

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E**  
**SINTÉTICOS BIOATIVOS**

**Ana Caroline Meneses Ferreira Veras**

**Atividade espasmolítica da nova fórmula de um medicamento  
fitoterápico- Funchicórea®, pó - Ensaio Farmacológico de  
Estabilidade para Controle de Qualidade Biológico –**

**João Pessoa-PB**

**2022**

**Ana Caroline Meneses Ferreira Veras**

**Atividade espasmolítica da nova fórmula de um medicamento  
fitoterápico- Funchicórea®, pó - Ensaio Farmacológico de  
Estabilidade para Controle de Qualidade Biológico –**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos.

**Área de concentração: Farmacologia.**

**Orientador: Profº. Drº. Isac Almeida de Medeiros**

**João Pessoa-PB**

**2022**



## PgPNSB

Pós Graduação em Produtos Naturais  
e Sintéticos Bioativos

Ata da 465ª (quadringentesima sexagésima quinta) Dissertação de Mestrado da aluna do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos **Ana Caroline Meneses Ferreira Veras**, candidata ao Título de "Mestre" em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos na área de concentração Farmacologia.

Às nove horas (09h00) do dia trinta e um de agosto do ano de dois mil e vinte e dois (31/08/2022), no auditório do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos da Universidade Federal da Paraíba, reuniram-se em caráter de Solenidade Pública os membros da Comissão designada para examinar a aluna **Ana Caroline Meneses Ferreira Veras**, candidata ao Título de "MESTRE" em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos na área de concentração Farmacologia. Foram componentes da Comissão Examinadora os pesquisadores Thyago Moreira de Queiroz, Ph.D em Farmacologia, Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz, Ph.D em Farmacologia e Isac Almeida de Medeiros, Ph.D em Farmacologia dos Medicamentos Cardiovasculares. Sendo o primeiro, integrante do corpo docente da Universidade Federal de Pernambuco e os demais, integrantes do corpo docente da Universidade Federal da Paraíba. Dando início aos trabalhos, o Presidente da Comissão, professor Isac Almeida de Medeiros, após declarar os objetivos da reunião, apresentou a candidata **Ana Caroline Meneses Ferreira Veras**, a quem concedeu a palavra para que dissertasse oral e sucintamente sobre o tema apresentado e intitulado "Atividade espasmolítica da nova fórmula de um medicamento fitoterápico- Funchicórea®, pó – Ensaio Farmacológico de Estabilidade para Controle de Qualidade Biológico –". Após discorrer sobre o referido tema durante cerca de quarenta minutos, a candidata foi arguida pelos examinadores na forma regimental. Em seguida, passou a comissão, em caráter secreto, a proceder à avaliação e julgamento do trabalho, concluindo por atribuir-lhe o conceito APROVADA. Em face da aprovação, declarou o Presidente achar-se a examinada **Ana Caroline Meneses Ferreira Veras** legalmente habilitada a receber o Título de "MESTRE" em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, na área de concentração Farmacologia, cabendo a Universidade Federal da Paraíba, providências, como de direito, a expedição do Diploma que a mesma faz jus. Nada mais havendo a tratar, foi lavrada a presente ata que é abaixo assinada pelos membros da Comissão e pelo(a) discente.

*Isac Almeida de Medeiros*  
Prof. Dr. Isac Almeida de Medeiros (Orientador)

*Thyago M. de Queiroz*  
Prof. Dr. Thyago Moreira de Queiroz (Examinador)

*Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz*  
Prof.ª Dr.ª Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz (Examinadora)

*Ana Caroline M. S. Veras*  
Ana Caroline Meneses-Ferreira Veras (Discente)



**Catálogo na publicação**  
**Seção de Catalogação e Classificação**

V476a Veras, Ana Caroline Meneses Ferreira.  
Atividade espasmolítica da nova fórmula de um medicamento fitoterápico- Funchicórea®, pó : ensaio farmacológico de estabilidade para controle de qualidade biológico ? / Ana Caroline Meneses Ferreira Veras. - João Pessoa, 2022.  
43 f. : il.

Orientação: Isac Almeida de Medeiros.  
Dissertação (Mestrado) - UPPB/CCS.

1. Antioxidante. 2. Atividade Espasmolítica. 3. Trato gastrointestinal. 4. Controle biológico. 5. Funchicórea®. I. Medeiros, Isac Almeida de. II. Título.

UPPB/BC

CDU 678.048(043)

*“Em tudo daí graças, porque esta é a vontade de Deus em  
Cristo Jesus para convosco.”*

1Tes 5,18

---

---

# *Dedicatória*

---

---

Dedico essa dissertação a  
minha mãe, Girlene Meneses,  
que é o maior motivo de ter  
conseguido chegar aqui hoje.

# *Agradecimientos*

---

---

Primeiramente agradeço a Deus pelo dom da vida, por nunca ter me abandonado. Sem Ele seria impossível suportar todo esse processo.

A mulher da minha vida, minha mãe, que é minha fortaleza e tudo de mais importante que tenho. Obrigada por sua dedicação exclusiva de anos para que conseguisse conquistar tudo que almejo.

A minha estrela guia, meu pai, que apesar da sua ausência física sei que de onde ele está sempre zelou por mim.

Ao meu irmão, João Carlos, que me ensina muito desde que nasceu a dividir as coisas mais importantes da vida e ser mais paciente.

A minha avó, Maria, que sempre foi apoio em tudo que eu faço, que do seu jeito um pouco bruto sempre me deu amor, boas risadas, inúmeros conselhos para vida e sempre reza por mim.

Ao meu pai/tio, Girlando, que assumiu com toda maestria o papel do meu pai e sempre me incentivou, me ensinando ser uma pessoa melhor.

Aos meus tios, Gerlane e George, que sempre estiveram presentes na minha vida. Sempre preocupados comigo e dispostos a fazer de tudo por mim.

A minha prima/irmã, Anne Alicia, que sempre esteve ao meu lado dividindo todas as angústias e alegrias da vida. Obrigada por ser tanto. Você sabe que é meu tesourinho e uma das pessoas mais importantes que tenho na vida.

Aos meus primos, Letícia, João Fablício e João Gabriel, que me ensinam todos os dias a amar ainda mais e são força para que eu siga em frente e também possa ensinar a eles um pouco sobre os caminhos a se trilhar na vida.

A esposa do meu tio George, Daniela, que me acolheu em sua casa, me deu muito amor e educou. Obrigada por tudo.

A toda família Ferreira, em nome de Madalena, Danielly e Juscelino, obrigada por acolherem aquela menina que aos 14 anos saía de casa para vim morar na capital, por serem lar e sempre me ensinarem a ser alguém melhor.

A Zete, Nalva, Itamar, Gera, Itamires e Guilherme, por estarem comigo todos os dias e zelarem por mim durante toda essa caminhada e nos dias mais difíceis serem colo e conforto para seguir em frente.

A toda família Meneses e Fablício por sempre estarem ao meu lado, torcendo por cada vitória e incentivando a ser alguém melhor. Vocês são o meu sustento e tudo de mais precioso que tenho na vida.

Ao meu orientador, Isac Medeiros, que com toda paciência me ensina todos os dias a ser uma pesquisadora e para além da academia a batalhar por todos os meus sonhos. És um exemplo para mim, obrigada por toda dedicação e esforço.

A Robson, por desde a minha entrevista para ingresso no PET ter acreditado em mim e por sempre ser um impulso para que conseguisse alçar voos cada vez mais altos.

A Fabíola, quem me iniciou cientificamente e sempre está disposta a me ajudar e aconselhar. Obrigada por ser exemplo para mim.

A Viviane Lima, minha companheira de graduação, mestrado e do nosso futuro doutorado. Obrigada por dividir todos esses processos comigo, por me ajudar na vida pessoal e profissional. Sem você, todos os desafios com certeza teriam sido mais difíceis.

A Tays Amanda, por termos construído em meio a tantos desafios uma amizade e apoio durante a pós-graduação. Obrigada por todo o incentivo e alicerce durante esses anos.

A Fatima Azevedo, nossa ex pós-doutoranda, por todo apoio experimental e emocional para conseguir chegar até aqui.

A Alinne Villar, companheira de experimentos, divisão de animais e apoio sempre para conseguir chegar até aqui.

Aos meus IC's, Hayaly, Júlio, Thaís Trajano, Eyllen, Eduarda, Adhonias, Ludmila, Gabriela, Malu, Gabriel, Mariana. Vocês foram o meu alicerce no desenvolvimento dos experimentos. Além de sempre fazerem o meu dia mais feliz. Obrigada a todos pelo empenho e ajuda.

A David e Ramísio, pela amizade, por sempre estarem comigo dividindo todas as angústias desse processo. Por serem sinônimo de casa e aconchego. Obrigada por cuidarem de mim.

A Tony e Raquel, meus amigos que se sentem meus pais, estão comigo dividindo todos os momentos e me apoiando nas minhas escolhas, além de me levarem para mais perto de Deus todos os dias.

A Laís e Júnior, meus vizinhos, por estarem sempre me apoiando e ajudando em tudo.

A Leandro, por todo suporte tecnológico e emocional, as suas mensagens sempre me fazem acreditar no propósito de tudo.

As minhas Florzinhas, Yane, Alicinha, Alice, Rebeca, Clara, Rucielly e Monike que são as melhores amigas do mundo. E mesmo estando longe apoiamos sempre uma as outras.

A Júnior Lacerda que juntamente com Viviane, formamos o nosso grupinho, e eles foram a base para enfrentar as disciplinas e a seleção de doutorado. Muito obrigada por serem alicerce nessa jornada.

Aos meus colegas de laboratório, Javanyr, Arthur, Mathania e Larisse, por todos os dias construirmos juntos o melhoramento das nossas pesquisas.

A Crispim, Mônica e todos os servidores da UFPB. Por estarem nos repassando conhecimentos e dando condições de seguir com as pesquisas.

A UFPB, CNPq, CAPES e o Laboratório Melpoejo por todo apoio institucional e fomento.

A eles todo o meu amor e gratidão,

*Ana Caroline M. F. Veras.*

*Resumo*



Veras, A. C. M. F. **Atividade espasmolítica da nova fórmula de um medicamento fitoterápico-Funchicórea®**, pó - Ensaio Farmacológico de Estabilidade para Controle de Qualidade Biológico – 2022. 87 f. Dissertação de Mestrado (Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) PgPNSB/CCS/UFPB. 2022.

## RESUMO

O funchicórea®, é um fitoterápico tradicional brasileiro utilizado na medicina popular há mais de 50 anos, indicado para constipação e cólicas intestinais em recém-nascidos. O uso tradicional do produto subsidia a sua segurança e eficácia. Mas, a legislação vigente preconiza a realização de testes que comprovem a segurança, eficácia e estabilidade da formulação. Com isso, no ano de 2012 foi realizado o primeiro estudo no laboratório de farmacologia cardiovascular da UFPB, comprovando que funchicórea® promoveu aumento do trânsito intestinal em camundongos constipados de ambos os sexos e redução da atividade espasmódica em íleo de cobaia. Contudo, em 2020 a ANVISA exigiu a modificação da formulação com a descontinuação do óleo de funcho e com isso solicitou novos estudos que comprovassem a manutenção da atividade biológica, bem como os testes de estabilidade acelerada e longa duração. Então, este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade espasmolítica, em íleo de ratos, da nova formulação do produto fitoterápico Funchicórea®, com base na Resolução de Diretoria Colegiada – RDC N° 26, de 13 de maio de 2014 e RDC N° 318, de 6 de novembro de 2019 que preconizam o registro dos medicamentos fitoterápicos e os estudos de estabilidade. Além disso, avaliar o seu mecanismo de ação antioxidante. Com os resultados, observamos que a troca da formulação de funchicórea®, não alterou sua potência e eficácia. Em seu mecanismo de ação, foi possível constatar que nos testes de DPPH (*in vitro*), funchicórea® tem baixo efeito oxidante. Porém quando há a indução do estresse oxidativo por meio da Ang II, nas tiras ilíacas, a formulação demonstra potente atenuação da produção de ROS, com efeito comparado ao inibidor de NADPH, apocinina. Durante os testes de estabilidade de longa duração por doze meses e acelerado seis e nove meses, observou-se ao longo do tempo uma padronização do efeito de funchicórea®, ou seja, manutenção da potência e eficácia. Dessa forma, conclui-se que a nova formulação de funchicórea® é eficaz e estável durante o período de ano e tem possível mecanismo de ação antioxidante.

**Palavras-chave:** Funchicórea®; Atividade Espasmolítica; Trato gastrointestinal; Controle biológico; Estabilidade; Antioxidante.

# *Abstract*



Veras, A. C. M. F. **Spasmolytic activity of the new formula of a herbal medicine - Funchicórea® powder - Stability Pharmacological Assay for Biological Quality Control** -. 2022. 87 f. Dissertação de Mestrado (Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) PgPNSB/CCS/UFPB. 2022.

## ABSTRACT

Funchicórea® is a traditional Brazilian herbal medicine used in folk medicine for over 50 years, indicated for constipation and intestinal colic in newborns. The traditional use of the product subsidizes its safety and effectiveness. However, the current legislation recommends the performance of tests that prove the safety, efficacy and stability of the formulation. Thus, in 2012, the first study was carried out in the cardiovascular pharmacology laboratory at UFPB, proving that funchicórea® promoted increased intestinal transit in constipated mice of both sexes and reduced spasmodic activity in guinea pig ileum. However, in 2020, ANVISA demanded the modification of the formulation with the discontinuation of fennel oil and with that requested new studies to prove the maintenance of biological activity, as well as accelerated and long-term stability tests. Therefore, this study aimed to evaluate the spasmolytic activity, in the ileum of rats, of the new formulation of the herbal product Funchicórea®, based on the Resolution of the Collegiate Board of Directors - RDC No. 26, of May 13, 2014 and RDC No. 318, of November 6, 2019 that advocate the registration of herbal medicines and stability studies. In addition, evaluate its antioxidant mechanism of action. With the results, we observed that the change of the formulation of funchicórea®, did not change its potency and effectiveness. In its mechanism of action, it was possible to verify that in the DPPH tests (*in vitro*), funchicórea® has a low oxidizing effect. However, when there is the induction of oxidative stress through Ang II, in the iliac strips, the formulation demonstrates potent attenuation of ROS production, with an effect compared to the NADPH inhibitor, apocynin. During the long-term stability tests for twelve months and accelerated six and nine months, a standardization of the funchicórea® effect was observed over time, that is, maintenance of potency and efficacy. Thus, it is concluded that the new formulation of funchicórea® is effective and stable during the year and has a possible mechanism of antioxidant action.

**Keywords:** Funchicórea®; Spasmolytic Activity; Gastrointestinal tract; Biological control; Stability; Antioxidant.

## Lista de Figuras

<b>Figura 1</b> – Anatomia do Sistema digestório .....	24
<b>Figura 2</b> - Acoplamento farmacomecânico de contração no músculo liso pela via efetora da PLC $\beta$ 1-PKC. ....	28
<b>Figura 3</b> - Acoplamento farmacomecânico do relaxamento no músculo liso pela via efetora do GMPc. ....	29
<b>Figura 4</b> - Representação esquemática da montagem in vitro de tiras ilíacas em cuba de banho de órgãos isolado. ....	43
<b>Figura 5</b> - Delineamento representativo para avaliação da resposta espasmolítica em íleo isolado de rato. ....	44
<b>Figura 6</b> - Mecanismo de reação entre o radical DPPH• e um antioxidante através de transferência de um átomo de hidrogênio. ....	44
<b>Figura 7</b> - Esquema representativo dos grupos experimentais.....	46
<b>Figura 8</b> - Curva concentração-resposta de concentrações crescentes de excipiente e funchicórea®, antiga formulação, (1-1000 $\mu$ g/mL) em tiras ilíacas pré-contraídas com CCh (1 $\mu$ M) e KCl (40mM). ....	50
<b>Figura 9</b> - Curva concentração-resposta de concentrações crescentes de excipiente e funchicórea®, nova formulação, (1-1000 $\mu$ g/mL) em tiras ilíacas pré-contraídas com CCh (1 $\mu$ M) e KCl (40mM). ....	52
<b>Figura 10</b> - Medida da capacidade sequestradora de radical livre DPPH• e atividade antioxidante in vitro de Funchicórea®. ....	53
<b>Figura 11</b> - Efeito de Funchicórea® sobre a intensidade de fluorescência do DHE em íleo. ....	54
<b>Figura 12</b> -Curva concentração-resposta de concentrações crescentes de Funchicórea® (1-1000 $\mu$ g/mL) em tiras ilíacas pré-contraídas com CCh (1 $\mu$ M) e KCl (40mM), no tempo “zero” (T0), no tempo “três” de estabilidade de longa duração (T3LD) e acelerada (T3AC). ....	56
<b>Figura 13</b> - Curva concentração-resposta de concentrações crescentes de funchicórea® (1-1000 $\mu$ g/mL) em tiras ilíacas pré-contraídas com CCh (1 $\mu$ M) e KCl (40mM), no tempo “zero” (T0), no tempo “seis” de estabilidade de longa duração (T6LD) e acelerada (T6AC). ....	57
<b>Figura 14</b> - Curva concentração-resposta de concentrações crescentes de funchicórea® (1-1000 $\mu$ g/mL) em tiras ilíacas pré-contraídas com CCh (1 $\mu$ M) e KCl	

(40mM), no tempo “zero” (T0), no tempo “nove” com estudo de estabilidade de longa duração(T9LD). a. ....59

**Figura 15** - Curva concentração-resposta de concentrações crescentes de funchicórea® (1-1000 µg/mL) em tiras ilíacas pré-contraídas com CCh (1µM) e KCl (40mM), no tempo “zero” (T0), no tempo “doze” com estudo de estabilidade de longa duração (T12LD). ....61

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1</b> - Condições de armazenamento e de realização de estudo de estabilidade de longa duração e acelerado para medicamentos.....	35
<b>Tabela 2</b> - Composição da antiga formulação de Funchicórea® .....	41
<b>Tabela 3</b> - Composição da nova formulação de Funchicórea® .....	41
<b>Tabela 4</b> - Composição da solução de Tyrode para íleo.....	41
<b>Tabela 5</b> - Composição da solução de KCl 40mM .....	42
<b>Tabela 6</b> - Composição do PBS.....	42
<b>Tabela 7</b> - Delineamento dos estudos de estabilidade .....	48
<b>Tabela 8</b> - Comparativo da pCE <sub>50</sub> de todos os tempos. ....	62
<b>Tabela 9</b> - Comparativo do Emax de todos os tempos. ....	62

## Lista de Abreviaturas

**ACh** acetilcolina

**AMPc** Monofosfato cíclico de adenosina

**Ang II** Angiotensina II

**ANVISA** Agência Nacional de Vigilância Sanitária

**CaM** Calmodulina

**Ca<sub>v</sub>** Canais de cálcio dependente de voltagem

**CCh** Carbacol

**DPPH** 2,2-difenil-1-picril-hidrazil

**GMPc** Monofosfato cíclico de guanosina

**GTP** Trifosfato de guanosina

**ICC** Célula intersticial de Cajal

**ID** intestino delgado

**IG** intestino grosso

**KCl** Cloreto de potássio

**NADPH** Fosfato Dinucleótido de Adenina e Nicotinamida Oxidase

**NANC** Nervos Não Adrenérgicos Não Colinérgicos

**NCX** Trocador sódio-cálcio

**NO** Óxido Nítrico

**eNOS** Sintase de Óxido Nítrico Endotelial

**iNOS** Sintase de Óxido Nítrico Induzível

**OMS** Organização Mundial da Saúde

**PMCA** Ca<sup>2+</sup>-ATPase da membrana plasmática

**PKA** Proteína cinase dependente de AMPc

**PKC** Proteína cinase dependente de cálcio

**PKG** Proteína cinase GMPc

**RDC** Resolução de Diretoria Colegiada

**ROS** Espécies Reativas de Oxigênio

**RPM** Rotação por minuto

**SNA** Sistema Nervoso Autônômico

**SNE** Sistema Nervoso Entérico

**SERCA** Ca<sup>2+</sup>-ATPase do retículo sarcoplasmático

**SOD** Superóxido Dismutase

**sGC** Ciclase de Guanilil solúvel

## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>21</b>
<b>2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>24</b>
2.1 ANATOMIA DO TRATO GASTROINTESTINAL .....	24
2.2 CONTRAÇÃO E RELAXAMENTO DA MUSCULATURA LISA INTESTINAL.....	25
2.3 CÓLICA INTESTINAIS EM CRIANÇAS.....	30
2.4 PRODUTOS NATURAIS .....	31
2.4.1 <i>Ruibarbo e Chicória</i> .....	32
2.4.2 <i>Funchicórea®</i> .....	33
2.5 CONTROLE DE QUALIDADE BIOLÓGICO .....	33
2.5.1 <i>Estudo de Estabilidade de Longa Duração</i> .....	34
2.5.2 <i>Estudo de Estabilidade Acelerado</i> .....	35
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>37</b>
3.1 GERAL.....	37
3.2 ESPECÍFICOS.....	37
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>40</b>
4.1 ANIMAIS .....	40
4.2 DROGAS E REAGENTES .....	40
4.3 FORMULAÇÕES DE FUNCHICÓREA® .....	41
4.4 SOLUÇÕES NUTRITIVAS.....	41
4.5 PREPARAÇÃO DE ÍLEO ISOLADO DE RATO .....	42
4.6 EFEITO DE FUNCHICÓREA® SOBRE A REATIVIDADE CONTRÁTIL DO ÍLEO ISOLADO DE RATO FRENTE AO CARBACOL (1 MM) E AO KCL (40 MM).....	43
4.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	44
4.7.1 <i>Determinação da Atividade Sequestradora de Radicais DPPH●</i> .....	44
4.7.2 <i>Avaliação do estresse oxidativo induzido por angiotensina II em íleo isolado de rato</i> .....	45
4.7.3 <i>investigação da participação das enzimas Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADPH) oxidase</i> .....	47
4.8 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DE DIFERENTES LOTES PILOTOS DE FUNCHICÓREA® ....	47

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	48
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>50</b>
5.1 EFEITO DA ANTIGA FORMULAÇÃO DE FUNCHICÓREA® SOBRE A REATIVIDADE CONTRÁTIL DO ÍLEO ISOLADO DE RATO FRENTE AO CARBACOL (1 mM) E AO KCL (40 mM).....	50
5.2 EFEITO DA NOVA FORMULAÇÃO DE FUNCHICÓREA® SOBRE A REATIVIDADE CONTRÁTIL DO ÍLEO ISOLADO DE RATO FRENTE AO CARBACOL (1 mM) E AO KCL (40 mM).....	51
5.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	53
5.3.1 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE SEQUESTRADORA DE RADICAIS DPPH●.....	53
5.3.2 <i>Avaliação do estresse oxidativo induzido por angiotensina II em íleo isolado de rato .....</i>	<i>54</i>
5.4 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DE DIFERENTES LOTES PILOTOS DE FUNCHICÓREA®.....	55
5.4.1 <i>Estudo de Estabilidade de Três Meses.....</i>	<i>55</i>
5.4.2 <i>Estudo de Estabilidade de Seis Meses.....</i>	<i>57</i>
5.4.3 <i>Estudo de Estabilidade de Nove Meses .....</i>	<i>59</i>
5.4.4 <i>Estudo de Estabilidade de Doze Meses .....</i>	<i>60</i>
5.4.4 <i>Comparativo de Todas as CE<sub>50</sub> e E<sub>max</sub> para o Estudo de Estabilidade.....</i>	<i>62</i>
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>65</b>
<b>7. CONCLUSÃO .....</b>	<b>73</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>75</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>81</b>

# *Introdução*

---

---

## 1. INTRODUÇÃO

Os distúrbios gastrointestinais funcionais, como vômitos, dor abdominal, dispepsia, diarreia, constipação, disquesia do lactente, são definidos como combinações variáveis de sintomas crônicos ou recorrentes do aparelho digestório, não explicados por anormalidades estruturais ou bioquímicas. Sabe-se que esses transtornos são frequentes em crianças, sendo alguns deles próprios de determinada faixa etária (COSTA, 2005).

Sabe-se que extratos de diferentes plantas tem uso consagrado pela população brasileira e cada um deles devido aos seus constituintes químicos tem indicações diferentes. Algumas espécies são usadas na medicina tradicional para o tratamento de distúrbios gastrintestinais, incluindo diarreia, dispepsia e disquesia. Estas plantas, muitas vezes, apresentam ação rápida, baixo custo e podem estar prontamente disponíveis, além disso, seus usuários acreditam ter algum controle na escolha do medicamento (CHOKRI et al., 2010; DINIZ et al., 2002; KAUL & JOSHI, 2001).

Estima-se que no Brasil, cerca de 82% da população utiliza produtos à base de plantas medicinais nos cuidados à saúde. Sendo eles, proveniente do conhecimento tradicional, na medicina popular ou nos sistemas oficiais de saúde, como prática de cunho científico, orientada pelas diretrizes e princípios do Sistema Único de Saúde (SUS) (RODRIGUES; SIMONI, 2010).

Os fitoterápicos são obtidos com emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais cuja segurança e eficácia sejam baseadas em evidências clínicas e que sejam caracterizados pela constância de sua qualidade. Atualmente essa classe de medicamento está em um constante crescimento no mercado, devido a evolução dos estudos científicos, comprovando a eficácia das plantas medicinais (ANVISA, 2014; SILVA et al., 2017).

O Registro de medicamentos fitoterápicos deve ser feito com base em resoluções preconizadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) de acordo com a Resolução de Diretoria Colegiada - RDC Nº 26, de 13 de maio de 2014, que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos, na qual estabelece a realização de estudos de estabilidade do fitoterápico que são necessários para obtenção do registro.

Os estudos de estabilidade são projetados para testar e prover evidência quanto à variação da qualidade do medicamento em função do tempo, diante da

influência de diversos fatores, relacionados ao ambiente ou ao próprio produto. Tendo como objetivo estabelecer o prazo de validade do medicamento. Esses estudos podem ser divididos em dois, estabilidade acelerada e estabilidade de longa duração.

A análise da estabilidade acelerada é realizada para avaliar possíveis alterações físicas, químicas e microbiológicas dos medicamentos, em condições forçadas de armazenamento, visando auxiliar na determinação do prazo de validade do medicamento e a avaliar o efeito de curtas excursões fora dos cuidados de conservação preconizados.

Enquanto os estudos da estabilidade de longa duração são realizados para avaliar as mesmas características do acelerado, porém nas condições de armazenamento, determinando assim o prazo de validade propostos para o medicamento. Esses estudos são regulamentados pela RDC Nº 318, de 6 de novembro de 2019 que estabelece os critérios para a realização dos testes de Estabilidade de insumos farmacêuticos ativos e medicamentos, exceto biológicos, e dá outras providências (ANVISA, 2019).

O produto Funchicórea® é um fitoterápico tradicional brasileiro utilizado na medicina popular há mais de 50 anos, contra cólicas intestinais e constipação, principalmente em recém-nascidos. Sabe-se que o uso tradicional de um produto deve servir como mais uma forma de subsidiar a sua segurança e a sua eficácia.

Assis e colaboradores (2020) utilizando uma formulação antiga de Funchicórea®, demonstraram efeito laxante em animais constipados e atividade espasmolítica em íleo de ratos. No entanto, em dezembro de 2020 o Laboratório Melpoejo LTDA, para cumprir exigências dos órgãos reguladores, teve que modificar a formulação de Funchicórea®, fazendo ajustes com relação aos adjuvantes farmacológicos e excipientes da formulação original. Essas mudanças, de acordo com a legislação vigente traz a necessidade de realizar novos estudos para comprovação da eficácia da nova fórmula e sua estabilidade, com a finalidade de obtenção do registro junto a Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA.

Desse modo, o presente estudo objetivou investigar a atividade espasmolítica do produto Funchicórea®, tentando elucidar o seu mecanismo de ação antioxidante. Bem como, realizar estudos de controle de qualidade e estabilidade biológico da nova formulação, visando o registro do produto junto à ANVISA.

# *Fundamentação Teórica*

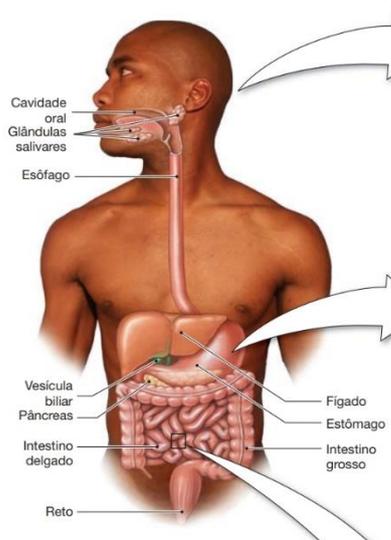
---

## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 Anatomia do Trato Gastrointestinal

O sistema digestório começa com a cavidade oral (boca e faringe), os órgãos que irão receber o alimento, responsáveis pela mastigação e deglutição, respectivamente, com o auxílio das glândulas salivares. Após a deglutição o alimento entra no trato gastrointestinal (TGI) propriamente dito, que consiste em esôfago, estômago, intestino delgado e intestino grosso. Para que ocorra a quebra e a absorção correta, são necessários órgãos anexos, sendo eles, as glândulas salivares, o fígado, a vesícula biliar e o pâncreas (MATSUO; PALMER, 2008; SILVERTHORN, 2010).

**Figura 1** – Anatomia do Sistema digestório



Fonte: SILVERTHORN, 2010

O esôfago é um tubo estreito que através dos seus movimentos peristálticos irá levar o alimento até o estômago, onde ocorrerá a degradação do mesmo, devido a presença do ácido estomacal e de enzimas digestivas. Após esse processo o produto obtido da degradação passa a se chamar quimo (CLOUSE; DIAMANT, 2006; KONG; SINGH, 2008).

Em seguida, o quimo irá passar para o intestino. O intestino é dividido em dois, intestino delgado (ID) e intestino grosso (IG). O intestino delgado é composto por três partes, duodeno, jejuno e íleo. Sendo ele, responsável pela quebra e absorção de nutrientes importantes. O duodeno é a porção inicial e o quimo irá passar por ele sofrendo ação de enzimas intestinais e secreção do fígado e pâncreas, enquanto no

jejuno e no íleo irá ocorrer a maior parte da absorção dos produtos de degradação (nutrientes) originados no duodeno (BARRETT, 2014).

O íleo é a parte final do ID, possui cerca de 3 metros e termina na junção com o ceco. Tem como função absorver os nutrientes que não foram captados pelo duodeno e jejuno, sendo os principais a vitamina B12 e os ácidos biliares (COLLINS; NGUYEN; NADIREDDY, 2021).

O ID, histologicamente, é dividido em quatro camadas: a mucosa (epitélio, lâmina própria e muscular da mucosa), possui vilosidades, que são projeções alongadas formadas pelo epitélio e pela lâmina própria (composta por tecido conjuntivo frouxo com vasos sanguíneos e linfáticos, fibras nervosas e fibras musculares lisas), composto também por enterócitos e células caliciformes. A submucosa, possui glândulas intestinais secretoras de muco alcalino, possui agregados de nódulos linfoides (GALT), que são mais numerosos no íleo (placas de Peyer), apresenta células M. A muscular própria, é dividida em camada muscular circular interna, espaço intermuscular e camada muscular longitudinal externa e a serosa é a camada que reveste o órgão (UCHOA; JOSÉ, 2017).

A inervação intestinal possui dois plexos, o plexo nervoso mioentérico (de Auerbach), componente intrínseco, que está entre as camadas musculares, circular interna e longitudinal externa, e o plexo nervoso submucoso (de Meissner), componente extrínseco, na submucosa. Os plexos contêm alguns neurônios sensoriais que recebem informações de terminações nervosas próximas da camada epitelial e na camada de músculo liso com relação à composição do conteúdo intestinal (quimiorreceptores) e ao grau de expansão da parede intestinal (mecanorreceptores), respectivamente (UCHOA; JOSÉ, 2017).

Além disso, as contrações da musculatura lisa intestinal também são reguladas por inerações simpáticas (inibe a motilidade) e parassimpáticas (promove motilidade) (BARRETT, 2014; SILVERTHORN, 2010).

## **2.2 Contração e Relaxamento da Musculatura Lisa Intestinal**

O músculo liso no intestino delgado possui uma contração própria, independente de estimulação neural ou hormonal, são as denominadas contrações fásicas. Essas contrações são estimuladas pelas células intersticiais de Cajal (ICC),

elas formam uma rede entre e no interior das camadas musculares circulares e longitudinais da parede intestinal. São as ICCs que iniciam as ondas lentas, potenciais de marcapasso, que não geram contração. Para que a contração ocorra, um potencial de pico deve ser gerado pelas células musculares lisas, estudos demonstram que os picos são gerados, pelo menos em parte, por correntes internas de  $\text{Ca}^{2+}$  (LENTLE; DE LOUBENS, 2015).

A atividade contrátil básica que ocorre devido as ondas lentas e picos é modulada pelo sistema nervoso entérico (SNE). Esse sistema específico do TGI, modula diretamente as contrações musculares intestinais. O sistema nervoso autonômico (SNA), incluindo os nervos simpáticos e parassimpáticos, modula a atividade contrátil indiretamente através do SNE. A acetilcolina (ACh) é o principal neurotransmissor excitatório do SNE, cujo efeito é mediado por receptores colinérgicos muscarínicos do subtipo  $M_3$ , acoplado ao sistema efetor fosfolipase C subtipo  $\beta_1$  – proteína cinase do subtipo C PLC-PKC (LENTLE; DE LOUBENS, 2015).

Os nervos simpáticos do SNA também modulam a motilidade do TGI indiretamente através do SNE, tendo um efeito inibitório na motilidade. Essa inibição ocorre através de dois mecanismos diferentes. Por meio da inibição da liberação de noradrenalina (NA) pré-sináptica, que ocorre com a ativação do subtipo 2 de adrenoceptores, acoplado ao sistema efetor da ciclase de adenilil, tendo como resultado a inibição desse sistema, diminuindo conseqüentemente a atividade nos nervos colinérgicos do SNE. Além disso, a NA também atua diretamente nas células musculares lisas intestinais para causar relaxamento através da ativação de beta-adrenoceptores, que são acoplados a  $G_s$  e PKA (LENTLE; DE LOUBENS, 2015; MONTGOMERY et al., 2016).

Nos neurônios inibitórios o principal neurotransmissor envolvido, parece ser o óxido nítrico (NO), que medeia relaxamento não adrenérgico não colinérgico (NANC) da musculatura longitudinal e circular (CERQUEIRA; YOSHIDA, 2002; KERWIN JR; LANCASTER; FELDMAN, 1995).

Para que ocorra uma resposta contrátil o músculo liso necessita dos estímulos, que podem ocorrer através de dois acoplamentos: eletromecânico e farmacomecânico (REMBOLD, 1996).

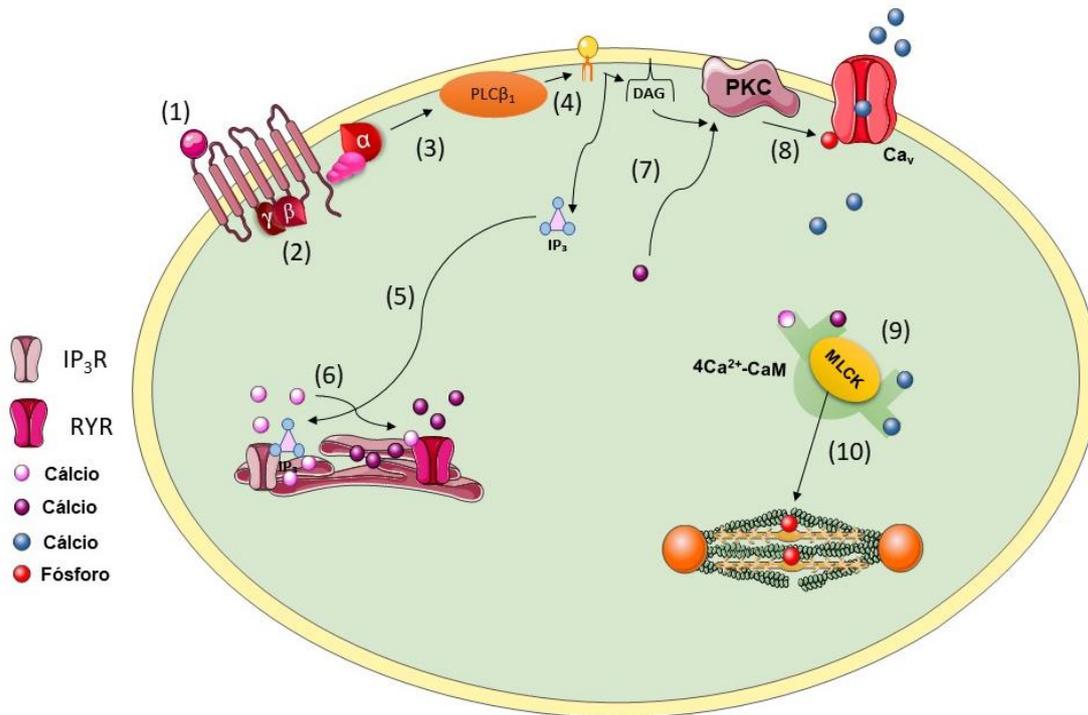
O acoplamento eletromecânico é mediado por receptores ionotrópicos, como os canais de vazamento de  $\text{K}^+$ , que no seu estado de repouso, favorecem o efluxo de

íons potássio, causando hiperpolarização da célula e conseqüentemente relaxamento por não desencadearem o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$ . Porém quando um potencial de ação se inicia, os canais de cálcio dependente de voltagem ( $\text{Ca}_v$ ) devido ao acúmulo de cargas positivas no interior da célula são abertos, possibilitando o influxo de cálcio na célula e assim ocasionando a contração (BRUNTON; HILAL-DANDAN; KNOLLMANN, 2018; KNOT; BRAYDEN; NELSON, 1996).

Já o acoplamento farmacomecânico é mediado por receptores metabotrópicos, tem-se a ligação de agonistas como a acetilcolina, noradrenalina e histamina a seus respectivos receptores acoplados à proteína G (GPCRs), para ocasionar a contração. Como demonstrado na figura 2, a ACh se liga ao seu receptor GPCR muscarínico ( $\text{M}_3$ ), que acopla a proteína  $\text{G}_{q/11}$ , que irá ativar a fosfolipase C  $\beta_1$  ( $\text{PLC}\beta_1$ ), que hidrolisa fosfolípidios de membrana, 4,5-bisfosfato de fosfatidilinositol ( $\text{PIP}_2$ ), em 1,4,5- trisfosfato de inositol ( $\text{IP}_3$ ) e diacilglicerol (DAG).

O  $\text{IP}_3$  se liga ao seu receptor ( $\text{IP}_3\text{R}$ ), no retículo sarcoplasmático, e mobiliza cálcio para o interior da célula. O cálcio se liga a proteína cinase C (PKC), deslocando-a para a membrana, onde juntamente com o DAG irão ativá-la. PKC irá fosforilar canais de cálcio dependente de voltagem ( $\text{Ca}_v$ ), causando a sua abertura aumentando a concentração de cálcio citosólico ( $[\text{Ca}^{2+}]$ ). Torna-se possível a interação do cálcio com a calmodulina (CaM), então forma-se o complexo  $[\text{4Ca}^{2+}\text{-CaM}]$ , que ativa a cinase da cadeia leve da miosina (MLCK), que fosforila a cabeça leve da miosina, descobrindo o sitio de ligação da actina e possibilitando assim a interação de ambas e contração da musculatura lisa intestinal, como demonstrado na figura abaixo (BERRIDGE, 2014; HILAL-DANDAN; BRUNTON, 2015; KIM et al., 2008).

**Figura 2-** Acoplamento farmacomecânico de contração no músculo liso pela via efetora da PLCβ1-PKC.



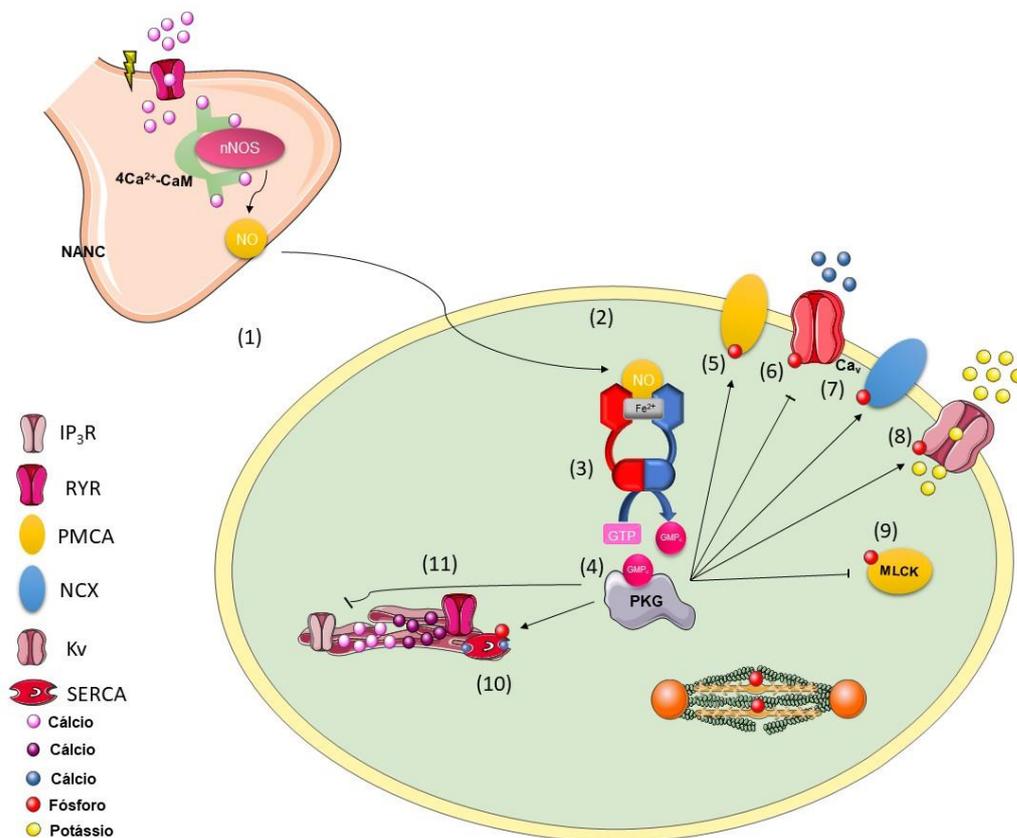
(1) O agonista se liga ao seu receptor do tipo GPCR na membrana plasmática; (2) A proteína  $G_{q/11}$  acopla na segunda ou terceira alça intracelular do receptor, levando a troca do GDP por GTP na subunidade  $\alpha$  da proteína (não mostrado na figura), tornando-a ativa e dissociando a subunidade  $\alpha$ -GTP do dímero  $\beta\gamma$ ; (3) a subunidade  $\alpha_{q/11}$ -GTP ativa a enzima PLC- $\beta_1$ ; (4) a PLC- $\beta_1$  cliva o fosfolípido de membrana PIP<sub>2</sub> em IP<sub>3</sub> e DAG; (5) o IP<sub>3</sub> ativa o IP<sub>3</sub>R presente no RS, liberando o Ca<sup>2+</sup> dos estoques intracelular; (6) o Ca<sup>2+</sup> liberado do RS ativa o RyR, fazendo com que mais Ca<sup>2+</sup> seja liberado para o citoplasma; (7) o Ca<sup>2+</sup> se liga a PKC, transloca para a membrana e juntamente com o DAG ativa-a; (8) a PKC ativada fosforila os CaV de forma a abri-los e assim ocorrer o influxo de Ca<sup>2+</sup>; (9) o aumento da [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> aumenta a afinidade do Ca<sup>2+</sup> pela CaM formando o complexo 4Ca<sup>2+</sup>-CaM e ativando a MLCK; (10) a MLCK ativada fosforila a MLC que promove a interação dos filamentos de actina com miosina, desencadeando a contração do músculo liso.

Fonte: Veras, 2022.

O acoplamento farmacomecânico também acontece desencadeando relaxamento da musculatura lisa intestinal, podendo agir por dois sistemas efetores, a ciclase de adenilil e a ciclase de guanilil, na figura 3 podemos observar a via de ativação da ciclase de guanilil solúvel. O NO é formado tanto nos NANC, por estímulos do SNE que ativam canais de cálcio e assim permite a formação do complexo [4Ca<sup>2+</sup>-CaM] que ativa a sintase de óxido nítrico induzível (iNOS), formando o NO. O NO para é liberado nas células musculares lisas, então ocorre sua ligação ao receptor de ciclase de guanilil solúvel (sGC) no citosol, que hidrolisa o trifosfato de guanosina (GTP) e cicliza em monofosfato cíclico de guanosina (GMPc), o aumento da concentração de nucleotídeo cíclico, ativa a proteína cinase dependente de

monofosfato cíclico de guanosina (PKG), que irá fosforilar diferentes alvos como: canais de K<sup>+</sup>, a bomba de Ca<sup>2+</sup> da membrana plasmática (PMCA), o trocador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> (NCX) e a bomba de Ca<sup>2+</sup> do retículo sarcoplasmático (SERCA), ativando-os. Bem como forforilar Cav, IP3R e a MLCK, inativando-os levando ao processo de relaxamento do músculo liso intestinal. O relaxamento por meio da ciclase de adenilil, após a ativação da proteína cinase dependente de monofosfato cíclico de adenosina (PKA), terá como alvos os mesmos substratos da PKG, com exceção dos IP3R, para causar relaxamento (CULOTTA; KOSHLAND JR, 1992; FLORA FILHO; ZILBERSTEIN, 1998; SANDERS; WARD, 1992).

**Figura 3** - Acoplamento farmacomecânico do relaxamento no músculo liso pela via efetora do GMPc.



(1) Nos NANC, o NO é produzido em resposta a estímulos do SNE, aumentando o influxo de Ca<sup>2+</sup> e formando o complexo [4Ca<sup>2+</sup>-CaM], que irá ativar a nNOS e formar o NO. (2) O NO é liberado na musculatura lisa, ligando-se a ciclase de guanilil solúvel (sGC); (3) a sGC converte o GTP em GMPc; (4) O nucleotídeo cíclico, cGMP, ativa a proteína cinase G, PKG. A PKG ira fosforilar vários substratos: (5) aumentam a atividade da PMCA; (6) inibem os Cav; (7) ativa o NCX; (8) Ativa os canais de K<sup>+</sup>; (9) inibem a MLCK (10) aumentam a atividade da SERCA; (11) Inibe os IP<sub>3</sub>R. Todos esses mecanismos diminuem a [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub>, reduzindo sua afinidade pelo complexo 4Ca<sup>2+</sup>-CaM. Dessa maneira, impedem a fosforilação da MLC e, conseqüentemente, a interação dos filamentos de miosina com os de actina, promovendo o relaxamento do músculo liso

Fonte: Veras, 2022.

## 2.3 Cólica intestinais em Crianças

A definição clássica de cólica infantil foi dada em 1954 por Wessel, considerada “a regra dos três”. Segundo ele, a cólica é uma condição que ocorre em crianças saudáveis e bem alimentada com choro ou agitação por mais de três horas por dia, três dias por semana e por mais de três semanas. Devido o tempo de diagnóstico sob os critérios de Wessel serem por um período prolongado, observou-se a necessidade de novos parâmetros para o diagnóstico.

Então, a cólica infantil foi classificada como um distúrbio gastrointestinal funcional (FGID) sob os critérios de diagnóstico de Roma (ROME) III, para cólica infantil e para lactentes do nascimento aos quatro meses, deve incluir paroxismos de irritabilidade, agitação/choro que começa e para sem causa óbvia, episódios com duração de três ou mais horas por dia, ocorrendo três dias por semana por pelo menos uma semana e nenhuma falha de crescimento (SARASU; NARANG; SHAH, 2018; WESSEL et al., 1954).

No entanto, os critérios utilizados até ROMA III eram cansativos para os pais e deixavam as crianças sofrendo por vários dias. Por isso, na apresentação dos novos critérios de ROMA IV, definiu-se que seria adicionado dois critérios que devem ser preenchidos para o diagnóstico de cólica infantil, os pais devem relatar que seu bebê chorou ou se agitou por 3 ou mais horas por dia, durante 3 ou mais dias na semana anterior. Além disso, os pais devem manter um diário de comportamento de 24 horas para confirmar que a quantidade total de choro e agitação é superior a 3 horas por 24 horas (ZEEVENHOVEN; KOPPEN; BENNINGA, 2017).

A etiologia da doença ainda é desconhecida, podendo estar relacionada a fatores gastrointestinais ou não. Há hipóteses que relacionam as cólicas infantis com comportamentos maternos, má alimentação do bebê, imaturidade do sistema nervoso central ou uma forma precoce de enxaqueca (CHERUBINI, 2011; GELFAND, 2016).

As causas gastrointestinais em sua maioria podem estar relacionadas a intolerância à lactose. Esses indivíduos possuem deficiência da enzima lactase, ocasionando assim a fermentação da lactose no intestino grosso e consequentemente a produção aumentada de hidrogênio que leva ao desconforto gastrointestinal nos bebês, porém ainda não há uma definição de que a intolerância seja causadora das cólicas. Além disso, esses eventos podem estar relacionados a processos

inflamatórios na mucosa intestinal (GHOSHAL, 2011; HYAMS et al., 1989; ILLINGWORTH, 1985; MILLER et al., 1989; RHOADS et al., 2009).

A flora intestinal alterada também pode ser um dos fatores que causam as cólicas. No estudo de Weerth e colaboradores, observou-se que bebês com cólica tinha a colonização intestinal mais lenta, menor diversidade e estabilidade de microrganismos intestinais, aumento da concentração de Proteobacter e diminuição da concentração de Lactobacillus, Bifidobacter e outras bactérias produtoras de butirato (DE WEERTH; FUENTES; DE VOS, 2013).

Um dos achados frequentes em bebês com cólicas é levantar as pernas e expelir gases durante o choro que pode estar relacionado a imaturidade do SNE ocasiona contrações na musculatura lisa intestinal (GELFAND, 2016).

Até o presente momento, não existem critérios uniformes para uma abordagem terapêutica específica e nenhum medicamento provou ser definitivamente benéfico para o tratamento das cólicas infantis (SALVATORE et al., 2016).

## **2.4 Produtos Naturais**

De acordo com Organização Mundial da Saúde (OMS), o uso da medicina tradicional está crescendo nos países desenvolvidos como uso complementar e chega a 80% na África, que depende essencialmente de plantas para cuidados primários de saúde (OMS 2017a).

Os produtos naturais desempenham um papel importante na descoberta de novas substâncias com potenciais farmacológicos. Utiliza-se esses produtos para fins terapêuticos desde os primórdios da civilização, com a evolução da ciência, começou a se respaldar no uso tradicional para justificar cientificamente seu uso para determinada afecção, bem como isolar e caracterizar moléculas desses produtos, fazendo melhoramento e desenvolvimento de fármacos (NEWMAN; CRAGG, 2020).

O Brasil devido a sua vasta biodiversidade e extensão territorial, tem uma posição privilegiada para a ciência de produtos naturais. A flora e a fauna (plantas, fungos, insetos, organismos marinhos e bactérias) são fontes de substâncias biologicamente ativas dos biomas brasileiros que revelam uma diversidade de classes de compostos e tipos estruturais de metabólitos secundários, com potencial para surgimentos de novas drogas (BARREIRO; BOLZANI, 2009).

Devido a esses fatores se estruturou no Brasil uma grande rede de pesquisadores com expertise em plantas medicinais, adotando diversas metodologias para obtenção de novos compostos, utilizadas tanto em produtos nacionais como importados (BERLINCK et al., 2017).

## **2.4.1 Ruibarbo e Chicória**

### **2.4.1.1 Ruibarbo**

*Rheum L.* (família Polygonaceae) é um gênero diversificado, composto por cerca de 60 espécies que estão distribuídas nas regiões montanhosas e desérticas da Ásia e Europa, com maior incidência de diversidade na China e bastante utilizado pela medicina tradicional chinesa (GHORBANI; AMIRI; HOSSEINI, 2019).

A espécie *Rheum palmatum L.* é uma erva, subarbusto e a parte utilizada para fins terapêuticos é o seu rizoma que externamente, possui cor marrom avermelhada e internamente de cor amarela. Tem cheiro forte e sabor amargo. Cultivada principalmente no centro oeste e sudeste do Brasil, de acordo com o reflora (NAVED; KALAM, 2021).

Nos últimos anos foram realizados diversos estudos com o *Rheum palmatum L.* e demonstrando atividades antipirética, anticancerígenas, laxantes, antibacterianas, antioxidante (CHEN et al., 2017; KONG et al., 2014; ZHOU et al., 2015).

### **2.4.1.2 Chicória**

O gênero *Cichorium* (família Asteraceae) composto por seis espécies com grandes áreas de distribuição na Europa e Ásia, era cultivada pelos antigos egípcios como planta medicinal. *Cichorium intybus L.* é uma planta anual, bienal ou perene, atinge 20 a 150 cm de altura. Todas as partes morfológicas da chicória (raízes, ervas, flores e folhas) contêm um grande número de vários compostos químicos. No Brasil é cultivada nas regiões nordeste, sudeste, sul e centro oeste, de acordo com o reflora (JANDA et al., 2021; STREET; SIDANA; PRINSLOO, 2013).

O gênero *Cichorium intybus* L têm atividades descritas na literatura, sendo elas, anti-hiperuricemia, anti-inflamatória, antidiabética, antinematoda, antioxidante, antiproliferativa, efeitos hepatoprotetores, antibacterianos e antiprotozoários (KT; SIVALINGAMQ, 2020; NASIMI DOOST AZGOMI et al., 2021; PEÑA-ESPINOZA et al., 2018; WANG et al., 2019).

#### **2.4.2 Funchicórea®**

O Funchicórea®, é um medicamento tradicional fitoterápico, composto, ou seja, produto obtido de matéria-prima ativa vegetal, exceto substâncias isoladas, com finalidade profilática, curativa ou paliativa, e o seu ativo é proveniente de mais de uma espécie vegetal (ANVISA, 2014).

O Funchicórea®, em sua nova formulação, composta pelo extrato seco da raiz de *Rheum palmatum* L e folhas de *Cichorium intybus* L., é um fitoterápico tradicional brasileiro utilizado na medicina popular há mais de 50 anos contra cólicas intestinais e constipação, principalmente em recém-nascidos e crianças (ASSIS et al., 2020).

### **2.5 Controle de Qualidade Biológico**

De acordo com a RDC nº 26/2014, da ANVISA, no seu Art. 3º, parágrafo III, o método de controle de qualidade biológico é:

*Método alternativo à análise quantitativa dos marcadores da matéria-prima vegetal e do produto acabado, baseado na avaliação da atividade biológica proposta para o fitocomplexo.*

É fundamental a realização do controle da qualidade, garantindo a segurança, eficácia e aceitabilidade dos fitoterápicos. De forma que a falha nas medidas preventivas e no controle do processo de fabricação, pode ocasionar o comprometimento da qualidade do produto, como quebra da estabilidade da formulação, alteração das características físicas (cor, viscosidade) e químicas (inativação do princípio ativo) do produto, o que pode gerar graves danos aos usuários (CABRAL et al., 2019).

Os componentes do medicamento fitoterápico são de alta complexidade em relação ao medicamento químico, o que faz com que o processo de avaliação da qualidade seja muito difícil. Com base nisso, foi proposto um método de avaliação

alternativo, sendo ele realizado através de dados obtidos a partir de uma curva farmacológica, mais precisamente a potência (ANVISA, 2014).

A RDC nº 26/2014, da ANVISA, também preconiza a realização de estudos de estabilidade, para a garantia da qualidade, bem como, a estabilidade da formulação, determinando assim o prazo de validade do medicamento. De acordo com o seu art. 9º:

*A empresa solicitante do registro ou notificação deverá apresentar relatório do estudo de estabilidade acelerado concluído acompanhado do estudo de estabilidade de longa duração em andamento de três lotes-piloto, ou estudos de estabilidade de longa duração já concluídos, todos de acordo com a Resolução - RE nº 1, de 29 de julho de 2005, que publicou o Guia para a realização de estudos de estabilidade, ou suas atualizações.*

Os estudos de estabilidade são preconizados de acordo com a RDC nº 318/2019 da ANVISA, que conceitua estudo de estabilidade como:

*Estudo projetado para testar e prover evidência quanto à variação da qualidade de IFA ou medicamento em função do tempo, diante da influência de uma variedade de fatores ambientais, tais como temperatura, umidade e luz, além de outros fatores relacionados ao próprio produto, como as propriedades físicas e químicas do IFA e dos excipientes farmacêuticos, bem como da forma farmacêutica, do processo de fabricação, do tipo e propriedades dos materiais de embalagem, com o objetivo de estabelecer o Prazo de Reteste do IFA ou o Prazo de Validade do IFA e do medicamento.*

Os estudos de estabilidade são fundamentais para a garantia da saúde dos pacientes, pois a perda de estabilidade dos medicamentos relaciona-se à perda do efeito terapêutico ou à formação de produtos de degradação tóxicos (BAJAJ; SINGLA; SAKHUJA, 2012).

De acordo com a ANVISA, os estudos de estabilidade são divididos em: estabilidade acelerada, de acompanhamento, longa duração, em uso, reduzido e fotoestabilidade. Nesse estudo nos ateremos a dois tipos de estabilidade longa duração e acelerada (ANVISA, 2019; FACCI et al., 2020).

### **2.5.1 Estudo de Estabilidade de Longa Duração**

Segundo a RDC nº 318/2019, estudo de estabilidade de longa duração é:

*Estudo projetado para verificação das características físicas, químicas e microbiológicas de IFA ou medicamento, nas Condições de Armazenamento e Prazo de Validade propostos, podendo também ser utilizado para definição do prazo de reteste do IFA.*

Esse estudo deve ser realizado no tempo inicial, a cada três meses durante o primeiro ano, a cada seis meses durante o segundo ano e anualmente após vinte e

quatro meses, até o final do prazo de validade (ANVISA, 2019). O material de estudo, ou seja, o lote piloto deve estar armazenado conforme descrito na tabela 1.

**Tabela 1** - Condições de armazenamento e de realização de estudo de estabilidade de longa duração e acelerado para medicamentos

<b>Condição de Armazenamento</b>	<b>Estudo de Longa Duração</b>	<b>Estudo de Estabilidade Acelerado</b>
<b>-25°C a -15°C</b>	<b>-20°C±5°C</b>	<b>Não há</b>
<b>Refrigeração (2-8°C)</b>	<b>5±3°C</b>	<b>25°C±2°C/60%UR±5%UR ou 30°C±2°C/75%UR±5%UR ou 30°C±2°C/65%UR±5%UR</b>
<b>Temperatura ambiente (entre 15°C e 30°C) - produtos de base aquosa</b>	<b>30°C±2°C/35%UR±5%UR</b>	<b>40°C±2°C/25%UR±5%UR</b>
<b>Temperatura ambiente (entre 15°C e 30°C) - demais produtos</b>	<b>30°C±2°C/75%UR±5%UR</b>	<b>40°C±2°C/75%UR±5%UR</b>

Fonte: ANVISA, 2019.

## 2.5.2 Estudo de Estabilidade Acelerado

De acordo com a RDC nº 318/2019, estudo de estabilidade de longa duração é caracterizado como:

Estudo projetado para avaliar possíveis alterações físicas, químicas e microbiológicas de IFA ou medicamentos, em condições forçadas de armazenamento, visando a auxiliar na determinação do Prazo de Reteste do IFA ou Prazo de Validade do IFA e do medicamento e a avaliar o efeito de curtas excursões fora dos Cuidados de Conservação preconizados.

A RDC preconiza a realização dos testes em três tempos, sendo eles, tempo inicial, três e seis meses, sob condições controladas (tabela 1) (ANVISA, 2019).

A RDC nº 318/2019 também normatiza que mudanças significativas como perda de 5% da potência ou qualquer resultado fora dos limites da especificação durante os testes de estabilidade acelerado, o prazo de validade provisório será baseado na avaliação estatística dos estudos de estabilidade de longa duração (ANVISA, 2019).

# *Objetivos*

---

---

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Geral**

Avaliar a atividade espasmolítica (*in vitro*) do produto fitoterápico Funchicórea®, pó, fornecido pelo Laboratório Melpoejo Ltda, com base na Resolução vigente, para fins de realizar protocolos experimentais com a finalidade de verificar a estabilidade biológica de 3 lotes pilotos do fitoterápico. Bem como, avaliar o envolvimento da atividade antioxidante no mecanismo de ação de Funchicórea®.

#### **3.2 Específicos**

- Avaliar a responsividade do íleo de ratos para a antiga e a nova formulação de Funchicórea®, frente ao agonista farmacológico (Carbacol) e soluções despolarizantes (KCl) em 3 lotes pilotos.
- Demonstrar que a retirada do óleo de funcho e a mudança dos excipientes da nova formulação não alteram a potência e a eficácia de Funchicórea®.
- Avaliar o envolvimento da atividade antioxidante no mecanismo de ação de Funchicórea®.
- Avaliar, durante o período de até 12 meses, a estabilidade farmacológica para 3 lotes pilotos, de acordo com a responsividade do íleo de ratos para a nova formulação de Funchicórea®, frente ao carbacol e KCl.
- Avaliar a responsividade do íleo de ratos para a nova formulação de Funchicórea®, frente ao carbacol e KCl, assim que 3 lotes pilotos forem fabricados. Considerando esse o tempo 0.
- Avaliar a estabilidade acelerada da nova formulação de funchicórea com 3 e 6 meses da fabricação dos 3 lotes pilotos, frente a responsividade do íleo de ratos para a nova formulação de Funchicórea®, utilizando como agentes contráteis o carbacol e o KCl.
- Avaliar a estabilidade de longa duração da nova formulação de Funchicórea®

com 3, 6, 9 e 12 meses da fabricação dos 3 lotes pilotos, no tocante a responsividade do óleo de ratos, utilizando como agentes contráteis o carbacol e o KCl.

# *Materiais e Métodos*

---

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Animais

Para os protocolos com envolvimento de animais, usou-se ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), com aproximadamente 250-300g. Os animais foram provenientes da Unidade de produção animal do IPerFarM/UFPB e mantidos no Biotério do Laboratório Pré-Clínico em Envelhecimento no IPE/UFPB sob uma condição controlada de temperatura ( $21 \pm 1$  °C), em um ciclo claro-escuro de 12 horas e com livre acesso à água e ração tipo "pellets", Quintia. Antes dos experimentos os animais foram submetidos a um jejum por 18h com acesso a água *ad libitum*.

Os animais foram acomodados em gaiolas plásticas micro-isoladoras de dimensão 49x34x16 (CxLxA, em cm), cada uma com no máximo 4 ratos. Todos os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal da Paraíba, nº 7597240521. Os animais foram tratados e manipulados seguindo as recomendações da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), obedecendo aos preceitos da lei 11.794/2008 e ainda da resolução nº 879/2008.

### 4.2 Drogas e Reagentes

Cloreto de potássio (KCl) e cloreto de sódio (NaCl) foram adquiridos da Química Moderna (Brasil), cloreto de magnésio ( $MgCl_2$ ) e glicose ( $C_6H_{12}O_6$ ) da NEON (Brasil), cloreto de cálcio ( $CaCl_2$ ) da Vetec Química Fina Ltda. (Brasil). Bicarbonato de sódio ( $NaHCO_3$ ) da Anidrol (Brasil). fosfato de sódio monobásico ( $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ ) e fosfato de sódio bifásico ( $Na_2HPO_4$ ) adquiridos da Dinâmica (Brasil).

O cloridrato de carbamilcolina (Carbacol, CCh), adquirido da Merck (EUA). Ácido ascórbico, metanol adquiridos da Dinâmica (Brasil). O DPPH da Sigma-Aldrich (Brasil). Todas as substâncias foram diluídas em água destilada ou conforme necessário para cada protocolo experimental. A mistura de carbogênio (95% de  $O_2$  e 5% de  $CO_2$ ) foi obtida da empresa White Martins (Brasil).

### 4.3 Formulações de Funchicórea®

As formulações de Funchicórea® foram cedidas pela empresa Melpoejo LTDA. A primeira formulação estudada, designada de antiga formulação, é composta pelas raízes de *Rheum palmatum* L., extrato mole de *Cichorium intybus* L., aroma natural de funcho (*Foeniculum vulgare* Mill.), sacarina sódica e carbonato de magnésio (Tabela 2). A segunda formulação, denominada de nova formulação, contém raízes de *Rheum palmatum* L., extrato mole de *Cichorium intybus* L., sucralose e carbonato de magnésio (Tabela 3).

**Tabela 2** - Composição da antiga formulação de Funchicórea®

Raíz de <i>Rheum palmatum</i> L.	95,15 mg
Extrato mole de <i>Cichorium intybus</i> L.	48,67 mg
Excipientes (Aroma natural de funcho, sacarina e carbonato de magnésio)	q.s.p. 730 mg

Fonte: Melpoejo, 2012.

**Tabela 3** - Composição da nova formulação de Funchicórea®

Raíz de <i>Rheum palmatum</i> L.	48,67 mg
Extrato mole de <i>Cichorium intybus</i> L.	48,67 mg
Excipientes (sucralose e carbonato de magnésio)	q.s.p. 730 mg

Fonte: Melpoejo, 2020.

### 4.4 Soluções Nutritivas

Para preparar as soluções nutritivas foram utilizadas as seguintes substâncias: NaCl, KCl, CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>, NaHCO<sub>3</sub> e NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

As tabelas a seguir mostram as composições das soluções nutritivas utilizadas:

**Tabela 4-** Composição da solução de Tyrode para íleo

Substâncias	Concentrações (mmol/L)
NaCl	158,29

KCl	4,0
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	1,05
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,41
NaHCO <sub>3</sub>	10,0
C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	5,6
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	2,0

Fonte: TANAKA et al., 1999.

**Tabela 5-** Composição da solução de KCl 40mM

<b>Substâncias</b>	<b>Concentrações (mmol/L)</b>
NaCl	118,29
KCl	40,0
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	1,05
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,41
NaHCO <sub>3</sub>	10,0
C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	5,6
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	2,0

Fonte: TANAKA et al., 1999.

**Tabela 6-** Composição do PBS

<b>Substâncias</b>	<b>Concentrações (mmol/L)</b>
NaCl	161,00
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	1,8
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	15,8

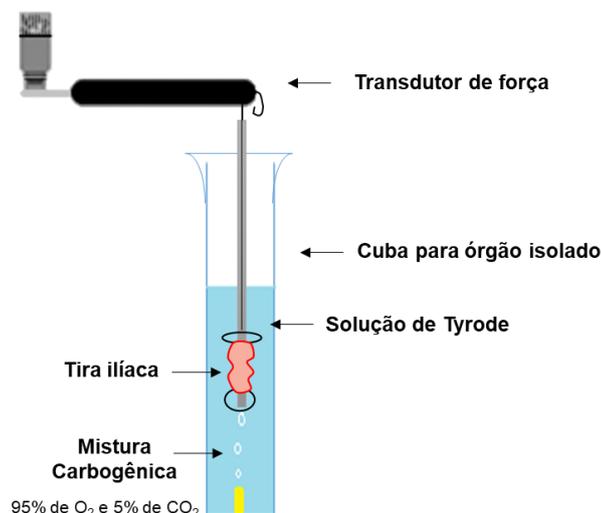
Fonte: FOLDVARI et al., 1998.

#### 4.5 Preparação de íleo isolado de rato

Após a eutanásia, foi realizada uma incisão abdominal e o íleo removido, limpo de tecido conjuntivo e adiposo, e seccionada em segmentos de (2-3 cm). Para registrar as contrações isotônicas, os segmentos de íleo foram suspensos verticalmente por linha de algodão fixadas a um transdutor de força (MLT0201, ADInstruments) e inseridas dentro de cubas para banhos de órgãos (10 mL) (PanlabMulti Chamber Organ Baths, ADInstruments), preenchidas com a uma solução fisiológica de Tyrode (tabela 1), com o pH de 7,4, e acoplado a um amplificador de

sinal Quad Bridge amp (PowerLab 8/30, ADInstruments) e um sistema de aquisição de dados (Software Labchart 7.0, ADInstruments) . O íleo foi estabilizado por 30 min, sendo a solução nutritiva trocada a cada 10 min, sob uma tensão de repouso de 1g a 37°C e aerado com uma mistura carbogênica (95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>) (Figura 4).

**Figura 4-** Representação esquemática da montagem in vitro de tiras ílicas em cuba de banho de órgãos isolado.



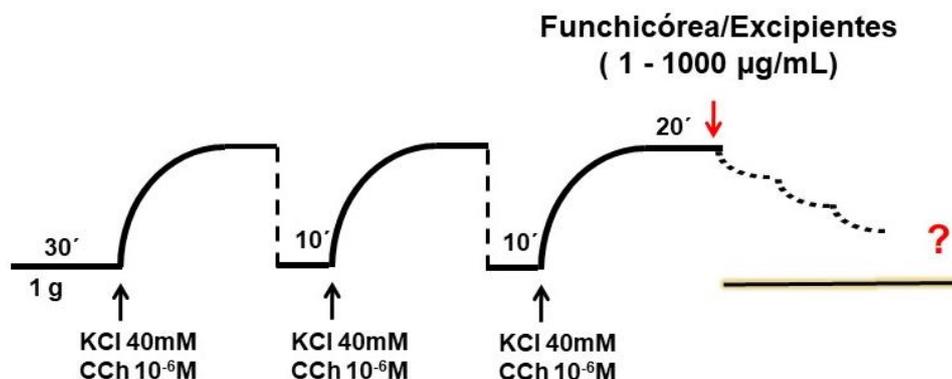
Fonte: Adaptado de MACHADO-TABOSA; ASSIS; FURTADO, 2013.

#### 4.6 Efeito de Funchicórea® sobre a reatividade contrátil do íleo isolado de rato frente ao Carbacol (1 µM) e ao KCl (40 mM)

O íleo foi isolado e montado como descrito no item 4.1.5. Para a realização dos protocolos experimentais, após o período de estabilização de 30 min para verificar a funcionalidade do órgão, foram induzidas duas contrações, com intuito de pré-sensibilizar as tiras ílicas. Sendo elas, eletromecânica, com KCl (40 mM), um agente despolarizante (REVUELTA; CANTABRANA; HIDALGO, 1997) ou farmacomecânica, com CCh (1µM), um parassimpático mimético (TSCHIRHART et al., 1987). Em seguida, curvas concentração-respostas de diferentes lotes com dois tipos de excipientes (1–1000 µg/mL), sendo o com sacarina, óleo de funcho e carbonato de magnésio, referente a formulação antiga e o com sucralose e carbonato de magnésio, referente a nova formulação. Bem como, curvas com as duas formulações de funchicórea® (1–1000 µg/mL) frente as contrações tônicas induzidas por 40 mM de KCl ou 1 µM de carbacol foram construídas (Figura 5). A reatividade contrátil foi avaliada com base nos valores da análise do perfil (“plot”) das curvas concentração-

resposta, da análise da concentração efetiva 50% (CE50), do pD2 (potência) e do efeito máximo (Emax).

**Figura 5** - Delineamento representativo para avaliação da resposta espasmolítica em íleo isolado de rato.



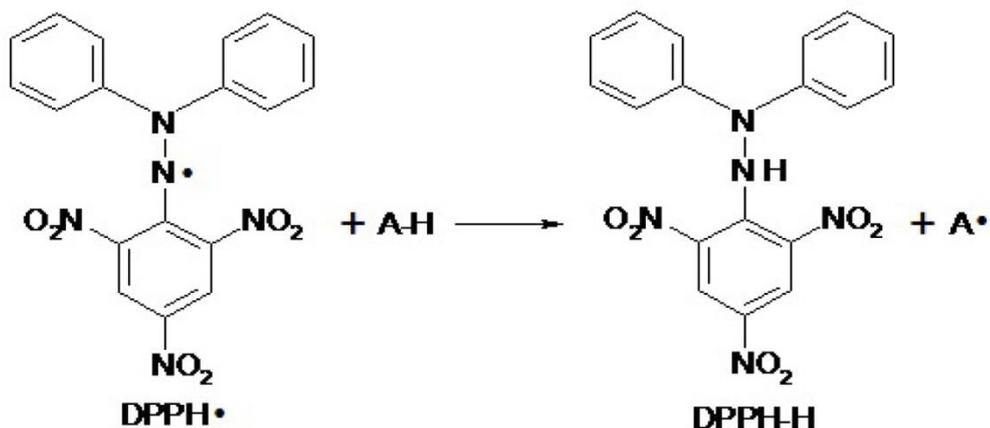
Fonte: VERAS, 2022.

## 4.7 Avaliação da atividade antioxidante

### 4.7.1 Determinação da Atividade Sequestradora de Radicais DPPH•

A capacidade antirradicalar de funchicórea® foi determinada pelo teste DPPH (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995). O método de determinação da atividade sequestradora é baseado na eliminação do radical livre estável 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH•), que ocorre principalmente pelo mecanismo de transferência de elétrons (Figura 6) (Oliveira, 2015).

**Figura 6**- Mecanismo de reação entre o radical DPPH• e um antioxidante através de transferência de um átomo de hidrogênio.



Fonte: OLIVEIRA, 2015.

Para realização deste ensaio foi empregado o método de microdiluição, adaptado de Garcez e colaboradores (2009). A solução de DPPH• foi preparada a 0,3 mM (diluída em 100 mL de metanol (MeOH)). Como padrão utilizou-se o ácido ascórbico em 8 concentrações (1,5; 3,0; 4,5; 6,0; 7,5; 9,0; 10,5; 12,0 µg/mL). O funchicórea® foi utilizada nas concentrações de 650 a 1500 µg/mL, todos diluídos em MeOH. Devido o funchicórea® forma uma suspensão ao ser diluída em metanol, após a diluição todas as amostras foram sonicadas (Lavadora Ultrassônica, Q13/37A, Ultronique) por 5 min e a posteriori centrifugadas (Centrífuga SL-702 SOLAB) por 5 min a 2000 rpm. O sobrenadante obtido foi transferido para placa de 96 poços.

Após a transferência de funchicórea® ou ácido ascórbico (100ul), foi adicionado o DPPH• (0,3mM). O metanol foi utilizado como controle negativo e o branco a amostra diluída em metanol. Todo o procedimento realizou-se em triplicata.

Após a incubação do DPPH•, a reação foi esperada por 30 min em temperatura ambiente e ausência de luz. Em seguida, realizou-se a leitura da absorbância a 517 nm, em espectrofotômetro (Leitor de microplacas multidetector Synergy™ HTX - BioTek). Com isso, obteve-se a avaliação do decréscimo da concentração do radical DPPH.

Para o cálculo da % de atividade antioxidante, ou seja, a capacidade de sequestro do radical DPPH, utilizou-se a seguinte equação:

$$\%AA = \frac{\{[ABS_{controle\ negativo} - (ABS_{amostra} - ABS_{branco})] \times 100\}}{ABS_{controle\ negativo}}$$

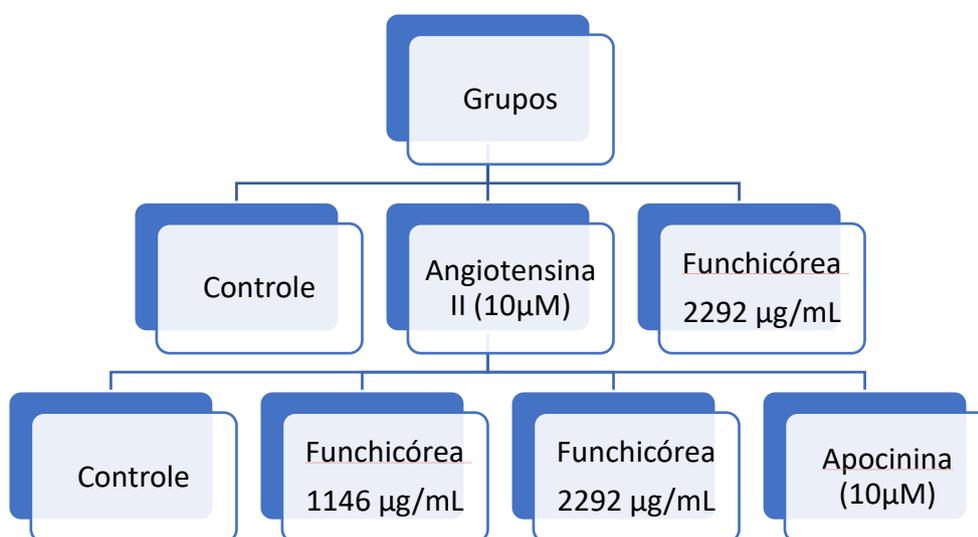
Os resultados obtidos foram expressos pelo método de regressão linear, de acordo com a concentração efetiva para sequestrar 50% dos radicais livres (CE<sub>50</sub>).

#### **4.7.2 Avaliação do estresse oxidativo induzido por angiotensina II em íleo isolado de rato**

Após a retirada do íleo do animal, o órgão foi colocado em solução de PBS para realização da limpeza e corte das tiras ílicas. As tiras foram colocadas em microtubos de 1mL e divididos em 6 grupos, o controle negativo, incubado apenas com PBS, o controle de funchicórea®, utilizando PBS e funchicórea® 2292 µg/mL, grupo controle de angiotensina II (10µM), grupo Funchicórea® (1146 µg/mL), grupo Funchicórea®

(2292 µg/mL) e grupo apocinina (10µM), todos os grupos foram incubados por 60 min a 37°C em estufa. Os grupos testes foram induzidos ao estresse oxidativo pela angiotensina II (10µM) por 30 min em estufa a 37°C e após esse tempo será adicionada as diferentes concentrações de Funchicórea® (1146 µg/mL), Funchicórea® (2292 µg/mL) e incubados por mais 30 min. Para fins de comparação foi utilizada a apocinina (10µM), inibidor da NADPH (CÔCO et al., 2016). Neste grupo, primeiramente incubará a apocinina por 30 min a 37°C e após os 30 min será incubado a angiotensina II (figura 7).

**Figura 7-** Esquema representativo dos grupos experimentais.



Fonte: Veras, 2022.

Após a incubação as tiras ilíacas foram lavadas com PBS, incluídas em OCT e congeladas em freezer -80°C. Após o congelamento, foram seccionadas em cortes transversais por um criostato (Cryostat Leica, Nussloc, Alemanha), na espessura de 5µM, à temperatura de -20°C.

Para a realização da medida dos ânions O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, os cortes transversais do íleo foram lavados com solução PBS, e incubados com DHE (10 µM), durante 30 min, à temperatura de 37° C em câmara úmida, ao abrigo da luz. Após o período de incubação, os cortes foram novamente lavados com PBS para remoção do excesso da sonda fluorescente, e levadas, imediatamente, ao microscópio de fluorescência (NIKON Eclipse Ti-E, NIKON, Japão) para análise.

O processamento das amostras dos diferentes grupos de estudo e obtenção das imagens foi realizado em paralelo, a partir das mesmas configurações do laser. Determinou-se a intensidade de fluorescência utilizando o software NIS Elements versão 4.02. Os níveis de ânions superóxidos, nos diferentes grupos, foram expressos na forma de  $\Delta$  de porcentagem de fluorescência, normalizados pela fluorescência emitida pela DHE do grupo controle. A fluorescência obtida para os diferentes grupos de tratamento será determinada de acordo com a seguinte equação:

$$\Delta\% \text{ Fluorescência} = (\text{TRATADA} - \text{CONTROLE}) \times 100 / \text{CONTROLE}.$$

#### **4.7.3 Investigação da participação das enzimas Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADPH) oxidase**

O íleo foi isolado e montado como descrito anteriormente. Após um período de estabilização de 30 min para verificar a funcionalidade do órgão, foram induzidas duas contrações com carbacol 1  $\mu\text{M}$ . Após essas contrações a apocinina ( $10^{-4}$  M), inibidora da NADPH oxidase (CÔCO et al., 2016) ou o tempol ( $10^{-3}$  M), um mimético da SOD (PEIXOTO et al., 2009) foram incubados durante 30 min, em preparações distintas e, em seguida, era induzida uma nova contração com CCh (1  $\mu\text{M}$ ), na fase tônica da contração, uma curva concentração-resposta de Funchicórea<sup>®</sup> foi construída.

#### **4.8 Avaliação da estabilidade de diferentes lotes pilotos de Funchicórea<sup>®</sup>**

Realizou-se os testes em 3 lotes pilotos de Funchicórea<sup>®</sup>. Esses foram submetidos a testes de estabilidade de longa duração e de estabilidade acelerada em diferentes tempos. Sendo eles, o tempo 0, que corresponde ao momento que termina a fabricação do lote, com 3 e 6 meses foram realizados estudos acelerados e de longa duração, com 9 e 12 meses apenas testes de estabilidade de longa duração. Os estudos eram realizados de acordo com o que está preconizado na RDC 318 de 6 de novembro de 2019 da ANVISA (Tabela 7).

Nesses testes verificou-se a estabilidade frente a manutenção do efeito espasmolítico de Funchicórea<sup>®</sup> nos diferentes lotes e tempos. Para isso a metodologia utilizada é a mesma descrita no item 4.1.6.

**Tabela 7 - Delineamento dos estudos de estabilidade**

<b>Estudo Tempo</b>	<b>Estabilidade Longa Duração</b>	<b>Estabilidade Acelerada</b>
<b>T0</b>	Sim	Sim
<b>T3</b>	Sim	Sim
<b>T6</b>	Sim	Sim
<b>T9</b>	Sim	Não
<b>T12</b>	Sim	Não

Fonte: Veras, 2022.

#### **4.9 Análise Estatística**

Todos os dados foram expressos como média mais ou menos o erro padrão da média. Para a análise estatística das curvas concentração-resposta foram utilizados os valores de  $CE_{50}$  (concentração de uma substância que induz 50% do seu efeito máximo),  $pCE_{50}$  (logaritmo negativo da concentração de uma substância que induz 50% do seu efeito máximo) e o  $E_{máx}$  (efeito máximo do percentual de relaxamento), calculados a partir da regressão (não linear e linear) das respostas obtidas.

As análises estatísticas serão feitas utilizando regressão linear, teste t de Student ou análise de variância “one- way” (ANOVA) seguido de teste de Bonferroni ou Tukey, quando apropriado e serão considerados significantes os valores com  $p < 0,05$ . Os programas utilizados para análise dos dados serão Graph Pad Prism versão 8.0<sup>®</sup>.

# *Resultados*

---

---

## 5. RESULTADOS

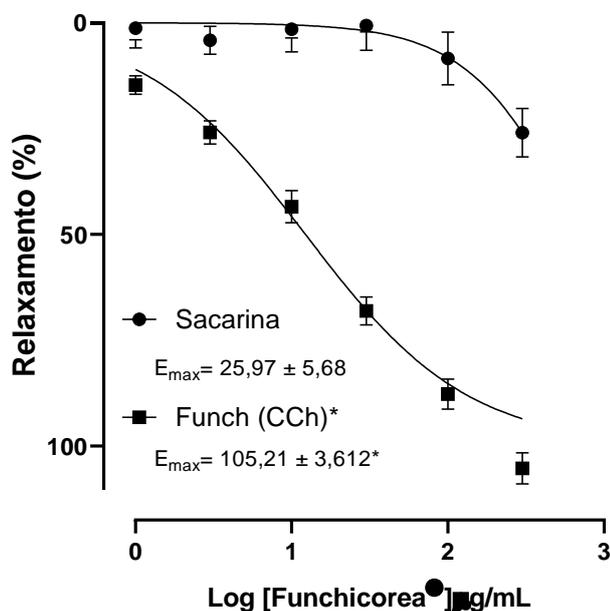
### 5.1 Efeito da antiga formulação de Funchicórea® sobre a reatividade contrátil do íleo isolado de rato frente ao Carbacol (1 $\mu$ M) e ao KCl (40 mM)

Em tiras ílicas de ratos pré-contraídas com CCh (1  $\mu$ M), a adição crescente e cumulativa do excipiente (1-1000  $\mu$ g/mL) induziu um relaxamento, de maneira dependente de concentração ( $E_{m\acute{a}x} = 25,97 \pm 5,68$ ) (Figura 8). De forma semelhante, na presença de uma solução despolarizante de KCl 40 mM ( $E_{m\acute{a}x} = 25,301 \pm 5,53$ ) (figura 8b), o excipiente promoveu resposta relaxante dependente de concentração, com efeito máximo estatisticamente semelhantes ao obtido com contrações induzidas com CCh (Figura 8b).

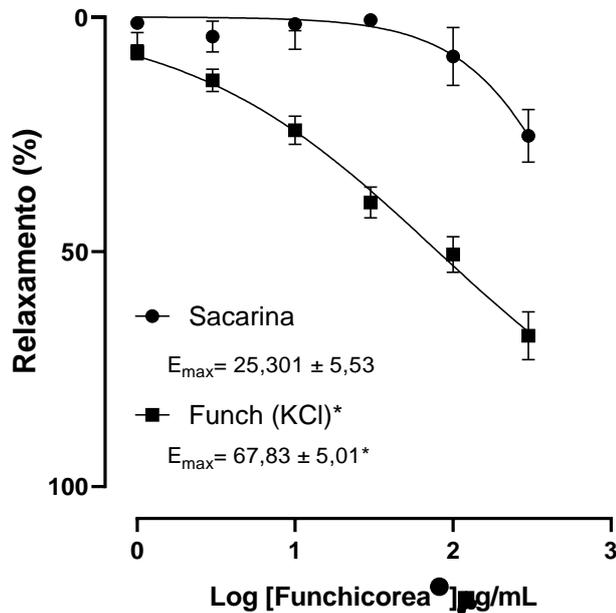
A adição cumulativa de funchicórea® (1-1000  $\mu$ g/mL) em tiras ílicas de ratos, pré-contraídas com CCh (1 $\mu$ M) ou KCl (40 mM), promoveu um relaxamento dependente de concentração. Entretanto, na presença do CCh (figura 8a) ( $E_{m\acute{a}x} = 105,21 \pm 3,61$ ) o funchicórea® apresentou um aumento da magnitude de efeito máximo quando comparado a contração induzida por KCl (figura 8b) ( $E_{m\acute{a}x} = 67,83 \pm 5,01$ ).

**Figura 8** - Curva concentração-resposta de concentrações crescentes de excipiente e funchicórea®, antiga formulação, (1-1000  $\mu$ g/mL) em tiras ílicas pré-contraídas com CCh (1 $\mu$ M) e KCl (40mM).

a.



b.



- a. Curva concentração-resposta de concentrações crescentes (1-1000 µg/mL) de excipiente (n= 9; ●) e Funchicórea®, antiga formulação, (n= 20, referente aos 3 lotes; ■) em tiras ilíacas pré-contraídas com CCh (1µM). Os resultados estão expressos como média ± e.p.m. Os dados foram analisados utilizando o teste estatístico *t de student* não pareado. \*p < 0,05 vs excipiente.
- b. Curva concentração-resposta de concentrações crescentes (1-1000 µg/mL) de excipiente (n= 9; ●) e Funchicórea®, antiga formulação, (n= 19, referente aos 3 lotes; ■) em tiras ilíacas pré-contraídas com KCl (40mM). Os resultados estão expressos como média ± e.p.m. Os dados foram analisados utilizando o teste estatístico *t de student* não pareado. \*p < 0,05 vs excipiente.

Ao comparar efeito relaxante mediado pelos excipientes e funchicórea®, observou-se que a formulação induziu um aumento da magnitude do efeito máximo. Demonstrando que a maior parte do efeito formulação é induzida pela presença de ruibarbo e chicória.

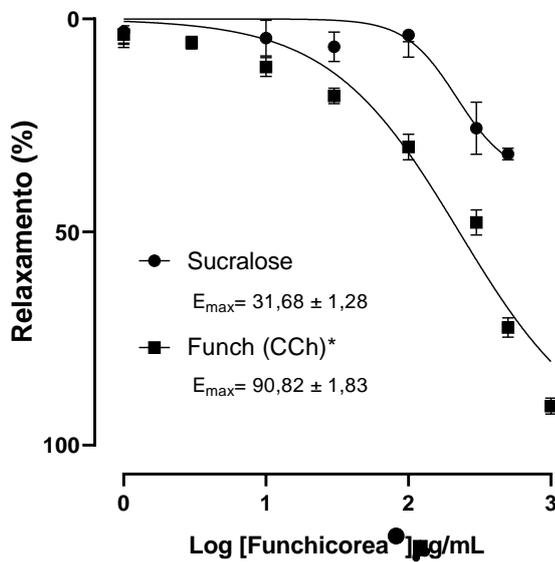
## 5.2 Efeito da nova formulação de Funchicórea® sobre a reatividade contrátil do íleo isolado de rato frente ao Carbacol (1 µM) e ao KCl (40 mM)

Em tiras ilíacas de ratos pré-contraídas com CCh (1 µM), a adição crescente e cumulativa do excipiente (1-1000 µg/mL) induziu um relaxamento, de maneira dependente de concentração (figura 9a) ( $E_{m\acute{a}x} = 31,68 \pm 1,28$ ). De forma semelhante, na presença de uma solução despolarizante de KCl 40 mM (figura 9b) ( $E_{m\acute{a}x} = 28,513 \pm 5,219$ ), o excipiente promoveu resposta relaxante dependente de concentração, com efeito máximo estatisticamente semelhantes ao obtido com contrações induzidas com CCh.

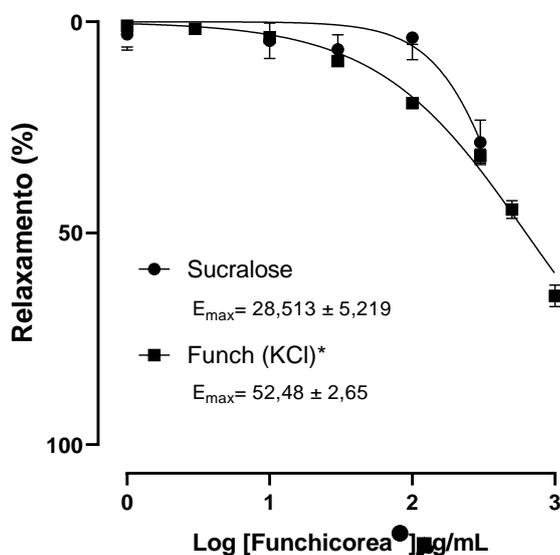
A adição cumulativa de funchicórea® (1-1000 µg/mL) em tiras ilíacas de ratos, pré-contraídas com CCh (1µM) ou KCl (40 mM), promoveu um relaxamento dependente de concentração. Entretanto, na presença do CCh (figura 9a) ( $E_{\max}=90,82 \pm 1,83$ ) o funchicórea® apresentou um aumento da magnitude de efeito máximo quando comparado a contração induzida pelo KCl (figura 9b) ( $E_{\max}=52,48 \pm 2,65$ ).

**Figura 9** - Curva concentração-resposta de concentrações crescentes de excipiente e funchicórea®, nova formulação, (1-1000 µg/mL) em tiras ilíacas pré-contraídas com CCh (1µM) e KCl (40mM).

a.



b.



- a. Curva concentração-resposta de concentrações crescentes (1-1000 µg/mL) de excipiente (n= 6; ●) e Funchicórea®, nova formulação, (n= 18, referente aos 3 lotes; ■) em tiras ilíacas pré-contraídas com CCh (1µM). Os resultados estão expressos como média ± e.p.m. Os dados foram analisados utilizando o teste estatístico *t de student* não pareado. \*p < 0,05 vs excipiente.
- b. Curva concentração-resposta de concentrações crescentes (1-1000 µg/mL) de excipiente (n= 6; ●) e Funchicórea®, nova formulação, (n= 29, referente aos 3 lotes; ■) em tiras ilíacas pré-contraídas com KCl (40mM). Os resultados estão expressos como média ± e.p.m. Os dados foram analisados utilizando o teste estatístico *t de student* não pareado. \*p < 0,05 vs excipiente.

Ao comparar efeito relaxante mediado pelos excipientes e funchicórea®, observou-se que a formulação induziu um aumento da magnitude do efeito máximo. Demonstrando que a maior parte do efeito formulação é induzida pela presença de funchicórea®.

### 5.3 Avaliação da atividade antioxidante

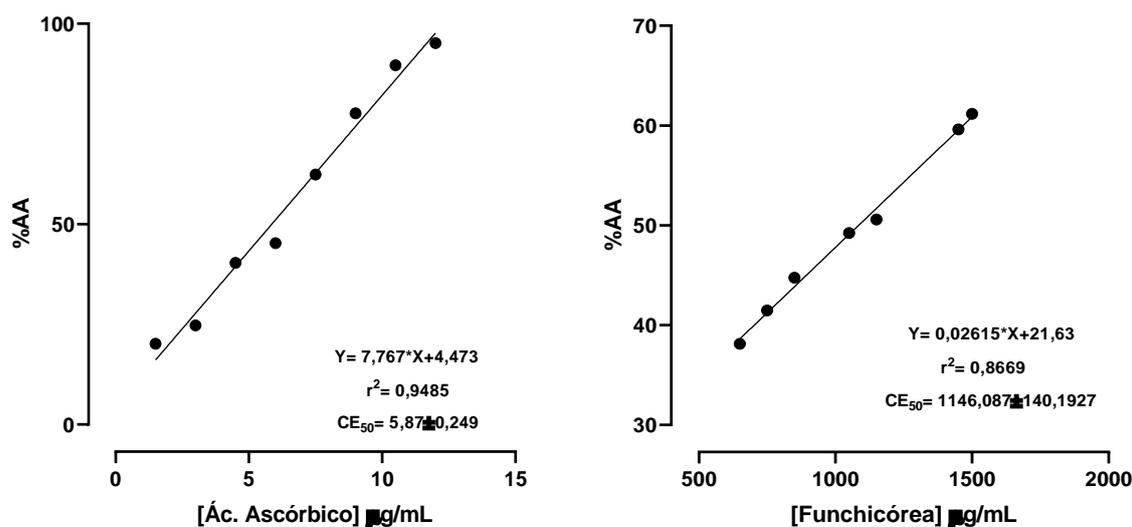
#### 5.3.1 Determinação da Atividade Sequestradora de Radicais DPPH●

A determinação da atividade antioxidante *in vitro*, foi demonstrada pelo sequestro do radical livre (DPPH●) de maneira dependente de concentração. O funchicórea® apresentou uma CE<sub>50</sub> = 1146,087 ± 140,1927 µg/mL (gráfico7 b). Ao comparar com um antioxidante clássico, o ácido ascórbico com CE<sub>50</sub> = 5,87± 0,249 µg/mL (gráfico7 a), observa-se que funchicórea® apresentou baixa atividade antioxidante *in vitro*.

**Figura 10** - Medida da capacidade sequestradora de radical livre DPPH● e atividade antioxidante *in vitro* de Funchicórea®.

a. Curva padrão de Ácido Ascórbico

b. Curva de Funchicórea®

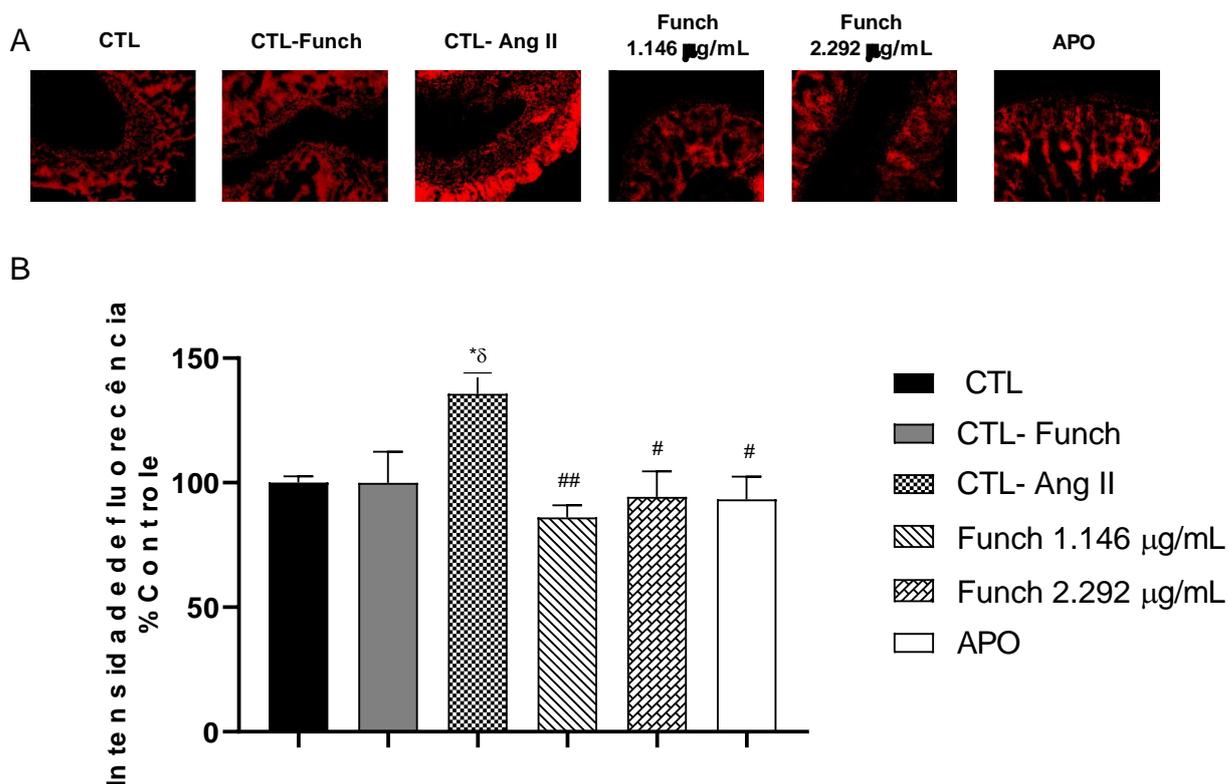


- a. Curva representativa dos valores de % de atividade antioxidante para diferentes concentrações de ácido ascórbico (1,5; 3,0; 4,5; 6,0; 7,5; 9,0; 10,5; 12,0). A atividade antioxidante foi expressa por meio do valor de  $IC_{50}$  (calculado a partir da equação da reta). Os dados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m analisados utilizando teste de regressão linear. B. Curva representativa dos valores de % de atividade antioxidante para diferentes concentrações de Funchicórea® (650; 750; 850; 1050; 1150; 1450; 1500). A atividade antioxidante foi expressa por meio do valor de  $IC_{50}$  (calculado a partir da equação da reta). Os dados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m analisados utilizando teste de regressão linear.

### 5.3.2 Avaliação do estresse oxidativo induzido por angiotensina II em íleo isolado de rato

A avaliação do estresse oxidativo demonstra que o grupo CTL ( $50,79 \pm 1,31$  %,  $n=4$ ) não apresentou diferença estatística quando comparando ao grupo CTL-Funch ( $50,77 \pm 6,36$  %,  $n=4$ ). Em contrapartida, ambos os grupos descritos anteriormente apresentaram diferença estatística ( $p>0,05$ ) para o CTL-Ang II ( $68,73 \pm 4,15$  %,  $n=4$ ), observando-se o aumento da intensidade de fluorescência nesse grupo. De maneira interessante, os grupos Funch 1146 µg/mL ( $43,69 \pm 2,48$  %,  $n=4$ ), Funch 2292 µg/mL ( $47,90 \pm 5,24$  %,  $n=4$ ), APO ( $47,38 \pm 4,67$  %,  $n=4$ ) apresentaram uma redução da intensidade de fluorescência quando comparado ao grupo CTL-Ang (Figura 11).

**Figura 11** - Efeito de Funchicórea® sobre a intensidade de fluorescência do DHE em íleo.



Medida da intensidade de fluorescência basal da sonda DHE em cortes transversais de íleo de rato dos diferentes grupos experimentais. Grupos: CTL (n = 4); CTL-Funch (n = 4); CTL-AngII (n = 4); Funch 1146 µg/mL (n = 4); Funch 2292 µg/mL (n = 4) e APO (n=4). A. Imagens da intensidade de fluorescência basal emitida pela sonda DHE em cortes histológicos de íleo dos diferentes grupos experimentais (objetiva 10 X). B. Gráfico da intensidade relativa de fluorescência basal (%) de DHE em cortes histológicos de íleo dos diferentes grupos experimentais. Os dados estão expressos em valores médios de porcentagem de fluorescência em relação ao controle ± e.p.m. \*p < 0,05 vs CTL, δ p < 0,05 vs CTL-Funch, # p < 0,05 vs CTL-Ang II.

## 5.4 Avaliação da estabilidade de diferentes lotes pilotos de Funchicórea®

### 5.4.1 Estudo de Estabilidade de Três Meses

A adição cumulativa de funchicórea® (1-1000 µg/mL) em tiras ilíacas de ratos, pré-contraídas com CCh (1µM) ou KCl (40 mM), promoveu um relaxamento dependente de concentração, no tempo “zero” (T0). Entretanto, na presença do CCh ( $E_{máx} = 90,82 \pm 1,83$ ;  $pCE_{50} = 2,36 \pm 0,12$ ) o funchicórea® apresentou uma magnitude de efeito máximo significativamente maior quando comparado ao KCl ( $E_{máx} = 52,48 \pm 2,65$ ;  $pCE_{50} = 2,339 \pm 0,26$ ) (figura 9).

Nos estudos de estabilidade ao avaliar o teste de “três” meses de longa duração (T3LD), observou-se que o relaxamento de funchicórea®, permanece no mesmo padrão do T0, ou seja, na presença do CCh ( $E_{máx} = 92,66 \pm 3,55$ ;  $pCE_{50} = 2,20 \pm 0,18$ )

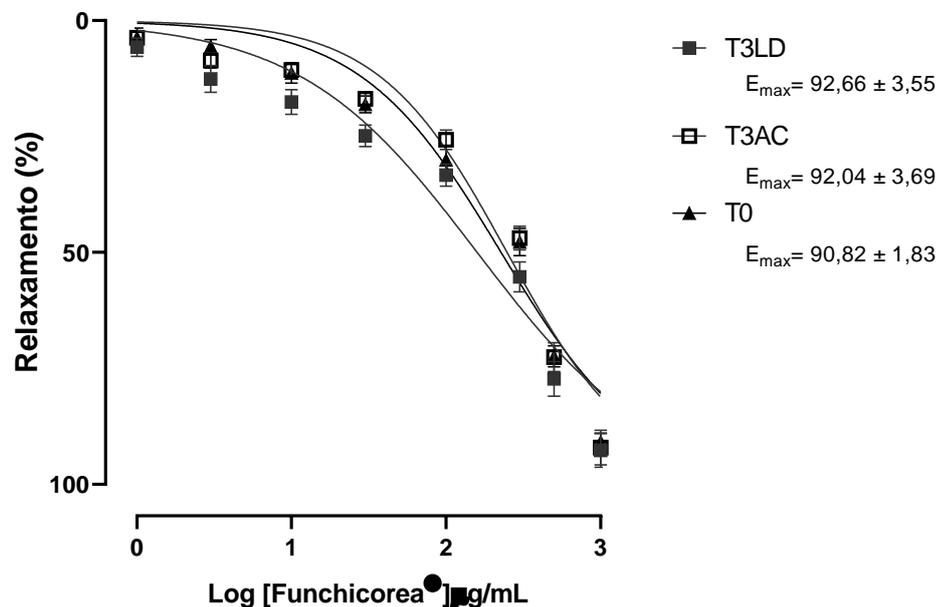
o funchicórea® apresentou uma magnitude de efeito máximo significativamente maior quando comparado ao KCl ( $E_{\text{máx}} = 56,43 \pm 2,71$ ;  $pCE_{50} = 2,61 \pm 0,14$ ) (figura 12).

De forma semelhante, no teste de estabilidade acelerado de “três” meses (T3AC), observou-se que o relaxamento de funchicórea®, permanece no mesmo padrão do T0, apresentando uma maior amplitude de efeito máximo na presença do CCh ( $E_{\text{máx}} = 92,04 \pm 3,89$ ;  $pCE_{50} = 2,40 \pm 0,11$ ) (Figura 12b) quando comparado ao KCl ( $E_{\text{máx}} = 55,88 \pm 2,19$ ;  $pCE_{50} = 2,87 \pm 0,27$ ) (Figura 12b).

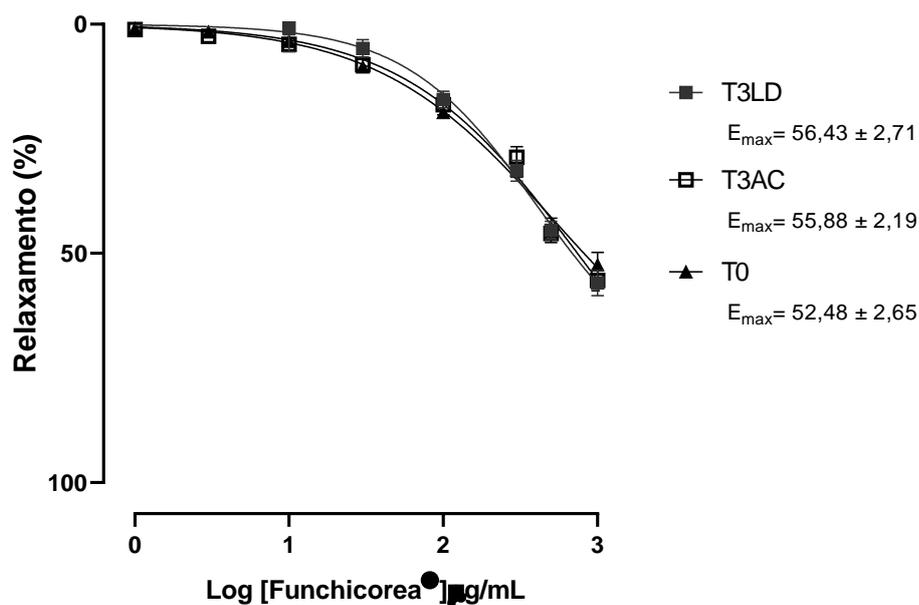
Ao comparar efeito relaxante mediado de funchicórea®, observou-se que a formulação induziu um aumento da magnitude do efeito máximo ao longo dos três meses em estudos acelerados e de longa duração. Demonstrando que a formulação de funchicórea® é estável durante esse período (figura 12).

**Figura 12** -Curva concentração-resposta de concentrações crescentes de Funchicórea® (1-1000  $\mu\text{g/mL}$ ) em tiras ilíacas pré-contraídas com CCh (1 $\mu\text{M}$ ) e KCl (40mM), no tempo “zero” (T0), no tempo “três” de estabilidade de longa duração (T3LD) e acelerada (T3AC).

a.



b.



- a. Curva concentração-resposta de concentrações crescentes (1-1000 µg/mL) de Funchicórea®, em diferentes tempos, T0 (n= 18, referente aos 3 lotes; ▲), T3LD (n= 18, referente aos 3 lotes; ■) e T3AC (n= 18, referente aos 3 lotes; □) em tiras ilíacas pré-contraídas com CCh (1µM). Os resultados estão expressos como média ± e.p.m. Os dados foram analisados utilizando o teste estatístico ANOVA one way, seguida de pós-teste de Tukey. \*p < 0,05 vs T0. b. Curva concentração-resposta de concentrações crescentes (1-1000 µg/mL) de Funchicórea®, em diferentes tempos, T0 (n= 29, referente aos 3 lotes; ▲), T3LD (n= 18, referente aos 3 lotes; ■) e T3AC (n= 20, referente aos 3 lotes; □) em tiras ilíacas pré-contraídas com KCl (40mM). Os resultados estão expressos como média ± e.p.m. Os dados foram analisados utilizando o teste estatístico ANOVA one way, seguida de pós-teste de Tukey em múltiplas comparações. \*p < 0,05 vs T0.

#### 5.4.2 Estudo de Estabilidade de Seis Meses

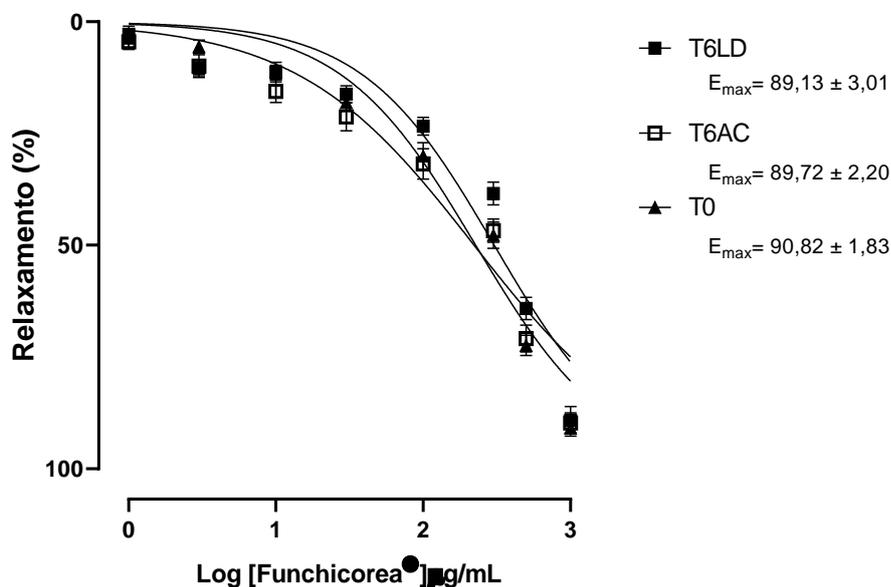
Nos estudos de estabilidade ao avaliar o teste de “seis” meses de longa duração (T6LD), observou-se que o relaxamento de funchicórea®, permanece no mesmo padrão do T0, ou seja, na presença do CCh ( $E_{m\acute{a}x} = 89,13 \pm 3,01$ ;  $pCE_{50} = 2,48 \pm 0,15$ ) o funchicórea® apresentou uma magnitude de efeito máximo significativamente maior quando comparado ao KCl ( $E_{m\acute{a}x} = 48,60 \pm 2,26$ ;  $pCE_{50} = 3,05 \pm 0,28$ ) (Figura 13).

De forma semelhante, nos estudos de estabilidade acelerado, ao avaliar o teste de “seis” meses (T6AC), observou-se que o relaxamento de funchicórea®, na presença do CCh ( $E_{m\acute{a}x} = 89,72 \pm 2,20$ ;  $pCE_{50} = 2,34 \pm 0,23$ ) apresentou uma magnitude de efeito máximo significativamente maior quando comparado ao KCl ( $E_{m\acute{a}x} = 54,33 \pm 1,50$ ;  $pCE_{50} = 2,87 \pm 0,29$ ), permanecendo no mesmo padrão do T0 (Figura 13).

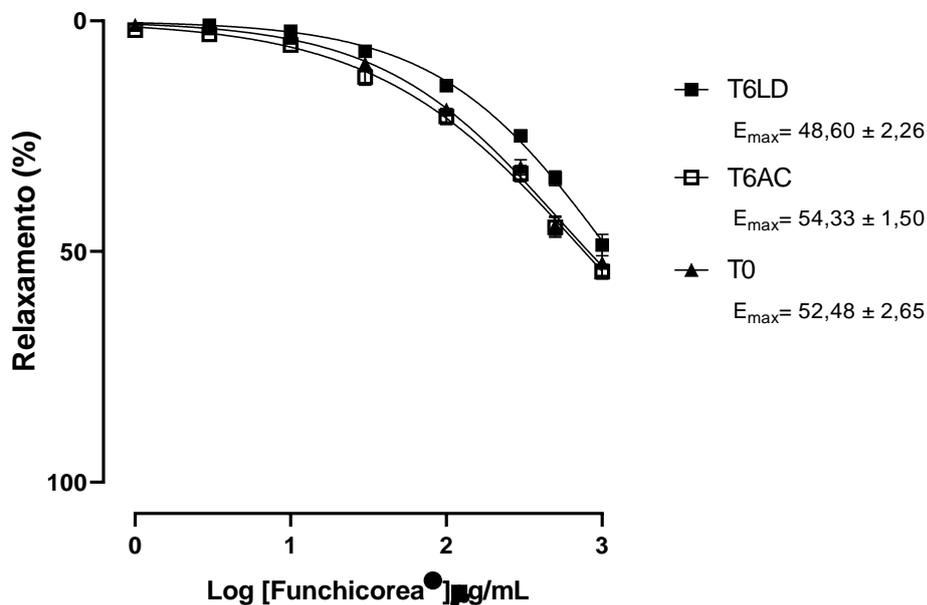
**Figura 13** - Curva concentração-resposta de concentrações crescentes de funchicórea® (1-1000 µg/mL) em tiras ilíacas pré-contraídas com CCh (1µM) e KCl

(40mM), no tempo “zero” (T0), no tempo “seis” de estabilidade de longa duração (T6LD) e acelerada (T6AC).

a.



b.



a. Curva concentração-resposta de concentrações crescentes (1-1000 µg/mL) de Funchicórea®, em diferentes tempos, T0 (n= 18, referente aos 3 lotes; ▲), T6LD (n= 18, referente aos 3 lotes; ■) e T6AC (n= 18, referente aos 3 lotes; □) em tiras ilíacas pré-contraídas com CCh (1µM). Os resultados estão expressos como média ± e.p.m. Os dados foram analisados utilizando o teste estatístico ANOVA one way, seguida de pós-teste de Tukey. \*p < 0,05 vs T0. b. Curva concentração-resposta de concentrações crescentes (1-1000 µg/mL) de Funchicórea®, em diferentes tempos, T0 (n= 29, referente aos 3 lotes; ▲), T6LD (n= 18, referente aos 3 lotes; ■) e T6AC (n= 18, referente aos 3 lotes; □) em tiras ilíacas pré-contraídas com KCl (40mM). Os resultados estão expressos como média ± e.p.m. Os dados foram analisados utilizando o teste

estatístico ANOVA one way, seguida de pós-teste de Tukey em múltiplas comparações. \*p < 0,05 vs T0.

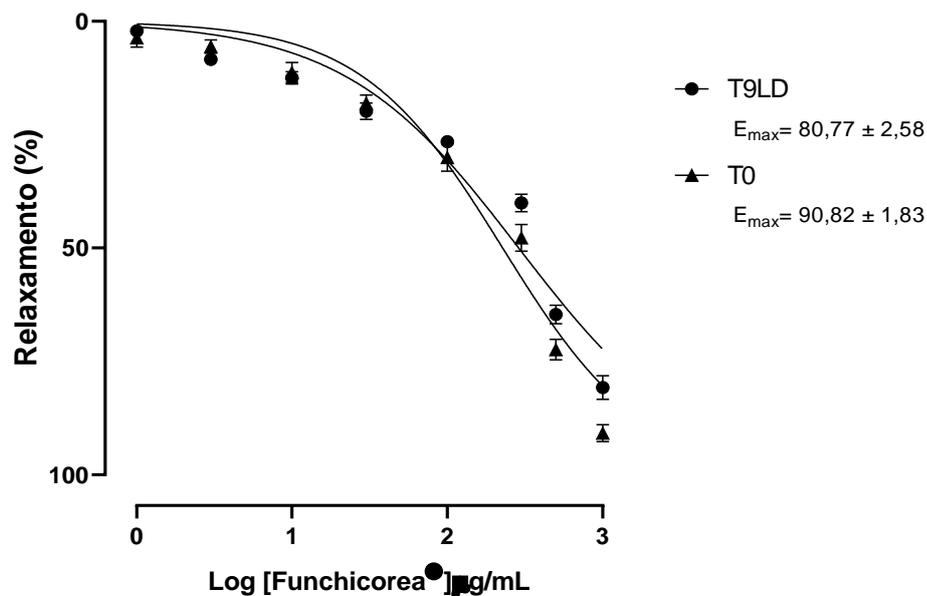
Ao comparar efeito relaxante mediado de funchicórea®, observou-se que a formulação induziu um aumento da magnitude do efeito máximo ao longo dos seis meses em estudos acelerados e de longa duração. Demonstrando que a formulação de funchicórea® é estável durante esse período e segue o mesmo padrão dos estudos de três meses.

### 5.4.3 Estudo de Estabilidade de Nove Meses

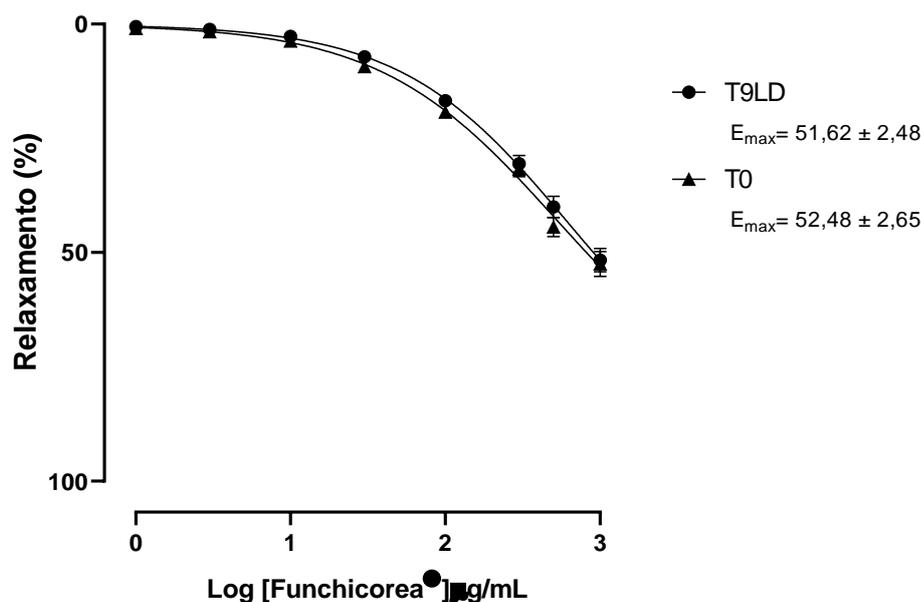
Nos estudos de estabilidade ao avaliar o teste de “nove” meses de longa duração (T9LD), observou-se que o relaxamento de funchicórea®, permanece no mesmo padrão do T0, ou seja, na presença do CCh ( $E_{\max} = 80,77 \pm 2,58$ ;  $pCE_{50} = 2,46 \pm 0,17$ ) o funchicórea® apresentou uma resposta relaxante significativamente maior quando comparado ao KCl ( $E_{\max} = 52,48 \pm 2,65$ ;  $pCE_{50} = 2,80 \pm 0,22$ ) (Figura 14).

**Figura 14** - Curva concentração-resposta de concentrações crescentes de funchicórea® (1-1000 µg/mL) em tiras ilíacas pré-contraídas com CCh (1µM) e KCl (40mM), no tempo “zero” (T0), no tempo “nove” com estudo de estabilidade de longa duração(T9LD).

a.



b.



- a. Curva concentração-resposta de concentrações crescentes (1-1000 µg/mL) de Funchicórea®, em diferentes tempos, T0 (n= 18, referente aos 3 lotes; ▲) e T9LD (n= 18, referente aos 3 lotes; ●) em tiras ilíacas pré-contraídas com CCh (1µM). Os resultados estão expressos como média ± e.p.m. Os dados foram analisados utilizando o teste estatístico *t de student* não pareado. \*p < 0,05 vs T0. b. Curva concentração-resposta de concentrações crescentes (1-1000 µg/mL) de Funchicórea®, em diferentes tempos, T0 (n= 29, referente aos 3 lotes; ▲) e T9LD (n= 18, referente aos 3 lotes; ●) em tiras ilíacas pré-contraídas com KCl (40mM). Os resultados estão expressos como média ± e.p.m. Os dados foram analisados utilizando o teste estatístico *t de student* não pareado. \*p < 0,05 vs T0.

Ao comparar efeito relaxante mediado de funchicórea®, observou-se que a formulação induziu um aumento da magnitude do efeito máximo ao longo dos nove meses em estudo de estabilidade de longa duração. Demonstrando que a formulação de funchicórea® é estável durante esse período e segue o mesmo padrão dos estudos anteriores, referentes aos tempos zero, três e seis meses.

#### 5.4.4 Estudo de Estabilidade de Doze Meses

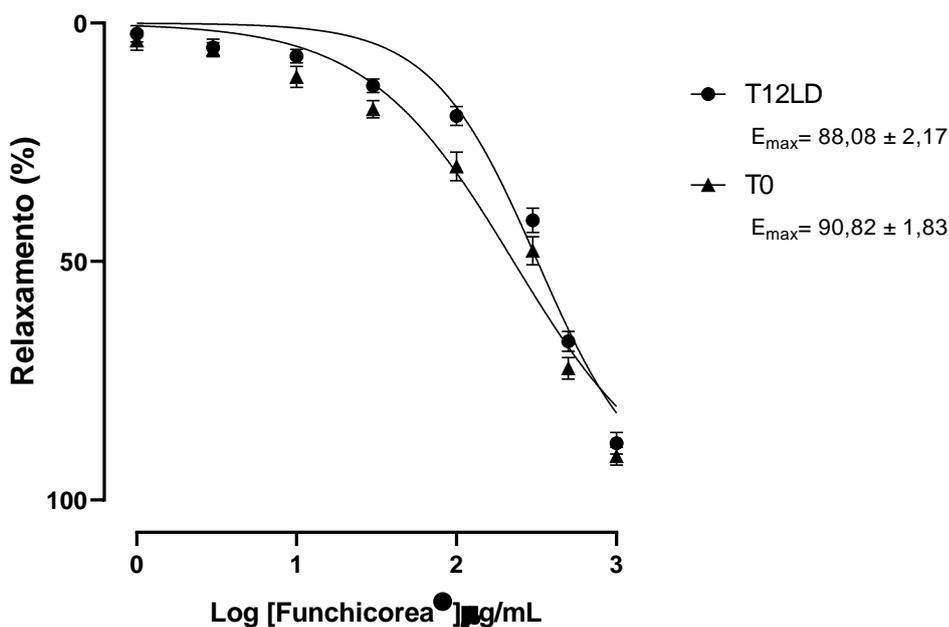
A adição cumulativa de funchicórea® (1-1000 µg/mL) em tiras ilíacas de ratos, pré-contraídas com CCh (1µM) ou KCl (40 mM), promoveu um relaxamento dependente de concentração, no tempo “zero” (T0). Entretanto, na presença do CCh ( $E_{máx} = 90,82 \pm 1,83$ ;  $pCE_{50} = 2,36 \pm 0,12$ ) o funchicórea® apresentou uma magnitude de efeito máximo significativamente maior quando comparado ao KCl ( $E_{máx} = 52,48 \pm 2,65$ ;  $pCE_{50} = 2,339 \pm 0,26$ ) (Figura 15).

Nos estudos de estabilidade ao avaliar o teste de “doze” meses de longa duração (T12LD), observou-se que o relaxamento de funchicórea® na presença do

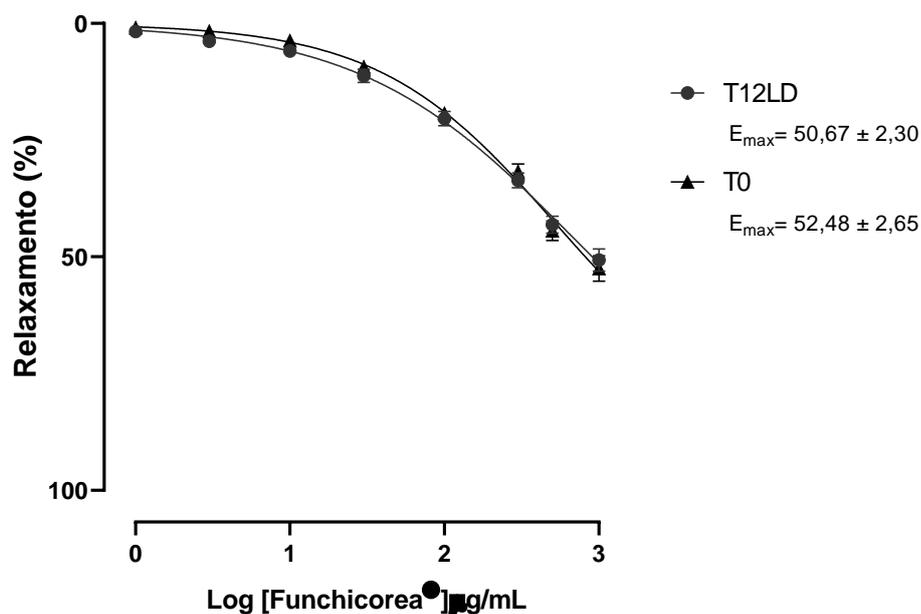
CCh ( $E_{\text{máx}} = 88,08 \pm 2,17$ ;  $pCE_{50} = 2,51 \pm 0,07$ ) apresentou uma magnitude de efeito máximo significativamente maior quando comparado ao KCl ( $E_{\text{máx}} = 50,67 \pm 2,30$ ;  $pCE_{50} = 2,82 \pm 0,27$ ), de forma semelhante ao relaxamento no T0 (Figura 15).

**Figura 15** - Curva concentração-resposta de concentrações crescentes de funchicórea® (1-1000  $\mu\text{g/mL}$ ) em tiras ilíacas pré-contraídas com CCh (1 $\mu\text{M}$ ) e KCl (40mM), no tempo “zero” (T0), no tempo “doze” com estudo de estabilidade de longa duração (T12LD).

a.



b.



- a. Curva concentração-resposta de concentrações crescentes (1-1000 µg/mL) de Funchicórea®, em diferentes tempos, T0 (n= 18, referente aos 3 lotes; ▲) e T12LD (n= 18, referente aos 3 lotes; ●) em tiras ilíacas pré-contraídas com CCh (1µM). Os resultados estão expressos como média ± e.p.m. Os dados foram analisados utilizando o teste estatístico *t de student* não pareado. \*p < 0,05 vs T0. b. Curva concentração-resposta de concentrações crescentes (1-1000 µg/mL) de Funchicórea®, em diferentes tempos, T0 (n= 29, referente aos 3 lotes; ▲) e T12LD (n= 18, referente aos 3 lotes; ●) em tiras ilíacas pré-contraídas com KCl (40mM). Os resultados estão expressos como média ± e.p.m. Os dados foram analisados utilizando o teste estatístico *t de student* não pareado. \*p < 0,05 vs T0.

Ao comparar efeito relaxante mediado pela funchicórea®, observou-se que a formulação induziu um aumento da magnitude do efeito máximo ao longo dos doze meses em estudo de estabilidade de longa duração.

#### 5.4.4 Comparativo de Todas as CE<sub>50</sub> e E<sub>max</sub> para o Estudo de Estabilidade

Nas tabelas 8 e 9, observa-se que o funchicórea® manteve um padrão de potência e eficácia ao longo dos meses. Demonstrando que a formulação é estável durante um ano.

**Tabela 8-** Comparativo da pCE<sub>50</sub> de todos os tempos.

TEMPO	pCE <sub>50</sub> CCh	pCE <sub>50</sub> KCl
T0	2,36 ± 0,12	2,339 ± 0,26
T3AC	2,40 ± 0,11	2,87 ± 0,27
T3LD	2,20 ± 0,18	2,61 ± 0,14
T6AC	2,34 ± 0,23	2,87 ± 0,29
T6LD	2,48 ± 0,15	3,05 ± 0,28
T9LD	2,46 ± 0,17	2,80 ± 0,22
T12LD	2,51 ± 0,07	2,82 ± 0,27

Fonte: Veras, 2022.

**Tabela 9 -** Comparativo do E<sub>max</sub> de todos os tempos.

TEMPO	E <sub>max</sub> CCh	E <sub>max</sub> KCl
T0	90,82 ± 1,83	52,48 ± 2,65
T3AC	92,04 ± 3,89	55,88 ± 2,19
T3LD	92,66 ± 3,55	56,43 ± 2,71
T6AC	89,72 ± 2,20	54,33 ± 1,50
T6LD	89,13 ± 3,01	48,60 ± 2,26
T9LD	80,77 ± 2,58	52,48 ± 2,65
T12LD	88,08 ± 2,17	50,67 ± 2,30

Fonte: Veras, 2022.

Com esses achados, observamos que a formulação de funchicórea® é estável durante um ano, seguindo o mesmo padrão de potência e eficácia em todos os tempos estudados para testes de estabilidade de longa duração e acelerada.

# *Discussão*

---

---

## 6. DISCUSSÃO

Este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade espasmolítica de funchicórea®, observando a influência da retirada do óleo de funcho da formulação. Além de Analisar o envolvimento do efeito antioxidante sob o mecanismo de ação do fitoterápico. Bem como, verificar sua estabilidade biológica de longa duração e acelerada em três lotes pilotos.

A ação espasmolítica foi verificada em íleo isolado de rato, pois já é descrito na literatura a adequação do órgão para construção de curvas concentração-resposta de substâncias que poderão ser usadas no tratamento dos distúrbios gastrointestinais funcionais, como constipação, diarreia e cólicas intestinais (KIM et al., 2008; MEHMOOD et al., 2011).

Ao se realizar a construção da curva concentração-resposta utilizando apenas os excipientes da fórmula de funchicórea®, o que na farmacologia denomina-se de um “Controle Negativo” e na analítica seria a matriz sem nenhum analito, identificados nas figuras 8 e 9 como placebo, observa-se que não se tem um relaxamento típico para o placebo da antiga formulação, composto por óleo de funcho, sacarina e carbonato de magnésio (Figura 8), e o placebo da nova formulação, com sucralose e carbonato de magnésio (Figura 9), demonstrando assim que a retirada do óleo de funcho da formulação, bem como a trocar do açúcar sacarina por sucralose, não interferem no efeito relaxante de funchicórea®, pois esses são considerados excipientes, que tem por características serem substancias inertes (JULIANI; JULIANI, 2015). Corroborando com esses achados, as curvas com a presença dos princípios ativos chicória e ruibarbo possuem efeito máximo e potência significativamente maiores que as curvas de controle negativo, em estimulação por dois agentes contráteis CCh (1µM) e KCl (40mM), demonstrando que os ativos são os responsáveis pelo efeito relaxante. Dessa maneira, o laboratório passa a atender as exigências da ANVISA para a retirada do óleo de funcho da formulação, bem como a troca do açúcar.

Para analisar um possível mecanismo de ação de funchicórea®, observou-se os seguintes resultados no estudo de Assis (2012), também realizados no laboratório de farmacologia cardiovascular da UFPB, com a antiga formulação de funchicórea®. Esse estudo, sugere a participação de canais de K<sup>+</sup> e Ca<sup>2+</sup> por canais Ca<sub>v1.2</sub> e o

envolvimento dos receptores  $\beta_1$  e  $\beta_2$  adrenérgicos, porém ainda produz relaxamento na presença dos bloqueadores utilizados, propondo o envolvimento de outros mecanismos no relaxamento.

Sendo assim, partimos para investigação do efeito antioxidante de funchicórea®, visando outros mecanismos de relaxamento. Sabe-se que a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) é um processo contínuo e fisiológico, que desempenha funções biológicas relevantes no organismo humano, em concentrações normais. Contudo, um desequilíbrio entre os fatores próoxidantes e antioxidantes, acarreta em concentrações supra fisiológicas de ROS que são prejudiciais ao organismo. Dessa forma, ocorre oxidações de moléculas biológicas que podem levar a modificações oxidativas induzidas, implicando em vias patológicas, como a da inflamação intestinal. As células epiteliais intestinais mostraram produzir níveis elevados de ROS na existência de infiltração de células inflamatórias, incluindo neutrófilos e macrófagos (BATISTA et al., 2020; MALOY; POWRIE, 2011; MOURA et al., 2015).

Um possível mecanismo para as cólicas intestinais é a inflamação ocasionada no intestino, porém ainda não há dados consistentes na literatura que expliquem a fisiopatologia detalhada para esse distúrbio da motilidade. Diante desse fato, alguns estudos estão sendo realizados para doseamento da proteína calprotectina fecal. A calprotectina é uma proteína quelante do cálcio, constituindo 60% das proteínas citoplasmáticas presentes nos neutrófilos. Durante um processo inflamatório com recrutamento de neutrófilos é possível identificar concentrações elevadas de calprotectina no plasma, líquido sinovial, urina e fezes. A Calprotectina Fecal (CF), deriva da migração dos neutrófilos para o TGI quando há danos a mucosa intestinal, durante o processo inflamatório, sendo depois excretada juntamente com as fezes (AYLING; KOK, 2018; RICCIUTO; GRIFFITHS, 2019; RØSETH et al., 1997)

Estudos demonstram a elevação da concentração calprotectina em lactantes com cólica. Apontados nos trabalhos de Rhoads e colaboradores (2009) os níveis de calprotectina fecal foram 2 vezes maiores em bebês com cólica do que em bebês controle ( $413 \pm 71$  vs  $197 \pm 46 \mu\text{g/g}$ ,  $P=0,042$ ). E em outro estudo Rhoads e colaboradores (2018) demonstrou que a CF estava elevada em bebês com cólica que tinha modos alimentares diferentes (leite materno, fórmula ou mama + fórmula), a CF

dos bebês foi maior em bebês com cólica, concluindo assim que a cólica está ligada à inflamação intestinal.

Estudos ainda demonstraram que em um modelo animal, foi caracterizada uma situação de estresse oxidativo na constipação intestinal, onde o grupo com constipação intestinal induzida de forma farmacêutica quando comparado com o grupo controle não constipado, apresentou aumento significativo do nível de malondialdeído (MDA), produto da peroxidação lipídica, e efeitos deletérios sobre a atividade de enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase (JABRI et al., 2017).

Então, no presente estudo investigamos a capacidade antioxidante da formulação de funchicórea®, por meio do teste de determinação da atividade sequestradora de radicais, DPPH•. Os resultados da curva padrão de ácido ascórbico estabelecem que a CE<sub>50</sub>, concentração efetiva para o antioxidante reduzir 50% do DPPH, do ácido ascórbico é 5,87±0,249 µg/mL (Figura 10a). Esse achado não corrobora com os encontrados na literatura, como no estudo de Negri e colaboradores (2009), onde a CE<sub>50</sub> do ácido ascórbico é 2,272 µg/mL, de Siqueira e colaboradores (2020) que apresenta CE<sub>50</sub> de 2,65µg/mL e no Nascimento (2016) que o ácido ascórbico possui uma CE<sub>50</sub> = 9,23±0,29µg/mL. Desse modo, conseguimos observar que a metodologia empregada pode modificar os valores de referência do padrão, e para condução desse estudo foi utilizada a centrifugação da amostra, o que pode ter ocasionado uma diminuição ou aumento da atividade antioxidante do ácido ascórbico. Ao compararmos com o funchicórea® (CE<sub>50</sub> = 1146,087 ± 140,1927 µg/mL) (Figura 10b), constata-se que a capacidade antioxidante da formulação é baixa *in vitro*, pois os processos utilizados, como a centrifugação, para que não ocorresse a interferência de grânulos na absorbância. Bem como, os excipientes da formulação podem ter inibido esse efeito no experimento. Contudo, de acordo com a literatura o extrato de *Rheum palmatum* L. possui atividade antioxidante com CE<sub>50</sub> de 5,03 ± 0,40 µg/mL (KUDIESS, 2020).

Devido esse efeito do extrato isolado, realizou-se experimentos no tecido intestinal, precisamente em tiras ilíacas, induzindo o estresse oxidativo com angiotensina II (Ang II). Uns dos mecanismos propostos pelo qual a Ang II induz o estresse oxidativo é pela ativação da NADPH, enzima que é capaz de reduzir o

oxigênio a ânions superóxido ( $O_2^-$ ), que por sua vez dá origem à produção de outros oxidantes secundários e reativos (HITOMI; KIYOMOTO; NISHIYAMA, 2007; WU et al., 2003).

Os cortes histológicos ilíacos estimulados com sonda de DHE, representados na figura 11, demonstraram que a intensidade de fluorescência foi maior no grupo controle de Ang II, indicando que ela foi capaz de induzir a formação de ROS no tecido. Ao tratar esses órgãos com funchicórea® na mesma concentração da sua  $CE_{50}$  do DPPH, observou-se que ela foi capaz de reduzir as espécies de ROS formadas pela Ang II no tecido a valores comparados ao da apocinina, inibidor da NADPH. Diante disso, supõe-se que o funchicórea® pode atuar como um inibidor da NADPH, porém mais estudos são necessários para a elucidação do mecanismo de ação referente ao seu efeito antioxidante.

Os testes de estabilidade são realizados em sua maioria por determinação de marcadores químicos. Desse modo, as metodologias de análise usadas são em suma por métodos cromatográficos. No qual, estabelece-se um marcador que será quantificado e determinado a sua detecção durante todo o estudo (ARIGONY, 2005; BRITO; BARRETO; DE LYRA, 2016). No caso de Funchicórea®, a formulação não apresenta esse marcador que poderia ser quantificado ao longo dos tempos. Diante disso, foi proposto a ANVISA a avaliação da manutenção da potência e eficácia do fitoterápico para o estudo de estabilidade de longa duração e acelerada. Um estudo parecido foi realizado por BRASIL e colaboradores (2022), onde é avaliada a atividade bactericida e bacteriostática ao longo os meses, para manutenção do padrão de estabilidade da formulação.

Os parâmetros avaliados em todas as curvas foram a potência que expressa a atividade de um determinado produto, ou seja, A quantidade necessária (ex.: Concentração de Funchicórea®) para se produzir um determinado efeito e o  $E_{max}$  que apesar de depender de algumas variáveis, tal como: tecido utilizado, expressão de receptores, tipo de medida utilizada e mudanças na transdução da sinalização celular. Farmacologicamente constitui-se uma medida de eficácia de moléculas ou mesmo de um produto. Portanto, em um ensaio de controle biológico ele informa a eficácia do produto (RANG et al., 2015).

Os testes de estabilidade acelerada e longa duração são realizados para fins de avaliar a qualidade, segurança e eficácia dos medicamentos. Além de determinar do prazo de validade dos mesmos (leite 2005). Os estudos de estabilidade acelerada devem ser realizados no momento em que o fitoterápico é produzido (tempo 0), com 3 meses (tempo 3) e com 6 meses (tempo 6) após a submissão a condições de temperatura e umidade fora do padrão de armazenamento ideal.

A alteração em um dos tempos desse teste não implica na reprovação do medicamento, segundo a RDC nº 318/2019, no capítulo V, seção IV, art.94. inciso 4:

Quando mudanças significativas ocorrerem durante o período de 3 (três) a 6 (seis) meses do Estudo de Estabilidade Acelerado, o Prazo de Validade provisório será baseado na avaliação estatística dos dados disponíveis do Estudo de Estabilidade de Longa Duração.

E no seu inciso 5, ela dispõe sobre os que são essas mudanças significativas:

I- Perda de 5% no teor em relação ao valor inicial ou resultado fora da especificação para potência por método microbiológico ou imunológico, exceto medicamentos que contenham IFA vegetal e opoterápico;

II- Qualquer resultado fora do limite especificado;

III- dissolução com resultado fora do limite especificado para 12 (doze) unidades;

IV- Alterações significativas no perfil cromatográfico ou perda de 10% no teor do IFA para medicamentos que contenham IFA vegetal e opoterápico; ou

V- Perda de peso maior ou igual a 5% em 3 meses.

Diante disso, no presente estudo, verificamos na figura 9 os dados referentes ao tempo 0 da nova formulação, cuja qual foi realizada todos os testes de estabilidade. Na presença do CCh (figura 9a) e na presença de KCl (figura 9b). Esses dados do tempo 0 são utilizados como padrão de referência para as análises de todos os estudos de estabilidade acelerada e longa duração. Caso ocorra uma diferença estatística com o  $*p < 0,05$ , esses lotes são reprovados no teste de estabilidade para controle de qualidade biológico.

Para os estudos de estabilidade acelerada de três meses (T3AC), relatados na figura 12, observamos que os valores obtidos para as tiras ilíacas contraídas com CCh (figura 12a) e com KCl (figura 12b) não obtiveram diferenças estatísticas quando comparados as curvas padrões do tempo 0. Logo, os lotes referentes a esse tempo foram aprovados.

Da mesma forma os estudos de seis meses acelerado (T6AC), que estão expressos na figura 13, com valores referentes as contrações com CCh (figura 13a) e KCl (figura 13b) não obtiveram diferenças estatísticas quando comparados as curvas padrões do tempo 0. Então, todos os lotes foram aprovados.

Para os testes de estabilidade de longa duração é preconizado que sejam realizados testes no tempo inicial (tempo 0), a cada 3 meses durante o primeiro ano, ou seja, três meses (tempo 3), seis meses (tempo 6), nove meses (tempo 9), doze meses (tempo 12), dezoito meses (tempo 18), vinte e quatro meses (tempo 24) e ainda teste anuais a partir do terceiro ano de prazo de validade (ANVISA, 2018). Os produtos acabados são mantidos em condições normais de armazenamento, ou seja, temperatura, umidade e exposição a luz. Caso o estudo de longa duração esteja em andamento a RDC nº 318/2019, no capítulo V, seção IV, art.94. inciso 2, preconiza que:

Nos casos em que forem apresentados resultados de Estudo de Estabilidade Acelerado concluído e estudo de Longa Duração em andamento, o Prazo de Validade provisório será estabelecido a partir da análise estatística dos resultados apresentados e de dados históricos relevantes, limitado à adição de 12 meses.

Os estudos de estabilidade de longa duração referente a 3 meses (T3LD), relatados na figura 12, observamos que os valores obtidos para as tiras ilíacas contraídas com CCh (figura 12a) e com KCl (figura 12b) não obtiveram diferenças estatísticas quando comparados as curvas padrões do tempo 0. Então, todos os lotes referentes a esse tempo foram aprovados.

No teste referente a 6 meses (T6LD), relatados na figura 13, observamos que os valores obtidos para as tiras ilíacas contraídas com CCh (figura 13a) e com KCl (figura 13b) quando comparados as curvas padrões do tempo 0 não houve diferença estatística. Sendo assim, os lotes referentes ao T6LD foram aprovados.

Para o tempo de 9 meses (T9LD), demonstrado na figura 14, observamos que os resultados explicitados com CCh (figura 14a) e com KCl (figura 14b) que quando comparados as curvas padrões do tempo 0 não lograram diferença estatística. Portanto, os lotes referentes ao T9LD foram aprovados.

O último tempo analisado neste trabalho para os testes de longa duração foram para o de 12 meses (T12LD), cujo resultados das contrações realizadas com CCh (figura 15a) e com KCl (figura 15b) demonstraram que não houve diferença estatística entre eles em comparação com o T0 de modo que é dada a aprovação dos lotes referentes a esse teste.

Ao observar todo o estudo dos testes de longa duração e acelerado (tabela 8 e 9), os resultados demonstram que em 12 meses não houve alteração da potência e eficácia de funchicórea®. Sendo assim, pode ser autorizado o prazo de validade temporário de vinte e quatro meses, pois a RDC nº 318/2019 estabelece em seu inciso 2, citado a cima, que o prazo máximo adicionado, de forma provisória até a conclusão dos estudos, está limitado a 12 meses.

# *Conclusão*

---

---

## 7. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos neste estudo concluímos que:

- A retirada do óleo de funcho e a troca da sacarina pela sucralose não influenciam na potência e eficácia de funchicórea®.
- A indução com CCh mimetiza a ação parassimpática no intestino, enquanto que o KCl 40mM causa um desbalanço eletrolítico por excesso de K<sup>+</sup> no meio extracelular. Em ambos os casos, temos como resultado final a contração do íleo. funchicórea® teve efeito espasmolítico em ambas as situações sendo mais eficaz naquela induzida por CCh, ou seja, naquela situação de excessiva ação colinérgica.
- O funchicórea® pode exercer a melhora das cólicas intestinais por diminuição da inflamação ocasionada por ROS, pois seu efeito antioxidante é comparado ao da apocinina.
- Com os testes de estabilidade acelerado de 0, 3 e 6 meses concluídos, comprovamos que o funchicórea® mantém a estabilidade ao longo desses meses.
- Com a conclusão dos testes de estabilidade longa duração de 0, 3, 6, 9 e 12 meses, comprovamos que o funchicórea® durante um ano, não apresentou alterações na estabilidade da formulação. Com isso o prazo de validade de 24 meses para funchicórea® pode ser estabelecido pela ANVISA.
- Dessa forma, podemos concluir que o produto Fitoterápico Funchicórea apresenta um efeito espasmolítico significativo, e que os lotes testados se comportam de forma padronizada com preservada eficácia e potência, além de ter resultados com reprodutibilidade e baixa variabilidade ao longo do tempo.

# *Referências*

---

## REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira**. Brasília: Anvisa, 2011. 126.
- ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução da diretoria colegiada- **RDC nº 27**, de 17 de maio de 2012.
- ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução da diretoria colegiada- **RDC nº 26**, de 13 de maio de 2014.
- ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução da diretoria colegiada- **RDC nº 318**, de 6 de novembro de 2019.
- ARIGONY, A. L. V. Determinação química e biológica de *Bauhinia forficata* Link subespécie pruinosa (pata-de-vaca-Leguminosae). 2005.
- ASSIS, V. L. DE. Ensaio Farmacológicos Pré-clínicos no Trato Digestório com um Produto Fitoterápico. 2012.
- ASSIS, V. L. et al. Effects of Funchicórea®, a traditional brazilian herbal complex, on intestinal motility in healthy and constipated rodents. **European J Med Plants**, p. 26–36, 2020.
- AYLING, R. M.; KOK, K. Fecal calprotectin. **Advances in clinical chemistry**, v. 87, p. 161–190, 2018.
- BAJAJ, S.; SINGLA, D.; SAKHUJA, N. Stability testing of pharmaceutical products. **Journal of applied pharmaceutical science**, n. Issue, p. 129–138, 2012.
- BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. DA S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química nova**, v. 32, p. 679–688, 2009.
- BARRETT, K. E. **Fisiologia Gastrointestinal-2**. [s.l.] AMGH Editora, 2014.
- BATISTA, J. A. et al. Polysaccharides derived from *Morinda citrifolia* Linn reduce inflammatory markers during experimental colitis. **Journal of ethnopharmacology**, v. 248, p. 112303, 2020.
- BERLINCK, R. G. S. et al. A química de produtos naturais do Brasil do século XXI. **Química Nova**, v. 40, p. 706–710, 2017.
- BERRIDGE, M. Cell signalling pathways. **Cell Signalling Biology**, v. 2014, n. 1, p. 1–138, 2014.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.-E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT-Food science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995.
- BRASIL. GUIA para Condução de Estudos Não-Clínicos de Toxicologia e Segurança Farmacológica necessários ao desenvolvimento de Medicamento da ANVISA 2013: **Ministério da Saúde**; 2013.
- BRASIL. Guia de orientação para registro de Medicamento Fitoterápico e registro e notificação de Produto Tradicional Fitoterápico: **Ministério da Saúde**; 2014.
- BRASIL, G. R. L. et al. Avaliação da atividade antibacteriana de um biomodificador dentinário à base de óleo de *Copaifera multijuga* Hayne. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 9, p. e36711931909–e36711931909, 2022.
- BRITO, K. S.; BARRETO, R. A. P.; DE LYRA, M. A. M. Estudo de Estabilidade de Acompanhamento do Fitoterápico Sanativo. **Revista Eletrônica da Estácio Recife**, v. 2, n. 1, 2016.
- BRUNTON, L. L.; HILAL-DANDAN, R.; KNOLLMANN, B. C. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman e Gilman-13**. [s.l.] Artmed Editora, 2018.

- CERQUEIRA, N. F.; YOSHIDA, W. B. Óxido nítrico: revisão. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 17, p. 417–423, 2002.
- CHEN, Y. et al. Antimetastatic effects of *Rheum palmatum* L. extract on oral cancer cells. **Environmental toxicology**, v. 32, n. 10, p. 2287–2294, 2017.
- CHERUBINI, K. A. Associação entre alimentação materna e cólica em lactentes: uma revisão sistemática. 2011.
- CHOKRI, A. et al. Myorelaxant and spasmolytic effects of *Globularia alypum* L. extract on rabbit jejunum. **Int J Pharmacol**, v. 6, n. 5, p. 608–615, 2010.
- CLOUSE, R. E.; DIAMANT, N. E. Motor function of the esophagus. In: **Physiology of the gastrointestinal tract**. [s.l.] Elsevier, 2006. p. 913–926.
- CÔCO, H. et al. Consequence of hyperhomocysteinaemia on  $\alpha$ 1-adrenoceptor-mediated contraction in the rat corpus cavernosum: The role of reactive oxygen species. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 68, n. 1, p. 63–75, 2016.
- COLLINS, J.; NGUYEN, A.; NADIREDDY, M. **StatPearls: Anatomy, Abdomen and Pelvis, Small Intestine**. StatPearls Publishing: Treasure Island, FL, USA, , 2021.
- COSTA, C. D. Distúrbios funcionais do trato gastrointestinal. **Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba**, v. 7, n. 3, 2005.
- CULOTTA, E.; KOSHLAND JR, D. E. NO News Is Good News: A startlingly simple molecule unites neuroscience, physiology, and immunology and revises scientists' understanding of how cells communicate and defend themselves. **Science**, v. 258, n. 5090, p. 1862–1865, 1992.
- DE CABRAL SOBREIRA, A. L. et al. ASPECTOS LEGAIS E QUALIDADE DE UM PRODUTO FITOTERÁPICO À BASE DE GRAVIOLA (*ANNONA MURICATA* LINN). **Infarma-Ciências Farmacêuticas**, v. 31, n. 4, p. 305–316, 2019.
- DE WEERTH, C.; FUENTES, S.; DE VOS, W. M. Crying in infants: on the possible role of intestinal microbiota in the development of colic. **Gut Microbes**, v. 4, n. 5, p. 416–421, 2013.
- DINIZ, M. F. F. et al. Subacute toxicology studies on the aqueous fraction of the ethanol extract of the leaves of *Cissampelos sympodialis* Eichl.(Menispermaceae) in dogs. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, p. 87–89, 2002.
- FACCI, J. et al. Evolução da legislação e das técnicas analíticas aplicadas a estudos de estabilidade de insumos e produtos farmacêuticos. **Química Nova**, v. 43, p. 959–973, 2020.
- FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B. O óxido nítrico como neurotransmissor no sistema nervoso entérico: fisiopatologia e implicações no íleo adinâmico. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 25, p. 351–353, 1998.
- FOLDVARI, M. et al. Liposome encapsulated prostaglandin E1 in erectile dysfunction: correlation between in vitro delivery through foreskin and efficacy in patients. **Urology**, v. 52, n. 5, p. 838–843, 1998.
- GARCEZ, F. R. et al. Fenilpropanóides e outros constituintes bioativos de *Nectandra megapotamica*. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 407–411, 2009.
- GELFAND, A. A. **Infant colic**. Seminars in pediatric neurology. **Anais...Elsevier**, 2016.
- GHOORBANI, A.; AMIRI, M. S.; HOSSEINI, A. Pharmacological properties of *Rheum turkestanicum* Janisch. **Heliyon**, v. 5, n. 6, p. e01986, 2019.
- GHOSHAL, U. C. How to interpret hydrogen breath tests. **Journal of neurogastroenterology and motility**, v. 17, n. 3, p. 312, 2011.
- HILAL-DANDAN, R.; BRUNTON, L. **Manual de farmacologia e terapêutica de Goodman & Gilman**. [s.l.] AMGH Editora, 2015.
- HITOMI, H.; KIYOMOTO, H.; NISHIYAMA, A. Angiotensin II and oxidative stress. **Current opinion in cardiology**, v. 22, n. 4, p. 311–315, 2007.

HYAMS, J. S. et al. Colonic hydrogen production in infants with colic. **The Journal of pediatrics**, v. 115, n. 4, p. 592–594, 1989.

ILLINGWORTH, R. S. Infantile colic revisited. **Archives of Disease in Childhood**, v. 60, n. 10, p. 981, 1985.

JABRI, M.-A. et al. Role of laxative and antioxidant properties of *Malva sylvestris* leaves in constipation treatment. **Biomedicine & pharmacotherapy**, v. 89, p. 29–35, 2017.

JANDA, K. et al. The common cichory (*Cichorium intybus* L.) as a source of extracts with health-promoting properties—A review. **Molecules**, v. 26, n. 6, p. 1814, 2021.

JULIANI, C. S. R.; JULIANI, R. G. M. **Medicamentos: noções básicas, tipos e formas farmacêuticas**. [s.l.] Saraiva Educação SA, 2015.

KAUL, P. N.; JOSHI, B. S. Alternative medicine: Herbal drugs and their critical appraisal-part II. **Progress in drug research**, p. 1–75, 2001.

KERWIN JR, J. F.; LANCASTER, J. R.; FELDMAN, P. L. Nitric oxide: a new paradigm for second messengers. **Journal of medicinal chemistry**, v. 38, n. 22, p. 4343–4362, 1995.

KIM, H. R. et al. Smooth muscle signalling pathways in health and disease. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 12, n. 6a, p. 2165–2180, 2008.

KNOT, H. J.; BRAYDEN, J. E.; NELSON, M. T. Calcium channels and potassium channels. In: **Biochemistry of smooth muscle contraction**. [s.l.] Elsevier, 1996. p. 203–219.

KONG, F.; SINGH, R. P. Disintegration of solid foods in human stomach. **Journal of food science**, v. 73, n. 5, p. R67–R80, 2008.

KONG, X. et al. *Rheum palmatum* L. and *Coptis chinensis* Franch., exert antipyretic effect on yeast-induced pyrexia rats involving regulation of TRPV1 and TRPM8 expression. **Journal of ethnopharmacology**, v. 153, n. 1, p. 160–168, 2014.

KT, R. D.; SIVALINGAMQ, N. *Cichorium intybus* attenuates Streptozotocin-induced pancreatic  $\beta$ -cell damage by inhibiting NF- $\kappa$ B activation and oxidative stress. **Journal of Applied Biomedicine**, v. 18, 2020.

KUDIESS, A. Caracterização físico-química, potencial antioxidante e avaliação de toxicidade do ruibarbo-*Rheum palmatum* L. (Polygonaceae). [s.d.].

LENTLE, R. G.; DE LOUBENS, C. A review of mixing and propulsion of chyme in the small intestine: fresh insights from new methods. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 185, n. 4, p. 369–387, 2015.

MALOY, K. J.; POWRIE, F. Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. **Nature**, v. 474, n. 7351, p. 298–306, 2011.

MATSUO, K.; PALMER, J. B. Anatomy and physiology of feeding and swallowing: normal and abnormal. **Physical medicine and rehabilitation clinics of North America**, v. 19, n. 4, p. 691–707, 2008.

MEHMOOD, M. H. et al. Pharmacological basis for the medicinal use of psyllium husk (*Ispaghula*) in constipation and diarrhea. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 56, n. 5, p. 1460–1471, 2011.

MILLER, J. J. et al. Breath hydrogen excretion in infants with colic. **Archives of disease in childhood**, v. 64, n. 5, p. 725–729, 1989.

MONTGOMERY, L. E. A. et al. Autonomic modification of intestinal smooth muscle contractility. **Advances in Physiology Education**, v. 40, n. 1, p. 104–109, 2016.

MOURA, F. A. et al. Antioxidant therapy for treatment of inflammatory bowel disease: does it work? **Redox biology**, v. 6, p. 617–639, 2015.

NASCIMENTO, Y. M. DO. Estudo fitoquímico e atividade antioxidante de *Zornia brasiliensis*. 2016.

NASIMI DOOST AZGOMI, R. et al. A comprehensive mechanistic and therapeutic insight into the effect of chicory (*Cichorium intybus*) supplementation in diabetes mellitus: A systematic review of literature. **International Journal of Clinical Practice**, v. 75, n. 12, p. e14945, 2021.

NAVED, M.; KALAM, M. A. REWAND CHINI (*RHEUM PALMATUM* LINN. AND *RHEUM OFFICINALE* BAILL.): A POTENT DRUG OF UNANI MEDICINE. 2021.

NEGRI, M. L. S.; POSSAMAI, J. C.; NAKASHIMA, T. Antioxidant activity of "espinheira-santa"-*Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss., leaves dried in different temperatures. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 553–556, 2009.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of natural products**, v. 83, n. 3, p. 770–803, 2020.

OLIVEIRA, G. L. S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do dpph: Estudo de revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 1, p. 36–44, 2015.

OMS - ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. 2017a. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/2003/fs134/en/>.»  
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/2003/fs134/en>

PEIXOTO, E. B. M. I. et al. Antioxidant SOD mimetic prevents NADPH oxidase-induced oxidative stress and renal damage in the early stage of experimental diabetes and hypertension. **American Journal of Nephrology**, v. 29, n. 4, p. 309–318, 2009.

PEÑA-ESPINOZA, M. et al. Antiparasitic activity of chicory (*Cichorium intybus*) and its natural bioactive compounds in livestock: a review. **Parasites & vectors**, v. 11, n. 1, p. 1–14, 2018.

RANG, R. et al. **Rang & dale farmacologia**. [s.l.] Elsevier Brasil, 2015.

REMBOLD, C. M. Electromechanical and pharmacomechanical coupling. **Biochemistry of smooth muscle contraction**, 1996.

REVUELTA, M. P.; CANTABRANA, B.; HIDALGO, A. Depolarization-dependent effect of flavonoids in rat uterine smooth muscle contraction elicited by CaCl<sub>2</sub>. **General Pharmacology: The Vascular System**, v. 29, n. 5, p. 847–857, 1997.

RHOADS, J. M. et al. Altered fecal microflora and increased fecal calprotectin in infants with colic. **The Journal of pediatrics**, v. 155, n. 6, p. 823–828, 2009.

RHOADS, J. M. et al. Infant colic represents gut inflammation and dysbiosis. **The Journal of pediatrics**, v. 203, p. 55–61, 2018.

RICCIUTO, A.; GRIFFITHS, A. M. Clinical value of fecal calprotectin. **Critical reviews in clinical laboratory sciences**, v. 56, n. 5, p. 307–320, 2019.

RODRIGUES, A. G.; DE SIMONI, C. Plantas medicinais no contexto de políticas públicas. **Informe Agropecuario**, Belo Horizonte, v. 31, n. 255, p. 7-12. 2010.

RØSETH, A. G. et al. Assessment of disease activity in ulcerative colitis by faecal calprotectin, a novel granulocyte marker protein. **Digestion**, v. 58, n. 2, p. 176–180, 1997.

SALVATORE, S. et al. Pharmacological interventions on early functional gastrointestinal disorders. **Italian journal of pediatrics**, v. 42, n. 1, p. 1–8, 2016.

SANDERS, K. M.; WARD, S. M. Nitric oxide as a mediator of nonadrenergic noncholinergic neurotransmission. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 262, n. 3, p. G379–G392, 1992.

SARASU, J. M.; NARANG, M.; SHAH, D. Infantile colic: an update. **Indian pediatrics**, v. 55, n. 11, p. 979–987, 2018.

- SILVA, N. C. S. et al. A utilização de plantas medicinais e fitoterápicos em prol da saúde. **Única cadernos acadêmicos**, v. 3, n. 1, 2017.
- SILVERTHORN, D. U. **Fisiologia humana: uma abordagem integrada**. [s.l.] Artmed editora, 2010.
- SIQUEIRA, J. S. et al. Phytochemical prospection and evaluation of the cytotoxic potentials and antioxidants of the *Microgramma vaccinnifolia* leaves extract. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 4, p. 20318–20331, 2020.
- STREET, R. A.; SIDANA, J.; PRINSLOO, G. *Cichorium intybus*: Traditional uses, phytochemistry, pharmacology, and toxicology. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 2013.
- TANAKA, Y. et al. Significant role of neuronal non-N-type calcium channels in the sympathetic neurogenic contraction of rat mesenteric artery. **British journal of pharmacology**, v. 128, n. 7, p. 1602–1608, 1999.
- TSCHIRHART, E. et al. Arachidonic acid metabolites and airway epithelium-dependent relaxant factor. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 243, n. 1, p. 310–316, 1987.
- UCHOA, J. L. C.; JOSÉ, C. *Histologia Básica-Texto & Atlas*, 13ª edição. **Rio de Janeiro: Grupo GEN**, 2017.
- WANG, Y. et al. *Cichorium intybus* L. extract suppresses experimental gout by inhibiting the NF- $\kappa$ B and NLRP3 signaling pathways. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 19, p. 4921, 2019.
- WESSEL, M. A. et al. Paroxysmal fussing in infancy, sometimes called "colic". **Pediatrics**, v. 14, n. 5, p. 421–435, 1954.
- WU, D.-C. et al. NADPH oxidase mediates oxidative stress in the 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine model of Parkinson's disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 10, p. 6145–6150, 2003.
- ZEEVENHOOVEN, J.; KOPPEN, I. J. N.; BENNINGA, M. A. The new Rome IV criteria for functional gastrointestinal disorders in infants and toddlers. **Pediatric gastroenterology, hepatology & nutrition**, v. 20, n. 1, p. 1–13, 2017.
- ZHOU, Y.-X. et al. Rhein: a review of pharmacological activities. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, 2015.

# *Anexos*

---

---

# ANEXOS

## Anexo I



Universidade  
Federal da  
Paraíba

Comissão de Ética no  
Uso de Animais



### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação da atividade espasmolítica da nova fórmula de um medicamento fitoterápico-Funchicórea®, pó, fornecido pelo Laboratório Melpoejo Ltda - Ensaio Farmacológico de Controle de Qualidade Biológico", protocolada sob o CEUA nº 7597240521 (ID 001476), sob a responsabilidade de **Isac Almeida de Medeiros e equipe; Robson Cavalcante Veras; Ana Caroline Meneses Ferreira Veras** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA/UFPB) na reunião de 06/09/2021.

We certify that the proposal "Evaluation of spasmolytic activity of the new formula of a herbal medicine - Funchicórea®, powder, supplied by Laboratório Melpoejo Ltda - Pharmacological Assay for Biological Quality Control", utilizing 154 Heterogenics rats (154 males), protocol number CEUA 7597240521 (ID 001476), under the responsibility of **Isac Almeida de Medeiros and team; Robson Cavalcante Veras; Ana Caroline Meneses Ferreira Veras** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Paraíba (CEUA/UFPB) in the meeting of 09/06/2021.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **09/2021** a **10/2022** Área: **Ciências Farmacêuticas**

Origem: **Biotério José Paulino**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **8 a 12 semanas**

N: **154**

Linhagem: **Rattus Norvegicus - Wistar**

Peso: **250 a 350 g**

Local do experimento: **Laboratório de Farmacologia Cardiovascular - IPeFarM**

João Pessoa, 27 de fevereiro de 2022

Profa. Dra. Adriana Maria Fernandes de Oliveira Golzio  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal da Paraíba

Prof. Dr. Ivia Carmem Talleri  
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal da Paraíba

## Anexo II

 Agência Nacional de Vigilância Sanitária	
<b>ATA DE REUNIÃO</b> <b>Resolução da Diretoria Colegiada n.º 260 de 5 de novembro de 2004</b>	
<b>EMPRESA:</b> LABORATORIO MELPOEJO	
<b>SETOR(ES) DA ANVISA:</b> GMESP	
<b>LOCAL DA REUNIAO:</b> Videoconferência (Teams)	
<b>DATA</b> 22/10/2020	<b>HORARIO</b> <b>INÍCIO:</b> 14h00 <b>TÉRMINO:</b> 14h30
<p>A GMESP orientou a empresa a solicitar reunião para discussão das petições em análise do fitoterápico Funchicórea (renovação de registro, alteração de excipiente e alteração de especificação e método analítico).</p> <p>Foi informado pelos representantes da Anvisa que o Funchicórea não poderia ser reequadrado como produto tradicional fitoterápico pela presença do estragol (carcinogênico) presente no óleo de funcho, por ser considerada substância potencialmente tóxica na concentração presente no produto, o que contraria o disposto no inciso V do art. 23 da RDC 26/2014.</p> <p>A empresa propôs no passado considerar o funcho como excipiente, considerando a concentração presente no produto, e também já avaliou a possibilidade de redução dessa concentração, porém, as referências científicas vigentes mostram que mesmo com uma redução acentuada permaneceria o risco do produto para a faixa etária para o qual o mesmo é indicado. Assim, o caminho regulatório que foi considerado possível, baseando-se no art. 70 da RDC 26/2014, seria a supressão do funcho da formulação do medicamento.</p> <p>A empresa informou se preocupar com a falta de reprodutibilidade lote a lote dos níveis do marcador ácido chicórico definido para a chicória. Propôs considerar açúcares totais como marcador da chicória, em adição a avaliação de atividade por meio de ensaio biológico do produto.</p> <p>Baseando-se na exclusão do funcho e na definição de novo marcador da chicória, a empresa deverá redesenvolver o Funchicórea, fabricando novos lotes piloto para apresentação das evidências técnicas à Anvisa. Adicionalmente, conforme previsto no Art 70, deve ser apresentada comprovação para a nova formulação do produto como PTF, podendo ser apresentados dados de tradicionalidade para as espécies em separado e justificada a racionalidade da associação, conforme presente no art. 29 da RDC 26/2014.</p> <p>A empresa deverá discutir internamente o caso e formalizar sua decisão, apresentando à GMESP uma proposta de cronograma de adequação via aditamento. Foi solicitado que a empresa informe a GMESP o número do expediente do aditamento por meio do e-mail gmesp@anvisa.gov.br.</p>	
<b>OBSERVAÇÕES:</b> ----	
<b>Participaram da reunião:</b>	
<b>GMESP</b> Ana Cecília Bezerra Carvalho; João Paulo Perfeito; e Leandro Viana Costa e Silva.	
<b>MELPOEJO</b> Carmem Zancanella; José Luiz Ritto; e Jorge Luiz de Oliveira	

## Anexo III



### NOVO PROJETO PARA REALIZAÇÃO DE ENSAIOS BIOLÓGICOS

Prezados professores,

Tendo em vista o fato do laboratório Melpoejo estar desenvolvendo um novo produto contendo Ruibarbo (*Rheum plamatum*) e Chicória (*Cichorium intybus*), solicitamos, junto a Universidade Federal da Paraíba (UFPB) e a Fundação Parque tecnológico, um novo projeto para a realização de ensaios biológicos com o objetivo de avaliarmos a atividade espasmolítica-relaxamento do íleo.

Sem mais para o momento e certo da compreensão de todos os envolvidos, agradeço a atenção dispensada.

  
Ricardo Lawall de Andrade Cruzeiro

Responsável Técnico

Ricardo Lawall A. Cruzeiro

FARMACÊUTICO-BIOQUÍMICO

CRF-ABG 12173