), 97. <http://www.in.gov.br/web/dou/-/resolucao-rdc-318-6-de-novembro-de-2019-226513805>.
- Asfour, M. H., & Mohsen, A. M. (2018). Formulation and evaluation of pH-sensitive rutin nanospheres against colon carcinoma using HCT-116 cell line. *Journal of Advanced Research*, 9, 17–26. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2017.10.003>
- Bachelor, B. L., & Yang, X. (2019). Rutin-loaded cellulose acetate / poly (ethylene oxide) fiber membrane fabricated by electrospinning: A bioactive material. *Materials Science & Engineering C*, 109. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110601>
- Bakshi, M., & Singh, S. (2002). Development of validated stability- indicating assay methods: Critical review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 28, 1011–1040. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(02\)00047-X](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(02)00047-X)
- Basaran, E., Ozturk, A. A., Senel, B., Demirel, M., & Sarica, Ş. (2022). Quercetin, Rutin and Quercetin-Rutin Incorporated Hydroxypropyl β-Cyclodextrin Inclusion Complexes. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 172. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2022.106153>
- Becho, J. R. M., Machado, H., & Guerra, M. de O. (2009). Rutina – Estrutura , Metabolismo E Potencial. *Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais*, 1(1), 21–25.
- Belcaro, G., Cesarone, M. R., Ledda, A., Cacchio, M., Ruffini, I., Ricci, A., Ippolito, E., Renzo, A. di, Dugall, M., Corsi, M., Rita, A., Santarelli, M., Grossi, M. G., Ippolito, E., Renzo, A. di, Dugall, M., Corsi, M., Rita, A., Santarelli, M., & Grossi, M. G. (2008). Angiology and Local Treatment in Chronic Venous Disease and Microangiopathy. *Angiology*, 59. <https://doi.org/10.1177/0003319707312021>
- Biesaga, M. (2011). Influence of extraction methods on stability of flavonoids. *Journal of Chromatography A*, 1218(18), 2505–2512. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.02.059>
- Blessy, M., Patel, R. D., Prajapati, P. N., & Agrawal, Y. K. (2014). Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs - A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 4(3), 159–165. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2013.09.003>
- Cesarone, M. R., Belcaro, G., Pellegrini, L., Ledda, A., di Renzo, A., Vinciguerra, G., Ricci, A., Gizzi, G., Ippolito, E., Fano, F., Dugall, M., Acerbi, G., & Cacchio, M. (2005). HR, 0-(beta-hydroxyethyl)-rutosides, in comparison with diosmin+hesperidin in chronic venous insufficiency and venous microangiopathy: An independent, prospective, comparative registry study. *Angiology*, 56(1), 1–8. <https://doi.org/10.1177/000331970505600101>
- Chen, W., Li, P., & Wang, X. (2010). Chemical stability of yellow pigment extracted from the flower bud of *Sophora japonica* L. (Huaimi). *International Journal of Food Science and Technology*, 45(8), 1666–1672. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2010.02322.x>

- Chéron, N., Chenchen, Y., Kolawole, A. O., Shakhnovich, E. I., & Wobus, C. E. (2015). Repurposing of rutin for the inhibition of norovirus replication. *Archives Virology*, 160(9), 2353–2358. <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2495-y>
- Cosco, D., Failla, P., Costa, N., Pullano, S., Fiorillo, A., Mollace, V., Fresta, M., & Paolino, D. (2016). Rutin-loaded chitosan microspheres: Characterization and evaluation of the anti-inflammatory activity. *Carbohydrate Polymers*, 152, 583–591. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.06.039>
- Cronin, M. A., & George, E. (2020). The Why and How of the Integrative Review. *Rigorous and Impactful Literature Reviews*, 1–25. <https://doi.org/10.1177/1094428120935507>.
- Dammak, I., & Sobral, P. J. do A. (2018). Investigation into the physicochemical stability and rheological properties of rutin emulsions stabilized by chitosan and lecithin. *Journal of Food Engineering*, 229, 12–20. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.09.022>
- Dawidowicz, A. L., Bernacik, K., & Typek, R. (2016). Rutin Transformation During Its Analysis Involving Extraction Process for Sample Preparation. *Food Analytical Methods*, 9(1), 213–224. <https://doi.org/10.1007/s12161-015-0170-2>
- de Oliveira, J. H. P., Arruda, I. E. S., Araújo, J. I. R., Chaves, L. L., de La Rocca Soares, M. F., & Soares-Sobrinho, J. Lamartine. (2022). Why do few drug delivery systems to combat neglected tropical diseases reach the market? An analysis from the technology's stages. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 32(1), 89–114. <https://doi.org/https://doi.org/10.1080/13543776.2021.1970746>
- Geçotek, A., Domingues, P., & Skrzydlewska, E. (2018). Proteins involved in the antioxidant and inflammatory response in rutin-treated human skin fibroblasts exposed to UVA or UVB irradiation. *Journal of Dermatological Science*, 90(3), 241–252. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2018.02.002>
- Ghanbari-Movahed, M., Mondal, A., Farzaei, M. H., & Bishayee, A. (2022). Quercetin- and rutin-based nano-formulations for cancer treatment: A systematic review of improved efficacy and molecular mechanisms. *Phytomedicine*, (97). Elsevier GmbH. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2021.153909>
- Gullón, B., Lú-Chau, T. A., Moreira, M. T., Lema, J. M., & Eibes, G. (2017). Rutin: A review on extraction, identification and purification methods, biological activities and approaches to enhance its bioavailability. *Trends in Food Science and Technology*, 67, 220–235. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.07.008>
- Islam, N. (2015). Investigation of comparative shielding of Morin against oxidative damage by radicals: A DFT study Investigation of comparative shielding of Morin against oxidative damage by radicals: A DFT study. *Cogent Chemistry*, 42(1). <https://doi.org/10.1080/23312009.2015.1078272>.
- Koyu, H., & Haznedaroglu, M. Z. (2015). Investigation of impact of storage conditions on Hypericum perforatum L. dried total extract. *Journal of Food and Drug Analysis*, 23(3), 545–551. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2015.04.002>
- Kunle, O. F., Egharevba, H. O., & Ahmadu, P. O. (2012). Standardization of herbal medicines - A review. *International Journal of Biodiversity and Conservation*, 4(3). <https://doi.org/10.5897/ijbc11.163>
- Lipkovskaya, N. A., Barvinchenko, V. N., Fedyanina, T. v., & Rugal', A. A. (2014). Physicochemical properties of quercetin and rutin in aqueous solutions of decamethoxin antiseptic drug. *Russian Journal of Applied Chemistry*, 87(1), 36–41. <https://doi.org/10.1134/S1070427214010054>
- Liu, Y., Romijn, E. P., Verniest, G., Laukens, K., & Vijlder, T. de. (2019). Mass spectrometry-based structure elucidation of small molecule impurities and degradation products in pharmaceutical development. *Trends in Analytical Chemistry*, 121. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.115686>
- Lukšič, L., Bonafaccia, G., Timoracka, M., Vollmannova, A., Trček, J., Nyambe, T. K., Melini, V., Acquistucci, R., Germ, M., & Kreft, I. (2016). Rutin and quercetin transformation during preparation of buckwheat sourdough bread. *Journal of Cereal Science*, 69, 71–76. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2016.02.011>
- Maggio, R. M., Vignaduzzo, S. E., & Kaufman, T. S. (2013). Practical and regulatory considerations for stability-indicating methods for the assay of bulk drugs and drug formulations. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 49, 57–70. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.05.008>
- Maheswaran, R. (2012). FDA Perspectives: Scientific Considerations of Forced Degradation Studies in ANDA Submissions. *Pharmaceutical Technology*, 36(5), 1–6.
- Mascaraque, C., Aranda, C., Ocón, B., Jesús, M., Dolores, M., Zarzuelo, A., Juan, J., Marín, G., Martínez-augustin, O., Sánchez, F., & Medina, D. (2014). Rutin has intestinal antiinflammatory effects in the CD4 + CD62L + T cell transfer model of colitis. *Pharmacological Research*, 90, 48–57. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2014.09.005>
- Nafi, M. O., Hamid, A. A., Muritala, H. F., & Adeyemi, S. B. (2017). Preparation, Standardization, and Quality Control of Medicinal Plants in Africa. *Medicinal Spices and Vegetables from Africa: Therapeutic Potential Against Metabolic, Inflammatory, Infectious and Systemic Diseases*, 171–204. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809286-6.00007-8>
- Nassiri-asl, M., Farivar, T. N., Abbasi, E., & Sadeghnia, H. R. (2013). Effects of rutin on oxidative stress in mice with kainic acid - induced seizure. *Journal of Integrative Medicine*, 11(5), 337–342. <https://doi.org/10.3736/jintegrmed2013042>
- National Institutes of Health. (2020). Products which contain Rutin anywhere on the label. *Dietary Supplement Label Database*. <https://dslid.od.nih.gov/dslid/rptQSearch.jsp?item=rutin&db=adslid>
- Nguyen, T. A., Liu, B., Zhao, J., Thomas, D. S., & Hook, J. M. (2013). An investigation into the supramolecular structure, solubility, stability and antioxidant activity of rutin/cyclodextrin inclusion complex. *Food Chemistry*, 136(1), 186–192. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.07.104>
- Paczkowska, M., Zalewski, P., Krause, A., Mroczkowska, M., Gózdź, N., & Cielecka-Piontek, J. (2017). Kinetic of rutin degradation and its determination in dietary supplements. *Current Pharmaceutical Analysis*, 13(2), 123–130. <https://doi.org/10.2174/1573412912666160927112436>
- Pandey, A., & Tripathi, S. (2014). Concept of standardization, extraction and pre phytochemical screening strategies for herbal drug. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2(5).
- Peng, L., Yuan, M., Cui, Z., Wu, Z., Yu, Z., & Song, K. (2018). Rutin inhibits quorum sensing, biofilm formation and virulence genes in avian pathogenic Escherichia coli. *Microbial Pathogenesis*, 119, 54–59. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.04.007>

- Qiao, L., Sun, Y., Chen, R., Fu, Y., Zhang, W., Li, X., Chen, J., Shen, Y., & Ye, X. (2014). Sonochemical effects on 14 flavonoids common in citrus: Relation to stability. *PLOS ONE*, 9(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087766>
- Rao, B. V., Sowjanya, G. N., Ajitha, A., & Rao, V. U. M. (2015). a Review on Stability Indicating Hplc Method Development. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4(08), 405–423.
- Ravber, M., Pecar, D., Gorsek, A., Iskra, J., Knez, Ž., & Skerget, M. (2016). Hydrothermal Degradation of Rutin: Identification of Degradation Products and Kinetics Study. *Agricultural and Food Chemistry*, 64, 9196–9202. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b03191>
- Rawat, T., & Pandey, I. P. (2015). Forced degradation studies for drug substances and drug products- scientific and regulatory considerations. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 7(5), 238–241.
- Riddhiben, P., Piyushbhai, P., Natubhai, P., & Shah, S. B. M. (2011). Stability indicating HPLC method development- a review. *International Research Journal of Pharmacy*, 2(25), 79–87.
- Rizwan, F., Laiyla, S., Iram, A., & Ali Talha, K. (2019). Therapeutic and Adverse Effects of Commonly Used Medicinal Plants: Standardization and Quality Assurance. *Pakistan Academy of Sciences*, 56(SPECIAL), 1–9.
- Saha, S., & Mishra, A. (2020). A facile preparation of rutin nanoparticles and its effects on controlled growth and morphology of calcium oxalate crystals. *Journal of Crystal Growth*, 540. <https://doi.org/10.1016/j.jcrysgro.2020.125635>
- Savic, I. M., Savic-Gajic, I. M., Nikolic, V. D., Nikolic, L. B., Radovanovic, B. C., & Milenkovic-Andjelkovic, A. (2016). Enhancemnet of solubility and photostability of rutin by complexation with beta-cyclodextrin and (2-hydroxypropyl)-beta-cyclodextrin. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 86(1–2), 33–43. <https://doi.org/10.1007/s10847-016-0638-8>
- Sengupta, P., Chatterjee, B., & Tekade, R. K. (2018). Current regulatory requirements and practical approaches for stability analysis of pharmaceutical products: A comprehensive review. *International Journal of Pharmaceutics*, 543(1–2), 328–344. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.04.007>
- Sharma, M. K., & Murugesan, M. (2017). Forced Degradation Study an Essential Approach to Develop Stability Forced Degradation Study an Essential Approach to Develop Stability Indicating Method. *Journal of Chromatographic Separation Techniques*, 8(1), 1–4. <https://doi.org/10.4172/2157-7064.1000349>
- Silva, K. E. R., Alves, L. D. S., Soares, M. F. R., Passos, R. C. S., Faria, A. R., & Rolim Neto, P. J. (2009). Modelos de avaliação da estabilidade de fármacos e medicamentos para a indústria farmacêutica. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 30(2), 129–135. <https://doi.org/1808-4532>
- Silveira, D. T., & Córdova, F. P. (2009). A pesquisa científica. *Métodos de pesquisa*. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2009. p. 33–44.
- Silveira, T. F., Meinhart, A. D., Sallus, C. A., & Godoy, H. T. (2014). The effect of the duration of infusion, temperature, and water volume on the rutin content in the preparation of mate tea beverages: An optimization study. *Food Research International*, 60(SI), 241–245. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.09.024>
- Singh, S., Junwal, M., Modhe, G., Tiwari, H., Kurmi, M., Parashar, N., & Sidduri, P. (2013). Forced degradation studies to assess the stability of drugs and products. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 49, 71–88. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.05.006>
- Souza, M. T. D., Silva, M. D. D., & Carvalho, R. D. (2010). Integrative review: what is it? How to do it?. *Einstein (São Paulo)*, 8, 102–106.
- Tembhare, E., Gupta, K. R., & Umekar, M. J. (2019). An Approach to Drug Stability Studies and Shelf-life Determination. *Archives of Current Reserach International*, 19(1), 1–20. <https://doi.org/10.9734/ACRI/2019/v19i130147>
- Valentová, K., Vrba, J., Bancířová, M., Ulřichová, J., & Křen, V. (2014). Isoquercitrin: Pharmacology, toxicology, and metabolism. *Food and Chemical Toxicology*, 68, 267–282. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.03.018>
- Wang, J., Zhao, L.-L., Sun, G.-X., Liang, Y., Wu, F.-A., Chen, Z.-L., & Cui, S.-M. (2011). A comparison of acidic and enzymatic hydrolysis of rutin. *African Journal of Biotechnology*, 10(8), 1460–1466. <https://doi.org/10.5897/AJB10.2077>
- Wojciak-Kosior, M., Matysik, G., & Skalska, A. (2004). Densitometric determination of kinetics of hydrolysis of flavonoid glycosides. *Journal of Planar Chromatography*, 17(4), 286–289. <https://doi.org/10.1556/JPC.17.2004.4.8>
- Xu, J., Miao, X., Liu, L., Wang, Y., & Yang, W. (2021). Direct Synthesis of 5-Methylfurfural from d-Fructose by Iodide-Mediated Transfer Hydrogenation. *ChemSusChem*, 14(23), 5311–5319. <https://doi.org/10.1002/cssc.202102021>
- Zhou, D., Porter, W. R., Zhang, G. G. Z., Park, A., & States, U. (2017). Drug Stability and Degradation Studies. *Developing Solid Oral Dosage Forms*, 113–150. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802447-8.00005-4>
- Zvezdanović, J. B., Stanojević, J. S., Marković, D. Z., & Cvetković, D. (2012). Irreversible UV-induced quercetin and rutin degradation in solution studied by UV spectrophotometry and HPLC chromatography. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 77(3), 297–312. <https://doi.org/10.2298/JSC110618180Z>