

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

ANA FLAVIA VASCONCELOS BORGES LEAL

**ENSAIO DE DISSOLUÇÃO DE FITOTERÁPICOS
CONTENDO *Maytenus ilicifolia* Mart ex Reiss
(Celastraceae): VALIDAÇÃO DE MÉTODOS PARA
QUANTIFICAÇÃO DE CATEQUINA E EPICATEQUINA**

**Goiânia
2010**

ANA FLAVIA VASCONCELOS BORGES LEAL

**ENSAIO DE DISSOLUÇÃO DE FITOTERÁPICOS
CONTENDO *Maytenus ilicifolia* Mart ex Reiss
(Celastraceae): VALIDAÇÃO DE MÉTODOS PARA
QUANTIFICAÇÃO DE CATEQUINA E EPICATEQUINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Goiás, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Área de Concentração: Fármacos e Medicamentos

Orientador: Prof. Dr^a. Maria Teresa Freitas Bara

**Goiânia
2010**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação na (CIP)
GPT/BC/UFG**

L435e Leal, Ana Flavia Vasconcelos Borges.
Ensaio de dissolução de fitoterápicos contendo *Maytenus ilicifolia* Mart ex Reiss (Celastraceae) [manuscrito]: validação de métodos para quantificação de catequina e epicatequina / Ana Flavia Vasconcelos Borges Leal. - 2010.
xv, 99 f. : il., figs, tabs.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Teresa Freitas Bara; Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Danielle Guimarães Almeida Diniz.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Faculdade de Farmácia, 2010.

Bibliografia.

Inclui lista de figuras, abreviaturas, siglas e tabelas.

Apêndice.

1. *Maytenus ilicifolia*. 2. Dissolução. 3. Fitoterápicos. I. Título.

CDU: 615.4

AGRADECIMENTOS

À orientadora Profa. Dra. Maria Teresa, pela confiança, pelos ensinamentos e pela oportunidade.

À Profa. Dra. Danielle pela dedicação, confiança e pelos ensinamentos

Aos meus pais, Joana e Paulo, pelo amor, incentivo e apoio.

À Mariana de Oliveira Berreta, pela contribuição e ensinamentos.

Ao Marco Júnio Peres Filho pela ajuda na análise térmica.

À Erika Crispim por toda ajuda e pelos ensinamentos.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFG.

A todos os colegas dos laboratórios LPPN e FarmaTec pelas horas de convívio e por todas as contribuições.

Aos amigos Carolina, Daniel, Emmanuel, Juliana, Leonardo e Vanessa pela amizade, torcida e por compreenderem a minha ausência.

E a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

RESUMO

Maytenus ilicifolia Mart ex Reiss (Celastraceae), conhecida popularmente no Brasil por espinheira-santa é amplamente utilizada para tratar úlceras e desordens gástricas. A qualidade dos fitoterápicos é imprescindível a fim de assegurar a eficácia e a segurança do medicamento. O teste de dissolução é uma ferramenta essencial para avaliar a qualidade de fitoterápicos na forma farmacêutica sólida de uso oral. Este estudo foi realizado visando aplicar o teste de dissolução em onze fitoterápicos à base de *Maytenus ilicifolia*, produzidos com pó ou extrato seco, adquiridos no mercado farmacêutico local (Goiânia-GO, Brasil). O método de quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e o método de dissolução foram desenvolvidos e validados e os resultados obtidos permitiram quantificar os marcadores catequina e epicatequina com precisão, exatidão e seletividade. Os ensaios de dissolução foram conduzidos com o aparato pá a 75 rpm e ácido clorídrico 0,1 M (900 mL a 37°C ± 0,5°C) como meio de dissolução. Através dos perfis de dissolução determinou-se o modelo matemático de liberação dos marcadores (primeira ordem), a porcentagem de catequina e epicatequina dissolvidas em 45 minutos e a eficiência de dissolução. As formulações contendo o pó apresentaram rápida liberação dos marcadores no meio (Q>85% em 12 minutos). Os ensaios realizados para verificar a qualidade dos fitoterápicos foram peso médio, variação de peso, dissolução, perfil cromatográfico e análise sensorial. Apenas 45,5% dos fitoterápicos avaliados estavam em conformidade em todos os testes realizados. Os ensaios de dissolução, análise sensorial, peso médio, variação de peso e perfil cromatográfico foram responsáveis pela não conformidade de, respectivamente, 18,2%, 18,2%, 18,2%, 9,1% e 36,4% das amostras. Os dados obtidos demonstram a necessidade de se implementar o ensaio de dissolução no controle de qualidade de fitoterápicos, investigando assim a liberação das substâncias ativas desses medicamentos.

Palavras-chaves: Controle de qualidade, dissolução, *Maytenus ilicifolia*, fitoterápicos.

ABSTRACT

Maytenus ilicifolia Mart ex Reiss (Celastraceae) popularly known in Brazil as espinheira-santa is used against gastric disorders and ulcers. Quality of herbal medicines is essential to ensure the safety and efficacy of the drug. The dissolution test is an essential tool to assess the quality of herbal medicines in the solid dosage form for oral use. This work aimed to evaluate the dissolution behavior of eleven herbal medicines containing *Maytenus ilicifolia*, produced with powder or dry extract, purchased in local shops (Goiânia-GO, Brazil). Assay of catechin and epicatechin by high-pressure liquid chromatography (HPLC) and dissolution methods were validated and obtained results allowed the quantification of these markers with precision, accuracy and selectivity. The dissolution profiles have been determined adopting the following conditions: paddle apparatus at 75 rpm and HCl 0.1 M (900 mL at 37 °C ± 0.5 °C) as dissolution medium. Through the dissolution profiles it has been determined the mathematical model of release (first order), the percentage of catechin and epicatechin dissolved at 45 minutes and the efficiency of dissolution. Capsule containing powder showed rapid release of the markers in the medium (Q>85% in 12 minutes). Tests conducted to verify the quality of herbal medicines were average weight, weight variation, dissolution, chromatographic profile and sensory analysis. It was found that only 45.5% of analyzed herbal medicines products provide satisfactory results. The dissolution test, sensory analysis, average weight, weight variation and chromatographic profile were responsible for non-compliance of, respectively, 18.2%, 18.2%, 18.2%, 9.1% and 36.4% of the samples. Obtained data demonstrated the need to implement these tests in quality control of herbal medicines, so by investigating the release of the active ingredients of these medicines.

Keywords: Quality control, dissolution, *Maytenus ilicifolia*, herbal medicines.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Maytenus ilicifolia</i> (A) arbusto, (B) folhas. Foto: Ana Flavia V. B. Leal.....	18
Figura 2. Estrutura química dos marcadores catequina e epicatequina, isolados das folhas de <i>M. ilicifolia</i> . Adaptado de PESSUTO et al., 2009.....	19
Figura 3. Representação esquemática dos processos envolvidos na dissolução. Adaptado de WAGNER, 1969 e TOZER, ROWLAND, 2009).....	22
Figura 4. Representação gráfica do conceito de eficiência de dissolução. Adaptado de KHAN, 1975.....	29
Figura 5. Espectro de absorção no UV da Catequina.	44
Figura 6. Espectro de absorção no UV da Epicatequina.	44
Figura 7. Cromatograma da amostra autêntica de <i>M. ilicifolia</i> em HCl 0,1 M. Observa-se os marcadores catequina (tr=5,66 min) e epicatequina (tr=8,25 min). Condições cromatográficas: fase móvel composta por água:acetonitrila:metanol:ácido acético (84:10:5:1), em eluição isocrática, fluxo de 1 mL/min, coluna Varian C18 250 x 4,6 mm, 5 µm e detector a 280 nm.....	46
Figura 8. Cromatograma da solução padrão de catequina e epicatequina em HCl 0,1 M (...) e cromatograma de solução de HCl 0,1 M (—) . Condições cromatográficas: fase móvel composta por água:acetonitrila:metanol:ácido acético (84:10:5:1), em eluição isocrática, fluxo de 1 mL/min, coluna Varian® C18 250 x 4,6 mm, 5 µm e detector a 280 nm.	47
Figura 9. Cromatograma da solução padrão de catequina e epicatequina em HCl 0,1 M (...) e cromatograma de solução de amido a 0,105mg/mL em HCl 0,1 M (—). Condições cromatográficas: fase móvel composta por água:acetonitrila:metanol:ácido acético (84:10:5:1), em eluição isocrática, fluxo de 1 mL/min, coluna Varian® C18 250 x 4,6 mm, 5 µm e detector a 280 nm.....	47
Figura 10. Cromatograma da solução padrão de catequina e epicatequina em HCl 0,1 M (...) e cromatograma de solução de amido a 0,247 mg/mL, estearato de magnésio a 0,00125 mg/mL e dióxido de silício a 0,00175 mg/mL em HCl 0,1 M (—). Condições cromatográficas: fase móvel composta por água:acetonitrila:metanol:ácido acético (84:10:5:1), em eluição isocrática, fluxo de 1 mL/min, coluna Varian® C18 250 x 4,6 mm, 5 µm e detector a 280 nm.....	47
Figura 11. Curva de calibração da Catequina obtida por CLAE-UV utilizando concentrações de 0,5 a 20 µg/mL	48
Figura 12. Curva de calibração da Epicatequina obtida por CLAE-UV utilizando concentrações de 0,75 a 20 µg/mL	48
Figura 13. Curva de calibração da Catequina obtida por CLAE-UV utilizando concentrações de 0,1 a 0,75 µg/mL	54

Figura 14. Curva de calibração da Epicatequina obtida por CLAE-UV utilizando concentrações de 0,1 a 0,75 µg/mL	54
Figura 15. Cromatogramas da amostra autêntica de <i>M. ilicifolia</i> (...) e do conteúdo do fitoterápico D (—), evidenciando a ausência do marcador epicatequina no fitoterápico. Condições cromatográficas: fase móvel composta por água:acetonitrila:metanol:ácido acético (84:10:5:1), em eluição isocrática, fluxo de 1 mL/min, coluna Varian C18 250 x 4,6 mm, 5 µm e detector a 280 nm.....	59
Figura 16. Cromatograma do conteúdo do fitoterápico H. Observa-se um pico no tr de 4,25 min (seta). Condições cromatográficas: fase móvel composta por água:acetonitrila:metanol:ácido acético (84:10:5:1), em eluição isocrática, fluxo de 1 mL/min, coluna Varian C18 250 x 4,6 mm, 5 µm e detector a 280 nm.	59
Figura 17. Análise de termogravimetria (TG) e análise térmica diferencial (DTA) do marcador catequina.	64
Figura 18. Análise de termogravimetria (TG) e análise térmica diferencial (DTA) do marcador epicatequina.	64
Figura 19. Perfis de dissolução da cápsula A contendo extrato seco de <i>M. ilicifolia</i> 380 mg, utilizando catequina como marcador, nas condições preliminares do teste de dissolução.....	65
Figura 20. Perfis de dissolução da cápsula A contendo extrato seco de <i>M. ilicifolia</i> 380 mg, utilizando epicatequina como marcador, nas condições preliminares do teste de dissolução.....	65
Figura 21. Influência da velocidade de agitação no perfil de dissolução dos marcadores catequina e epicatequina nos volumes de meio de dissolução de 500mL (A) e 900mL (B), onde * p < 0,05, de acordo com o teste <i>T-student</i>	66
Figura 22. Influência do volume do meio HCl 0,1M no perfil de dissolução dos marcadores catequina e epicatequina, na velocidade de rotação de 75 rpm, onde * p < 0,05, de acordo com o teste de <i>T-student</i>	66
Figura 23. Cromatograma da solução padrão de catequina e epicatequina em HCl 0,1 M (----) e cromatograma da dissolução do invólucro da formulação A em HCl 0,1 M (—).	67
Figura 24. Curva de calibração da Catequina obtida por CLAE-UV utilizando concentrações de 0,1 a 5 µg/mL	67
Figura 25. Curva de calibração da Epiatequina obtida por CLAE-UV utilizando concentrações de 0,2 a 5 µg/mL	68
Figura 26. Comportamento de dissolução do fitoterápico A1, contendo 380 mg de extrato seco de <i>M. ilicifolia</i> , avaliado para os marcadores catequina e epicatequina....	70
Figura 27. Comportamento de dissolução do fitoterápico A2, contendo 380 mg de extrato seco de <i>M. ilicifolia</i> , avaliado para os marcadores catequina e epicatequina....	70
Figura 28. Comportamento de dissolução do fitoterápico A3, contendo 380 mg de extrato seco de <i>M. ilicifolia</i> , avaliado para os marcadores catequina e epicatequina....	70

Figura 29. Comportamento de dissolução do fitoterápico B, contendo 380 mg de extrato seco de <i>M. ilicifolia</i> , avaliado para os marcadores catequina e epicatequina.....	70
Figura 30. Comportamento de dissolução do fitoterápico C, contendo 420 mg de extrato seco de <i>M. ilicifolia</i> , avaliado para os marcadores catequina e epicatequina.....	71
Figura 31. Comportamento de dissolução do fitoterápico F, contendo 400 mg de extrato seco de <i>M. ilicifolia</i> , avaliado para os marcadores catequina e epicatequina.....	71
Figura 32. Comportamento de dissolução do fitoterápico I, contendo 300 mg de extrato seco de <i>M. ilicifolia</i> , avaliado para os marcadores catequina e epicatequina.....	71
Figura 33. Comportamento de dissolução do fitoterápico D, contendo 250 mg de pó de <i>M. ilicifolia</i> , avaliado para o marcador catequina	72
Figura 34. Comportamento de dissolução do fitoterápico E, contendo 500 mg de pó de <i>M. ilicifolia</i> , avaliado para os marcadores catequina e epicatequina	72
Figura 35. Comportamento de dissolução do fitoterápico G, contendo 400 mg de pó de <i>M. ilicifolia</i> , avaliado para os marcadores catequina e epicatequina	72
Figura 36. Comportamento de dissolução do fitoterápico H, contendo 300 mg de pó de <i>M. ilicifolia</i> , avaliado para os marcadores catequina e epicatequina	72
Figura 37. Transformação logarítmica da porcentagem de catequina não dissolvida nos fitoterápicos A1, A2, A3, B, C, F e I, contendo extrato seco de <i>M. ilicifolia</i> , aplicando o modelo de primeira ordem. Os valores correspondem à média de seis determinações	76
Figura 38. Transformação logarítmica da porcentagem de catequina não dissolvida nos fitoterápicos D, E, G, e H, contendo pó de <i>M. ilicifolia</i> , aplicando o modelo de primeira ordem. Os valores correspondem à média de seis determinações	77
Figura 39. Eficiência de dissolução (ED) dos fitoterápicos contendo extrato seco de <i>M. ilicifolia</i> , avaliada para o marcador catequina. Amostras com letras iguais não diferem estatisticamente, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$)	79
Figura 40. Eficiência de dissolução (ED) dos fitoterápicos contendo pó de <i>M. ilicifolia</i> , avaliada para o marcador catequina. Amostras com letras iguais não diferem estatisticamente, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).	79
Figura 41. Conteúdo das cápsulas A1, vistas por microscopia óptica (40x).....	81
Figura 42. Conteúdo das cápsulas A2, vistas por microscopia óptica (40x).....	81
Figura 43. Conteúdo das cápsulas A3, vistas por microscopia óptica (40x).....	81
Figura 44. Conteúdo das cápsulas B, vistas por microscopia óptica (40x).....	81
Figura 45. Conteúdo das cápsulas C, vistas por microscopia óptica (40x)	82
Figura 46. Conteúdo das cápsulas F, vistas por microscopia óptica (40x).....	82
Figura 47. Conteúdo das cápsulas I, vistas por microscopia óptica (40x)	82

Figura 48. Conteúdo das cápsulas D, vistas por microscopia óptica (10x)	82
Figura 49. Conteúdo das cápsulas E, vistas por microscopia óptica (40x).....	82
Figura 50. Conteúdo das cápsulas G, vistas por microscopia óptica (40x)	83
Figura 51. Conteúdo das cápsulas H, vistas por microscopia óptica (40x)	83
Figura 52. Porcentagem dos fitoterápicos contendo pó ou extrato seco de <i>M. ilicifolia</i> conforme e não conforme.....	83
Figura 53. Porcentagem dos fitoterápicos contendo pó ou extrato seco de <i>M. ilicifolia</i> não conforme em cada ensaio	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Condições cromatográficas empregadas na escolha do método de separação, identificação e quantificação dos marcadores catequina e epicatequina por CLAE	34
Tabela 2. Cápsulas de gelatina dura contendo pó ou extrato seco de <i>M. ilicifolia</i> , com seus respectivos valor rotulado, matéria-prima e procedência.....	34
Tabela 3. Especificações dos parâmetros avaliados em quatro condições preliminares para o ensaio de dissolução de cápsulas contendo pó ou extrato seco de <i>M. ilicifolia</i> .	40
Tabela 4. Modelos matemáticos empregados na análise comparativa do perfil de dissolução de cápsulas contendo <i>M. ilicifolia</i> , com suas respectivas equações.....	42
Tabela 5. Métodos cromatográficos, empregados com seus respectivos valores de tempo de retenção (tr), Fator de Assimetria e Número de pratos teóricos (N)	45
Tabela 6. Resultados da repetibilidade do método analítico por CLAE-UV para quantificação de catequina, em cápsulas contendo <i>M. ilicifolia</i>	49
Tabela 7. Resultados da repetibilidade do método analítico por CLAE-UV para quantificação de epicatequina, em cápsulas contendo <i>M. ilicifolia</i>	49
Tabela 8. Precisão intermediária do método por CLAE-UV para quantificação de catequina em cápsulas contendo <i>M. ilicifolia</i>	49
Tabela 9. Precisão intermediária do método por CLAE-UV para quantificação de epicatequina em cápsulas contendo <i>M. ilicifolia</i>	50
Tabela 10. Resultados da exatidão 80%, 100% e 120% do método por CLAE-UV para quantificação de catequina em cápsulas contendo <i>M. ilicifolia</i>	51
Tabela 11. Resultados da exatidão 80%, 100% e 120% do método por CLAE-UV para quantificação de epicatequina em cápsulas contendo <i>M. ilicifolia</i>	51
Tabela 12. Robustez do método por CLAE-UV para quantificação de catequina em cápsulas contendo <i>M. ilicifolia</i> , variando a temperatura da coluna cromatográfica	52
Tabela 13. Robustez do método por CLAE-UV para quantificação de epicatequina em cápsulas contendo <i>M. ilicifolia</i> , variando a temperatura da coluna cromatográfica	52
Tabela 14. Robustez do método por CLAE-UV para quantificação de catequina em cápsulas contendo <i>M. ilicifolia</i> , variando tempo de extração da amostra	53
Tabela 15. Robustez do método por CLAE-UV para quantificação de epicatequina em cápsulas contendo <i>M. ilicifolia</i> , variando tempo de extração da amostra	53
Tabela 16. Peso médio, desvio padrão e desvio padrão relativo das cápsulas A1, A2, A3, B, C, D, E, F, G, H e I, contendo pó ou extrato seco de <i>M. ilicifolia</i> .	55

Tabela 17. Variação de peso de 10 unidades de cápsulas contendo pó ou extrato seco de <i>M. ilicifolia</i> com seus respectivos valores de média, desvio padrão e desvio padrão relativo	56
Tabela 18. Variação do teor dos marcadores catequina e epicatequina e quantidade de epicatequina por grama de matéria-prima vegetal, nos diferentes fitoterápicos contendo pó ou extrato seco de <i>M. ilicifolia</i>	58
Tabela 19. Porcentagem de catequina e epicatequina dissolvida nos meios HCl 0,1 M, água e tampão fosfato pH 6,8	61
Tabela 20. Teste de estabilidade dos padrões dos marcadores catequina e epicatequina em HCl 0,1 M	62
Tabela 21. Teste de estabilidade, em HCl 0,1 M, do pó da amostra autêntica de <i>M. ilicifolia</i> avaliado para os marcadores catequina e epicatequina.	63
Tabela 22. Resultados da exatidão do teste de dissolução por CLAE-UV para quantificação de catequina em cápsulas contendo <i>M. ilicifolia</i>	68
Tabela 23. Resultados da exatidão do teste de dissolução por CLAE-UV para quantificação de epicatequina em cápsulas contendo <i>M. ilicifolia</i>	69
Tabela 24. Aplicação dos modelos ordem zero, primeira ordem e Higuchi nos perfis de dissolução de fitoterápicos contendo <i>M. ilicifolia</i>	76
Tabela 25. Equações e parâmetros cinéticos obtidos a partir dos perfis de dissolução dos fitoterápicos contendo <i>M. ilicifolia</i> , segundo a cinética de primeira ordem	78
Tabela 26. Tamanho de partícula do conteúdo das cápsulas de <i>M. ilicifolia</i>	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASC	Área sob a curva
ASC_{TR}	Área total do retângulo
CEME	Central de Medicamentos
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-UV	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detector UV
CYP450	Citocromo P 450
DP	Desvio padrão
DPR	Desvio padrão relativo
DTA	Análise térmica diferencial
ED	Eficiência de Dissolução
FA	Fator de assimetria
Fd	Fator de diluição
f₁	Fator de Diferença
f₂	Fator de Semelhança
HPLC	High-pressure liquid chromatography
LD	Limite de Detecção
ln%ND	Logaritmo neperiano da porcentagem não dissolvida
LQ	Limite de Quantificação
N	Número de pratos teóricos
PA	Para análise
PM	Peso Médio
p/v	Peso/volume
Q	Quantidade de fármaco dissolvida
Q₀	Quantidade inicial de fármaco na forma farmacêutica
r	Coefficiente linear de correlação
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RENISUS	Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS
rpm	Rotação por minuto
SUS	Sistema Único de Saúde
TG	Termogravimetria
TGI	Trato gastrointestinal
tr	Tempo de retenção
t_{85%}	Tempo no qual se dissolve 85% do ativo
USP	United States Pharmacopeia
UV/VIS	Ultravioleta/Visível
VR	Valor rotulado

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1. ESPINHEIRA-SANTA (<i>Maytenus ilicifolia</i> Mart. ex Reiss)	18
1.2. CONTROLE DE QUALIDADE DE FITOTERÁPICOS	20
1.3. DISSOLUÇÃO	22
1.3.1. Análise Comparativa do Perfil de Dissolução	27
2. OBJETIVOS	30
2.1. OBJETIVO GERAL	30
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
3. MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1. EQUIPAMENTOS	31
3.2. MATERIAIS, REAGENTES E SOLVENTES	31
3.3. MATERIAL VEGETAL	32
3.3.1. Extração do material vegetal	32
3.3.2. Quantificação dos marcadores catequina e epicatequina	32
3.4. DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DOS MARCADORES CATEQUINA E EPICATEQUINA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA	33
3.4.1. Espectrofotometria UV/VIS	33
3.4.2. Desenvolvimento das condições cromatográficas	33
3.5. FITOTERÁPICOS CONTENDO <i>M. ilicifolia</i>	34
3.6. VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO DE QUANTIFICAÇÃO DE CATEQUINA E EPICATEQUINA POR CLAE	34
3.6.1. Seletividade	35
3.6.2. Linearidade	35
3.6.3. Precisão	35
3.6.4. Exatidão	35
3.6.5. Robustez	36
3.6.6. Limites de detecção e de quantificação	36
3.7. PESO MÉDIO	37
3.8. UNIFORMIDADE DE DOSES UNITÁRIAS	37

3.9. TEOR DE CATEQUINA E EPICATEQUINA NO PRODUTO ACABADO.....	37
3.10. DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS DO ENSAIO DE DISSOLUÇÃO	38
3.10.1. Método de preparo dos meios de dissolução.....	38
3.10.1.1. Solução de HCl 0,1 M pH 1,2	38
3.10.1.2. Solução tampão fosfato monopotássico 0,2 M pH 6,8.....	38
3.10.1.3. Solução de hidróxido de sódio 0,2 M.....	38
3.10.2. Avaliação da solubilidade dos marcadores catequina e epicatequina na faixa de pH fisiológico (1,2 a 6,8)	39
3.10.3. Teste de estabilidade	39
3.10.4. Estudo de estabilidade térmica	39
3.10.5. Ensaio de dissolução	40
3.11. VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE DISSOLUÇÃO.....	40
3.11.1. Seletividade	40
3.11.2. Linearidade	40
3.11.3. Precisão e Exatidão.....	41
3.12. PERFIL DE DISSOLUÇÃO DE CÁPSULAS CONTENDO PÓ OU EXTRATO SECO DE <i>M. ilicifolia</i>	41
3.13. ANÁLISE COMPARATIVA DO PERFIL DE DISSOLUÇÃO DE CÁPSULAS CONTENDO PÓ OU EXTRATO SECO DE <i>M. ilicifolia</i>	41
3.13.1. Métodos modelo dependentes	41
3.13.2. Eficiência de dissolução	42
3.14. TAMANHO DE PARTÍCULA DO CONTEÚDO DAS CÁPSULAS DE <i>M. ilicifolia</i>	42
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
4.1. MATERIAL VEGETAL.....	43
4.1.1. Extração do material vegetal	43
4.2. DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DOS MARCADORES CATEQUINA E EPICATEQUINA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA	44
4.2.1. Espectrofotometria UV/Vis	44
4.2.2. Desenvolvimento das condições cromatográficas.....	45
4.3. VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO DE QUANTIFICAÇÃO DE CATEQUINA E EPICATEQUINA POR CLAE	46
4.3.1. Seletividade	46
4.3.2. Linearidade	48
4.3.3. Precisão	48
4.3.4. Exatidão.....	50
4.3.5. Robustez	52

4.3.6. Limites de detecção e quantificação.....	53
4.4. PESO MÉDIO	54
4.5. UNIFORMIDADE DE DOSES UNITÁRIAS.....	55
4.6. TEOR DE CATEQUINA E EPICATEQUINA NO PRODUTO ACABADO.....	57
4.7. DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS DO ENSAIO DE DISSOLUÇÃO.....	60
4.7.1. Avaliação da solubilidade da catequina e da epicatequina na faixa de pH fisiológico (1,2 a 6,8).....	60
4.7.2. Teste de estabilidade.....	61
4.7.3. Estudo de estabilidade térmica	63
4.7.4. Ensaio de dissolução.....	64
4.8. VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE DISSOLUÇÃO.....	66
4.8.1. Seletividade	66
4.8.2. Linearidade	67
4.8.3. Precisão e Exatidão.....	68
4.9. PERFIL DE DISSOLUÇÃO DE CÁPSULAS CONTENDO PÓ OU EXTRATO SECO DE <i>M. ilicifolia</i>	69
4.10. ANÁLISE COMPARATIVA DO PERFIL DE DISSOLUÇÃO DE CÁPSULAS CONTENDO PÓ OU EXTRATO SECO DE <i>M. ilicifolia</i>	75
4.10.1. Métodos modelo dependentes	75
4.10.2. Eficiência de dissolução	78
4.11. TAMANHO DE PARTÍCULA DO CONTEÚDO DAS CÁPSULAS DE <i>M. ilicifolia</i>	79
5. CONCLUSÃO.....	85
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86
7. APÊNDICE	95

1. INTRODUÇÃO

O setor de fitoterápicos movimenta globalmente cerca de US\$ 21,7 bilhões por ano. No Brasil, não existem dados oficiais atualizados, mas estima-se que este mercado represente, aproximadamente, 5% no faturamento do mercado farmacêutico, movimentando 550 milhões de dólares anualmente, sendo que a previsão para 2010 é que este faturamento ultrapasse 1 bilhão de dólares (FEBRAFAR, 2010; CARVALHO et al., 2008).

Até 2008 foram registrados 512 medicamentos fitoterápicos no Brasil (CARVALHO et al., 2008). A espécie vegetal, com origem sul-americana, detentora de um dos maiores números de registros na ANVISA (23 produtos) é a *Maytenus ilicifolia* Mart ex Reiss, conhecida popularmente por espinheira-santa (BRASIL, 2010c). Esta planta é amplamente difundida na medicina popular na forma de infusão aquosa para tratar úlceras e desordens gástricas (CORDEIRO et al., 1999; LEITE et al., 2001).

Na década de 80, foram selecionadas, pela Central de Medicamentos (CEME), 65 plantas medicinais para pesquisa e desenvolvimento de fitoterápicos. *M. ilicifolia* estava incluída neste elenco de plantas e em 1988 os estudos desta espécie foram publicados (SANT'ANA, ASSAD, 2004). Em 2006, foi aprovada por meio do Decreto n° 5813, de 22 de junho de 2006, a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, que tem como diretrizes: garantir e promover a segurança, a eficácia e a qualidade no acesso a plantas medicinais e fitoterápicos, promover a adoção de boas práticas de cultivo e manipulação de plantas medicinais e produção de fitoterápicos e estimular a produção de fitoterápicos em escala industrial (Brasil, 2006). Desde 2007, o Sistema Único de Saúde (SUS) fornece fitoterápicos à base de espinheira-santa e guaco (BRASIL, 2007) e em 2009 foi publicada a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS) constituída por 71 plantas, dentre as quais *M. ilicifolia* encontra-se inserida (BRASIL, 2009). Em 2010, foi publicada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) n° 14, a qual dispõe sobre os requisitos mínimos para o registro de medicamentos fitoterápicos, revogando a RDC n° 48 de 2004 (BRASIL, 2010a).

São conceituados como fitoterápicos aqueles medicamentos obtidos com o emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais, cuja eficácia e segurança são validadas por meio de levantamentos etnofarmacológicos, de utilização, documentações tecnocientíficas ou evidências clínicas. Os fitoterápicos são

caracterizados pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade (BRASIL, 2010a).

A fim de assegurar a qualidade dos fitoterápicos, todas as etapas do processo devem ser investigadas, desde o plantio da matéria-prima vegetal até o produto acabado para dispensação (SOUZA-MOREIRA et al., 2010). Com o crescente interesse da indústria por esses produtos há a necessidade de desenvolvimento de métodos analíticos para obtenção do perfil cromatográfico e para a determinação quantitativa das substâncias ativas, sendo que, nos casos em que as substâncias ativas são desconhecidas, pode-se estabelecer o uso de marcadores para fins analíticos (BAUER, 1998; CALIXTO, 2000; FISHER, 2005; TIBERTI et al., 2007). Os marcadores são conceituados como compostos ou classe de compostos químicos presentes na matéria-prima vegetal, que possuem, preferencialmente, correlação com o efeito terapêutico (BRASIL, 2010a).

Para os métodos analíticos empregados na avaliação da qualidade, o processo de validação é indispensável a fim de controlar os fatores que conduzem à precisão e exatidão dos dados gerados (LANÇAS, 2004; FISHER, 2005).

A quantificação de substâncias em fitoterápicos ainda é realizada de forma incipiente. Além da escassa disponibilidade de substâncias químicas de referência para comparações com as matérias primas vegetais, outro fator que dificulta a análise desses produtos é a presença nas plantas de um fitocomplexo ativo. A existência de inúmeros constituintes químicos torna o controle de qualidade de fitoterápicos mais complexo do que o de medicamentos sintéticos e variações entre lotes de um mesmo fitoterápico, por essa razão, podem ser observadas. Além da dificuldade de caracterização de todas as substâncias presentes, em alguns casos, há a impossibilidade de distinguir qual substância é responsável pelo efeito, visto que a ação terapêutica pode ser resultante de sinergismo (BARNES, 2003; RIBEIRO et al., 2005).

No controle de qualidade de formas farmacêuticas sólidas, o ensaio de dissolução é requerido para garantir a qualidade dos lotes, orientar o desenvolvimento de novas formulações e assegurar uniformidade da qualidade e do desempenho após determinadas alterações (BRASIL, 2003b). Após administração oral, a liberação do fármaco de uma forma farmacêutica sólida e sua dissolução nos fluidos biológicos, notadamente do trato gastrointestinal (TGI), são etapas que precedem a absorção de substâncias e, assim, a dissolução pode ser relevante na predição do desempenho *in vivo* (MARCOLONGO, 2003).

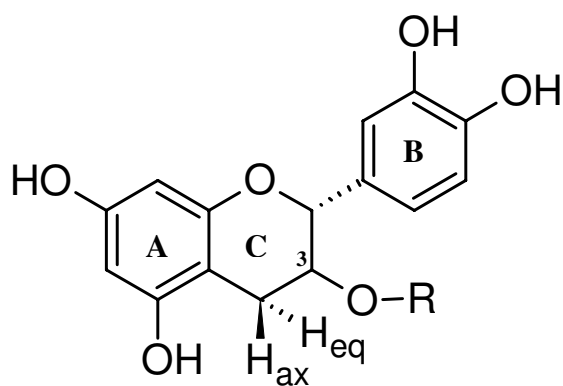
1.1. ESPINHEIRA-SANTA (*Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss)

Maytenus ilicifolia Mart. ex Reiss (Celastraceae) conhecida popularmente por espinheira-santa, cancorosa, cancerosa e espinheira-divina, é um arbusto que mede cerca de 5 metros de altura (Figura 1) e é encontrado no sul do Brasil, no Paraguai, no Uruguai e no nordeste da Argentina (ITOKAWA et al., 1994; ALONSO, DESMARCHELIER, 2007). É conhecida como espinheira-santa por causa dos espinhos na margem de suas folhas, todavia, outras espécies apresentam morfologia semelhante (e.g *Sorocea bomplandii* e *Zolernia ilicifolia*) e são utilizadas como adulterantes nas formulações de *M. ilicifolia* (LEITE et al., 2001; DUARTE, DEBUR, 2005).



Figura 1. *Maytenus ilicifolia* (A) arbusto, (B) folhas. Foto: Ana Flavia V. B. Leal

Os principais constituintes de suas folhas são os compostos terpênicos (maitenina, friedelina e friedelan-3-ol) e os compostos polifenólicos (derivados de quercetina e kaempferol; taninos condensados, tais como catequina, 4-O-metilepigalocatequina e epicatequina) (XAVIER, D'ANGELO, 1996; QUEIROGA et al., 2000; ALONSO, DESMARCHELIER, 2007). As estruturas químicas dos taninos catequina e epicatequina estão demonstradas na Figura 2.



3 (C)	R	Substância
—	H	Catequina
.....	H	Epicatequina

Figura 2. Estrutura química dos marcadores catequina e epicatequina, isolados das folhas de *M. ilicifolia*. Adaptado de PESSUTO et al., 2009.

Vários estudos já foram conduzidos para investigar as propriedades farmacológicas das substâncias extraídas das folhas desta espécie. Potente redução da hipersecreção gástrica foi observada após administração de uma fração enriquecida em flavonóides isolada das folhas de *M. ilicifolia* a qual apresentou como componentes majoritários o galactitol (25%), a epicatequina (3,1%) e a catequina (2%) (BAGGIO et al., 2007). Ferreira et al., (2004) sugeriram que o extrato aquoso liofilizado das folhas de *M. ilicifolia* inibiria a secreção de ácido da mucosa pelo mesmo mecanismo da cimetidina, ou seja, pelo antagonismo dos receptores H₂ de histamina. Além dos taninos, também já foi evidenciada a participação de polissacarídeos isolados de *M. ilicifolia* no efeito anti-úlceras desta planta (CIPRIANI et al., 2006; CIPRIANI et al., 2008; CIPRIANI et al., 2009).

Baggio et al., (2009) demonstraram redução da motilidade intestinal e do esvaziamento gástrico em camundongos, mediado por via muscarínica. A investigação química da fração testada revelou a presença de flavonóides glicosídeos contendo de 1 a 4 unidades de monossacarídeo apresentando a quercetina e o kaempferol como aglicona e taninos (catequina/epicatequina e afzelequina/epiafzelequina).

Potente efeito hipotensivo *in vivo* óxido nítrico dependente foi observado para frações semi-purificadas de *M. ilicifolia* constituída, principalmente por flavonóides (catequina, epicatequina e glicosídeos (mono- a triglicosídeo)) (CRESTANI et al., 2009). Estes dados corroboram com o estudo realizado por Rattmann et al., (2006) que evidenciaram potente vasodilatação dependente de óxido nítrico provocado por fração isolada de *M. ilicifolia* contendo catequina.

Além disso, foi evidenciada ação antioxidante de frações e taninos condensados (epicatequina, epigallocatequina, catequina, epicatequina-(4 β →8)-catequina e

epicatequina-(4 β →8)-epicatequina) isolados das folhas de *M. ilicifolia* (PESSUTO et al., 2009). Atividades anti-inflamatória, antinociceptiva e antiulcerogênica foram demonstradas para frações hexânicas e de acetado de etila de folhas *M. ilicifolia*. O estudo fitoquímico revelou a presença de triterpenos e esteróides na fração hexânica e de taninos condensados e flavonóides na fração de acetato de etila (JORGE et al., 2004). Outra atividade relatada foi a ação leishmanecida *in vitro* dos extratos aquoso e etanólico das raízes de *M. ilicifolia* (ALVARENGA et al., 2008).

Em relação aos efeitos adversos no aparelho reprodutor, observou-se que o extrato etanólico das folhas de *M. ilicifolia* não provocou distúrbios na espermatogênese (MONTANARI et al., 1998). Porém, o extrato hidroalcolólico liofilizado pode reduzir a implantação do embrião no início da gestação (MONTANARI, BEVILACQUA, 2002).

1.2. CONTROLE DE QUALIDADE DE FITOTERÁPICOS

A crença de que os fitoterápicos são medicamentos seguros porque são de origem natural representa um entrave à regulação (ROUSSEAU, SCHACHTER, 2003). Deve-se enfatizar que natural não é sinônimo de inofensivo, e diante da complexidade de sua composição há a possibilidade de desencadear hipersensibilidade e reações adversas assim como os medicamentos sintéticos (FISHER, 2005). Podem-se relatar vários problemas relacionados ao uso de produtos de origem vegetal como, por exemplo, o risco de toxicidade (com o uso contínuo de kava kava observa-se disfunção renal e hepática), interações (erva de São João é indutor de algumas enzimas do CYP450, interagindo com digoxina, amitriptilina e indinavir) e adulterações (*Sorocea bomplandii* e *Zollernia ilicifolia* são utilizadas como adulterantes em formulações contendo *M. ilicifolia* e apesar de apresentarem alguns constituintes em comum, não há estudos comparativos de eficácia nem que assegurem a falta de toxicidade crônica) (COELHO et al., 2003; ERNST 2004; COULAUD-CUNHA et al., 2005).

Vários países diferem quanto à regulamentação dos fitoterápicos. Nos Estados Unidos os fitoterápicos são classificados, juntamente com as vitaminas e os minerais, como suplementos dietéticos e diferentemente dos medicamentos, podem ser produzidos e vendidos antes de comprovarem sua segurança e eficácia (BENT, 2007). Na União Européia os fitoterápicos são considerados como medicamentos e neste caso, o registro é requerido conforme a legislação farmacêutica (KOLL et al., 2003). No

Brasil, as diretrizes para registro e comercialização desses produtos são definidas pela ANVISA (BRASIL, 2010a).

A garantia do uso seguro e eficaz de fitoterápicos envolve análises físico-químicas e microbiológicas de matérias-primas e de produto acabado, como etapa preliminar para alcançar um padrão de qualidade necessário a um medicamento (BARA et al., 2006).

A qualidade da matéria-prima vegetal e sua composição química podem variar de acordo com fatores relacionados às condições climáticas, ao período de coleta, as práticas agrônomas, à exposição à luz, ao processo de secagem e ao armazenamento. Para as etapas intermediárias do processo e para o produto acabado deve-se considerar a influência dos fatores tecnológicos como processamento e excipientes, realizando as análises físico-químicas e microbiológicas específicas de cada forma farmacêutica a fim de alcançar um padrão de qualidade (CALIXTO, 2000; BAST et al., 2002; ANTONELLI-USHIROBIRA et al., 2004; FISHER, 2005; BARA et al., 2006; MIGLIATO et al., 2007; KRATZ et al., 2008).

Vários estudos estão sendo conduzidos no Brasil a fim de verificar a qualidade de matérias-primas vegetais e de fitoterápicos comercializados e em muitos casos fica evidente a limitada qualidade e a precária fiscalização dos produtos (BARA et al., 2004; MELO et al., 2004; NASCIMENTO et al., 2005; MARTINS, BRANDÃO, 2006; CHIMIN et al., 2008). De 12 preparações farmacêuticas de castanha-da-índia (*Aesculus hippocastanum* L.) (9 cápsulas contendo droga em pó e 3 comprimidos contendo extrato seco) 91,37% foram reprovadas no teor de aescina, 66,7% na variação de peso e 100% na análise de rótulos e embalagens (MARTINS, BRANDÃO, 2006). BARA et al., (2004) avaliaram a qualidade de fitoterápicos contendo *Ginkgo biloba* L. e verificaram que 91% das cápsulas analisadas não correspondiam aos valores declarados pelo fabricante em relação ao teor de ginkgoflavonóides. A avaliação de amostras comerciais à base de boldo (*Peumus boldus* Molina), ginko (*Ginkgo biloba* L.) e pata-de-vaca (*Bauhinia spp.*), na cidade de Recife-PE, demonstraram porcentagens de não conformidade de, respectivamente, 100%, 85,71% e 55,55% quando avaliados quanto a rótulos e bula, análise sensorial, autenticidade e pureza (MELO et al., 2004). Outro estudo realizado na cidade de Recife-PE com amostras à base de erva-doce (*Pimpinella anisum* L.), quebra-pedra (*Phyllanthus spp.*), espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart.) e camomila (*Matricaria recutita* L.) revelou percentuais de reprovação de 12,5% a 96,87% nos testes de umidade, presença de matéria estranha e análise botânica, fitoquímica e de rótulos e bulas (NASCIMENTO et al., 2005).

1.3. DISSOLUÇÃO

O teste de dissolução determina a porcentagem da quantidade de substância ativa, declarada no rótulo do produto, liberada no meio de dissolução sob condições experimentais descritas (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988). Após administração oral, a liberação do fármaco de uma forma farmacêutica sólida e sua dissolução nos fluidos biológicos, notadamente do TGI, são etapas que precedem a absorção de substâncias e, assim, a dissolução pode ser relevante na predição do desempenho *in vivo* (MARCOLONGO, 2003).

A liberação do fármaco de formas farmacêuticas sólidas convencionais envolve duas etapas seqüenciais: desintegração e dissolução (SERRA, STORPIRTIS, 2007; EL-YAZIGI, 1981). Para as cápsulas, a etapa de desintegração implica na dissolução do invólucro e na desagregação de seu conteúdo (EL-YAZIGI, 1981). A dissolução de um fármaco não ocorre apenas a partir das partículas menores, mas também dos agregados ou grânulos formados após a desintegração, conforme ilustrado no esquema proposto por WAGNER, 1969 (Figura 3). Em solução, o fármaco pode atravessar as membranas do TGI para chegar aos vasos sanguíneos mesentéricos, que carregam o fármaco via veia porta e fígado à circulação sistêmica (TOZER, ROWLAND, 2009).

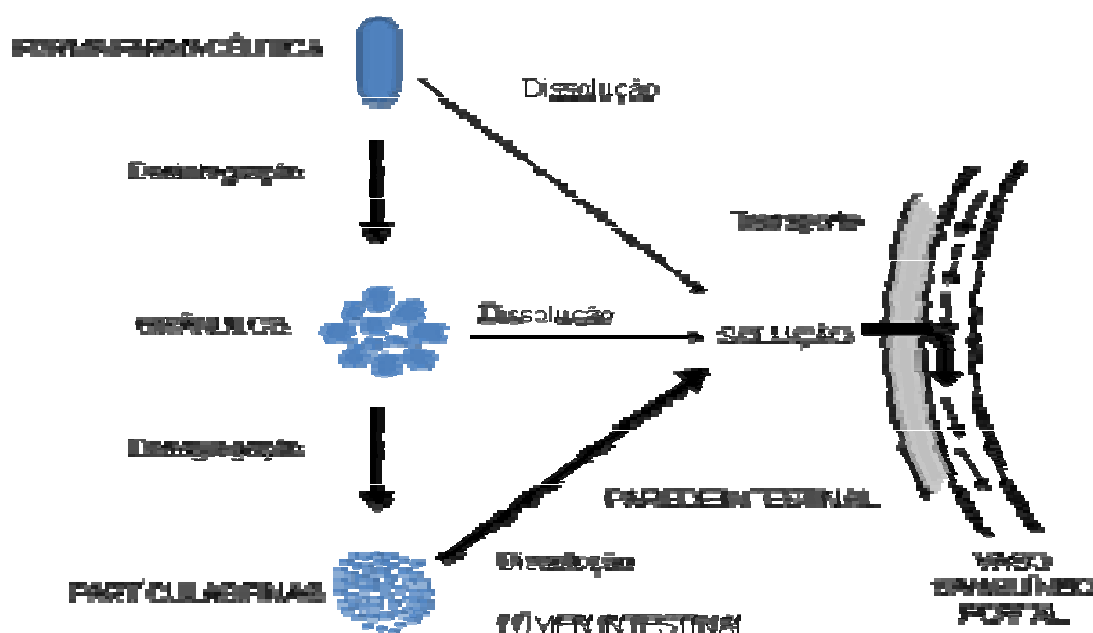


Figura 3. Representação esquemática dos processos envolvidos na dissolução. Adaptado de WAGNER, 1969 e TOZER, ROWLAND, 2009)

O percentual dissolvido pode ser influenciado por diversos fatores, como os relacionados ao fármaco (e. g. solubilidade, tamanho de partículas e natureza química), ao processo de fabricação, às variações de formulação (tipo ou quantidade de excipiente) e às condições do teste de dissolução (e. g. velocidade de agitação, temperatura e meio de dissolução) (SKOUG et al., 1997; ABDON et al., 2004; AULTON, 2005). Abaixo estão descritos alguns dos fatores que influenciam este processo:

- **Superfície e tamanho de partícula:** Quanto menor o tamanho de partícula, maior será a superfície de contato e mais rápida será a dissolução do fármaco. Assim, a micronização das partículas pode ser uma ferramenta útil para aumentar a dissolução do fármaco. Partículas que tendem a formar aglomerados no meio de dissolução têm sua área superficial reduzida, necessitando da adição de adjuvantes (e.g. agentes molhantes). A forma e a densidade da partícula são fatores que influenciam na área de superfície. (MARCOLONGO, 2003; AULTON, 2005).
- **Forma farmacêutica:** Após administradas, as cápsulas de gelatina rompem-se rapidamente expondo seu conteúdo nos fluido biológicos do TGI. Todavia, a tecnologia de fabricação e a adição de diluentes podem alterar este processo (MARCOLONGO, 2003). Em relação aos comprimidos, o método de granulação, o conteúdo de umidade e a força de compressão são fatores que exercem grande influência nas taxas de dissolução dos ingredientes ativos (ABDON et al., 2004).
- **Excipientes:** Fármacos hidrossolúveis são mais bem dispersos com diluentes insolúveis, como o amido, uma vez que este adjuvante auxilia na desagregação sem interferir na solubilidade do fármaco no meio dissolvente. Dentre os lubrificantes, o mais utilizado na encapsulação é o estearato de magnésio. Níveis elevados de estearato podem reduzir a velocidade de dissolução devido à escassa molhabilidade da massa de pó. Entretanto, quantidades adequadas desse adjuvante podem diminuir a coesividade entre partículas pequenas, fazendo com que se espalhem mais rapidamente no meio de dissolução. Para fármacos pouco solúveis a adição de agentes molhantes como o tensoativo laurilsulfato de sódio pode ser uma ferramenta útil (AULTON, 2005).

- **Velocidade de agitação:** A taxa de dissolução é diretamente afetada pela velocidade de agitação, uma vez que é gerado um fluxo que altera continuamente a interface líquido-sólida entre o solvente e o fármaco. A agitação deve ser mantida a um nível relativamente baixo a fim de evitar turbulências e obter resultados mais confiáveis (MARCOLONGO, 2003; ABDON et al., 2004).
- **Temperatura do meio de dissolução:** Geralmente temperaturas elevadas favorecem a dissolução e a solubilidade dos fármacos. Como a solubilidade depende da temperatura, a temperatura do teste deve ser monitorada para evitar grandes variações (MARCOLONGO, 2003; ABDON et al., 2004).
- **pH do meio de dissolução:** A escolha do pH do meio deve considerar, principalmente, o tipo de liberação do fármaco (imediate ou não) e o sítio de absorção do mesmo (MARCOLONGO, 2003). No caso de fármacos que são eletrólitos fracos, a solubilidade em meio aquoso é dependente do pH e, assim, pode-se esperar velocidades de dissolução, diferenciadas conforme a região do TGI. Com o aumento do pH (conforme o fármaco vai descendo o TGI), a solubilidade de fármacos fracamente ácidos se eleva enquanto que a solubilidade de bases fracas diminui (AULTON, 2005).

Existem três categorias de ensaio de dissolução para medicamentos de liberação imediata: ensaio de dissolução de um único ponto, ensaio de dissolução de dois pontos e perfis de dissolução (BRASIL, 2003b; SERRA, STORPIRTIS, 2007).

A especificação de um único ponto corresponde a um teste de controle de qualidade de rotina (para medicamentos contendo fármacos altamente solúveis). O ensaio de dois pontos pode ser utilizado para caracterizar a qualidade do medicamento ou como um teste de controle de qualidade de rotina para certos tipos de medicamentos (e.g. fármacos poucos solúveis em água que se dissolvem lentamente) (BRASIL, 2003b). O perfil de dissolução é obtido pela realização de várias coletas do meio de dissolução, em tempos adequados, determinando-se a porcentagem de fármaco dissolvida a cada tempo. É uma importante ferramenta no desenvolvimento de formulações, uma vez que evidencia diferenças na dissolução causadas por fatores relacionados ao fármaco, aos excipientes e à técnica de fabricação empregada (MAHLE et al., 2007). Permite uma análise mais conclusiva, porém a grande dificuldade reside na comparação dos perfis (SERRA, STORPIRTIS, 2007).

Várias condições devem ser investigadas no desenvolvimento dos testes de dissolução, que podem incluir: utilização de no mínimo três meios diferentes (pH 1,0 a 6,8), adição de tensoativos e uso de pá ou cesta, variando-se as velocidades de agitação (BRASIL, 2003b). Na escolha do meio de dissolução, a influência do pH na solubilidade e na estabilidade em solução do fármaco devem ser investigadas (USP, 2007a). Usualmente, para os aparatos pá e cesta, o volume do meio de dissolução varia de 500 mL a 1000 mL, sendo que o volume de 900 mL é o mais comum (USP, 2007a). Em relação às velocidades de agitação, as mais utilizadas para formulações de liberação imediata são: 100 rpm para o aparato cesta e 50 ou 75 rpm para o aparato pá (USP, 2007a).

Apesar de ser um teste de rotina no controle de qualidade de fármacos sintéticos, a dissolução não é investigada com frequência para os fitoterápicos (TAGLIOLI et al., 2001). A Câmara Técnica de Fitoterápicos da ANVISA, diante da importância do teste de dissolução no controle de qualidade, emitiu um posicionamento quanto ao registro de fitoterápicos no qual preconiza a realização nas indústrias do teste de único ponto (BRASIL, 2010b).

Na literatura existem alguns trabalhos disponíveis abordando perfis de dissolução de fitoterápicos. Sittichai et al., (2007) realizaram um estudo de dissolução de cápsulas de açafrão (*Curcuma longa* L.). O método foi conduzido no aparato cesta com velocidade de agitação de 100 rpm e a adição de 0,8% de lauril sulfato de sódio no meio ácido clorídrico (HCl) 0,05 M resultou em aumento da liberação de curcuminóides de 1% para 75% em 60 minutos.

Comprimidos contendo extrato nebulizado de *M. ilicifolia* Mart., contendo 133,6 mg/g de polifenóis, utilizando o pirogalol como substância de referência, foram submetidos à ensaio de dissolução conduzido com o aparato pá, velocidade de agitação de 100 rpm e volume de meio de 900 mL (água a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$). Apesar da elevada quantidade de extrato contida nos comprimidos (375 mg), verificou-se relevante influência dos adjuvantes no perfil de dissolução, principalmente dos diluentes (celulose microcristalina e lactose). A adição de lactose, que é mais hidrossolúvel do que a celulose microcristalina, resultou em formulações de liberação mais rápida e com maior eficiência de dissolução (ED) (SOUZA, et al., 2001).

Os perfis de dissolução de seis fitoterápicos à base de *Ginkgo biloba* L. foram avaliados com base no conteúdo de bilobalídeo dissolvido em função do tempo, utilizando 500 mL de HCl 0,1 M ($37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$) como meio de dissolução e aparato pá sob agitação a 75 rpm. Apenas um dos medicamentos, o qual era comercializado sob a

forma de cápsulas, estava em desacordo com o critério de aceitação da Farmacopéia Americana (USP 29) que preconiza que não menos do que 75% da concentração total do bilobalídeo devem estar dissolvidos após 45 minutos de teste (KRATZ et al., 2008).

COSTA et al., (2010) aplicaram o teste de dissolução em fitoterápicos à base de *Passiflora* sp. produzidos com pó ou extrato seco. Como meio de dissolução foi utilizado 500 mL de HCl 0,1 M ($37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$) e aparato pá sob agitação a 50 rpm. Embora o pó utilizado no estudo apresentasse maior conteúdo de flavonóides totais (2%), a dissolução das cápsulas contendo extrato seco (conteúdo de flavonóides: 0,97%) foi 12% maior ao final de 30 minutos de teste.

O comportamento de dissolução de cinco fitoterápicos (cápsulas e comprimidos) contendo guaraná (*Paullinia cupana*) foi avaliado baseando-se na quantidade dissolvida dos marcadores cafeína, teofilina, catequina e epicatequina. O teste foi conduzido com 900 mL de meio de dissolução (HCl 0,1 M a $37,5^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$) e aparato pá sob agitação a 75 rpm. Verificou-se que 100% dos fitoterápicos estavam em desacordo quanto à presença dos quatro marcadores. Das três cápsulas analisadas, apenas uma atingiu 80% de marcadores dissolvidos, enquanto que as demais não excederam 60%. Entre os comprimidos, um apresentou 100% de cafeína dissolvida (único marcador detectado para este fitoterápico) e o outro, possivelmente por problemas farmacotécnicos, não liberou mais do que 40% de seus marcadores (SOUSA et al., 2010).

Taglioli et al., (2001) analisaram o perfil de dissolução de fitoterápicos a base de *Ginkgo biloba* L., *Passiflora* sp. e *Senna* sp. avaliando, respectivamente, os marcadores rutina, vitexina e senosídeo A. A formulação contendo pó de sene liberou, em 60 minutos, cerca de um décimo do seu conteúdo enquanto que a preparada com extrato liofilizado liberou 95,7% de senosídeos após o mesmo período. Para o fitoterápico de *Passiflora* sp, as preparações contendo extrato liofilizado alcançaram uma percentagem de liberação de vitexina próxima de 100%. Já o fitoterápico preparado com o pó apresentou cerca de 50% de liberação em igual período. Foram comparadas formulações contendo *Ginkgo biloba* granulado, extrato liofilizado e pó. O extrato liofilizado apresentou o melhor perfil de dissolução (em 15 minutos cerca de 100% de rutina liberada), porém, o granulado e o pó também revelaram um bom desempenho e, assim, pode-se considerar que as três formulações são praticamente equivalentes *in vitro*. Estes resultados demonstraram a necessidade da avaliação do perfil de dissolução de fitoterápicos durante a etapa de desenvolvimento do produto a fim de garantir qualidade e segurança visto que diferenças relevantes nos

comportamentos de dissolução foram verificadas conforme o processamento da matéria-prima vegetal.

1.3.1. Análise Comparativa do Perfil de Dissolução

A comparação de perfis de dissolução é útil quando se deseja comparar produtos de fabricantes diferentes, conhecer o comportamento do medicamento antes de submetê-lo a Estudo de Biodisponibilidade Relativa/Bioequivalência, para isenção de menores dosagens desses estudos e para alterações pós-registro (BRASIL, 2003b; BRASIL, 2010a). Vários métodos têm sido propostos para avaliação comparativa entre os perfis de dissolução: (1) Método baseado na análise de variância (ANOVA); (2) Método modelo independente; (3) Método modelo dependente (SERRA, STORPIRTIS, 2007).

Os métodos baseados na análise de variância determinam, através de repetidos ensaios, as fontes de variação (tempo, produto e interação entre tempo *versus* produto) (YUKSEL et al., 2000; SERRA, STORPIRTIS, 2007).

Dentre os métodos designados de modelo independentes destacam-se os testes combinados como os fatores f_1 (fator de diferença) e f_2 (fator de similaridade), que comparam diretamente a diferença entre a porcentagem de fármaco dissolvida por unidade de tempo para os produtos teste e referência (YUKSEL et al., 2000). Quando a substância ativa apresentar alta solubilidade e a formulação for de liberação imediata, apresentando dissolução muito rápida, os fatores f_1 e f_2 perdem o seu poder discriminativo e, portanto, não é necessário calculá-los (BRASIL, 2003b).

Por sua vez, os métodos modelo dependentes são baseados em funções matemáticas distintas que permitem a interpretação quantitativa dos valores obtidos no ensaio de dissolução em relação aos parâmetros derivados da aplicação do modelo (SERRA & STORPIRTIS, 2007; RODRIGUES et al., 2008). Os parâmetros cinéticos permitem melhor conhecer o processo de dissolução e são importantes para estabelecer a velocidade e a eficiência da dissolução (AGUIAR et al., 2005; MAHLE et al., 2007). Existem diversos modelos dependentes para representar o perfil de dissolução de fármacos, dentre os quais se podem citar:

- **Modelo de ordem zero:** Formas farmacêuticas que seguem este perfil não desagregam e liberam o fármaco lentamente (assumindo que a sua área não se modifique e que não se atinjam condições de equilíbrio) (COSTA, LOBO, 2001). Como a quantidade liberada, por unidade de tempo, é sempre a mesma, este é um modelo

ideal para descrever formas farmacêuticas de liberação prolongada e, assim, se aplica a sistemas transdérmicos, sistemas osmóticos e comprimidos matriciais que contenham fármacos poucos solúveis (VARELAS et al., 1995; COSTA, LOBO, 2001; DASH et al., 2010).

- **Modelo de primeira ordem:** As formas farmacêuticas que seguem este perfil liberam o fármaco de forma proporcional à quantidade remanescente no seu interior de tal modo que a quantidade de fármaco liberada por unidade de tempo diminui (COSTA, LOBO, 2001; MANADAS et al., 2002; DASH et al., 2010). Este modelo se aplica a formas farmacêuticas que contêm fármacos hidrossolúveis em matrizes porosas (MULYE, TURCO, 1995).
- **Modelo de Higuchi:** Higuchi descreve a liberação do fármaco como um processo de difusão baseado na lei de Fick, dependente da raiz quadrada do tempo. Este modelo descreve a dissolução de vários tipos de formas farmacêuticas de liberação modificada e a liberação de fármacos a partir de matrizes insolúveis e inertes (WAGNER, 1969; COSTA, LOBO, 2001; DASH et al., 2010).

Um método alternativo para avaliar perfis de dissolução é a de eficiência de dissolução que foi conceituada por Khan em 1975. Consiste na avaliação comparativa da área sob a curva (ASC) do perfil de dissolução em relação à área do retângulo que corresponde a 100% de dissolução no mesmo período de tempo (Figura 4; KHAN, 1975). Este método não avalia apenas a quantidade liberada em determinado tempo, mas a cinética de liberação de todo o período (MANADAS et al., 2002). O seu uso para comparar formulações tem sido defendido por alguns autores, uma vez que a biodisponibilidade do mesmo modo é determinada pelo cálculo da ASC (MAHLE et al., 2007). Além de permitir a comparação de um grande número de formulações, este método possibilita a relação teórica com dados *in vivo*, se assumimos que a extensão da absorção *in vivo* de um fármaco é proporcional à sua concentração em solução e ao tempo em que esta solução permanece em contato com as regiões de absorção do TGI (KHAN, 1975).

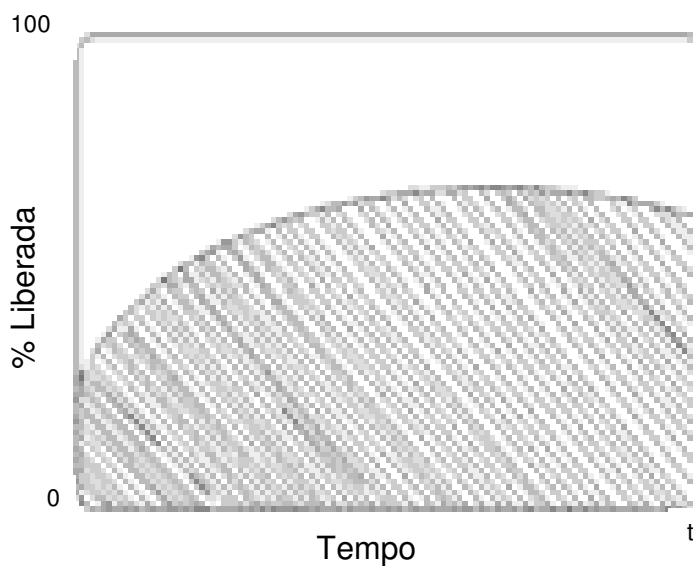


Figura 4. Representação gráfica do conceito de eficiência de dissolução. Adaptado de KHAN, 1975.

Apesar do uso difundido de *M. ilicifolia* na medicina popular e na rede pública de saúde, não existe ainda teste oficial de dissolução para formas farmacêuticas contendo esta espécie. Ante o exposto, o presente trabalho visa o desenvolvimento de método analítico em cromatógrafo líquido de alta eficiência para quantificação dos marcadores catequina e epicatequina e a análise da qualidade de cápsulas de gelatina dura contendo pó ou extrato seco de *M. ilicifolia*, com ênfase no ensaio de dissolução.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a qualidade de cápsulas contendo pó ou extrato seco de *M. ilicifolia* com ênfase na realização de ensaios de dissolução e quantificação dos seus marcadores por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver e validar método analítico por CLAE para quantificação de catequina e epicatequina;
- Desenvolver e validar método de dissolução para cápsulas de gelatina dura contendo pó ou extrato seco de *M. ilicifolia*;
- Aplicar o método de dissolução validado em cápsulas de gelatina dura, adquiridas no mercado farmacêutico local, contendo pó ou extrato seco de *M. ilicifolia*;
- Comparar o comportamento de dissolução das diferentes cápsulas e avaliar suas respectivas cinéticas e eficiência de dissolução;
- Avaliar a qualidade de cápsulas de gelatina dura, adquiridas no mercado farmacêutico local, contendo pó ou extrato seco de *M. ilicifolia* por meio dos testes de peso médio, variação de peso, dissolução, perfil cromatográfico e análise sensorial.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. EQUIPAMENTOS

- Amostrador Automático do dissolutor - Vankel (Modelo VK 8000)
- Balança Analítica - Gehaka (Modelo AG 200)
- Balança de infravermelho – Ohaus (Modelo MB 35)
- Balança Semi-Analítica – Tecnal (Modelo B TEC1300)
- Banho-Maria – Fisoton (Modelo 552)
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência – Varian (Injeção automática; Amostrador – Modelo Pro Star 410; Detector Modelo Pro Star 325; Bomba - Modelo Pro Star 210; Sistema de aquisição – Galaxie versão 1,9 work station)
- Coluna Chomspheer 5 µm, Varian C18 250 x 4,6 mm
- Dissolutor – Varian (Modelo Vankel 7000)
- Espectrofotômetro UV/Vis – Varian (Modelo Cary 50)
- Lavadora Ultra-sônica – Unique (Modelo USC 2800 A)
- Micropipeta automática 100-1000µL – Brand
- Microscópio óptico – LEICA (Modelo DME)
- Milli Q Gradiente – Millipore®
- Mini incubadora com agitação orbital – Marconi (Modelo MA 410)
- pHmetro digital – Gehaka (Modelo PG 1800)
- Termobalança Shimadzu DTG-60, dotado de controlador de fluxo para gás de purga (N₂) FC-60A, integrador TA-60WS e software de controle e avaliação TA-60WS.

3.2. MATERIAIS, REAGENTES E SOLVENTES

- Ácido acético UV/HPLC – Vetec (Lote 0702768)
- Ácido clorídrico PA – Impex (Lote 18058-MQ)
- Acetonitrila HPLC – Fisher Scientific (Lote 093105)
- Aerosil® 200 Farma – Degussa (Lote 3754012922)
- Amido de milho farmacêutico
- Estearato de Magnésio – Casa das Essências
- Epicatequina, 96,4% – Sigma Aldrich (Lote 1361450)
- Fosfato de potássio monobásico anidro p.a. – Synth

- Hidrato de Catequina, 98,9% - Sigma Aldrich (Lote 1427883)
- Hidróxido de sódio P.A. – Biotec
- Membrana HA em ésteres de celulose 0,45 micra - Millipore
- Metanol HPLC – J.T.Baker (Lote H39E08)
- Unidade filtrante MILLEX, 0,45 µm – Millipore

3.3. MATERIAL VEGETAL

Uma amostra autêntica de folhas de *M. ilicifolia* foi coletada no dia 10 de março de 2010 no Horto de Plantas Medicinais da Faculdade de Farmácia-UFG (FF/UFG), cujas coordenadas geográficas são: 768 m de altitude, 16° 40' 33,3" Sul e 49° 14' 39,5" Oeste. A amostra foi identificada pelo prof. Dr. José Realino de Paula (FF/UFG) e uma exsicata foi depositada no Herbário da UFG-27161.

A secagem das folhas foi realizada em estufa com circulação forçada a 40°C por 72 horas. Após pulverização, o pó obtido foi colocado em tamis com malha de 0,5 mm e submetido à agitação manual. O teor de voláteis do pó foi determinado em balança de infravermelho. Foram acondicionados 1,154 g do pó da amostra autêntica de *M. ilicifolia* em prato metalizado, de forma a preencher todo o fundo do recipiente. Foi utilizado o modo automático de secagem até que se atingisse peso constante.

3.3.1. Extração do material vegetal

Pesou-se 100 mg do pó de *M. ilicifolia*, obtido conforme o item 3.3, o qual foi transferido para balão volumétrico de 200 mL. Foram adicionados 190 mL de HCl 0,1 M, seguindo-se de agitação em banho de ultrassom por 10 minutos. Depois de completar o volume com o mesmo solvente, a mistura foi filtrada em papel de filtro, descartando-se os primeiros 20 mL. O filtrado foi submetido à filtração em Millex[®].

3.3.2. Quantificação dos marcadores catequina e epicatequina

Foi preparada uma curva de calibração a partir de solução mãe (100 µg/mL em HCl 0,1M) dos padrões dos marcadores catequina e epicatequina nas concentrações de 100; 60; 40; 20; 10; 5; 2,5 e 1,25 µg/mL.

A amostra autêntica e o conteúdo das cápsulas de *M. ilicifolia* foram submetidos ao processo de extração descrito no item 3.3.1 e em seguida, a quantificação dos marcadores catequina e epicatequina foi realizada, em triplicata, por CLAE. Após

regressão linear dos dados obtidos na curva de calibração, aplicou-se a *equação 1* para calcular o teor.

$$\% = \frac{C \times Fd \times 100}{m} \quad (\text{Equação 1})$$

Em que:

C = valor correspondente à concentração da amostra em $\mu\text{g/mL}$, obtida a partir da curva de calibração

Fd = Fator de diluição da amostra

m = massa da amostra em μg

O fator de diluição (Fd) corresponde às diluições sucessivas que a amostra sofre até chegar à solução final analisada. Neste caso, a diluição (solução mãe) é de 200. Assim, o Fd corresponde a 200.

3.4. DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DOS MARCADORES CATEQUINA E EPICATEQUINA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

3.4.1. Espectrofotometria UV/VIS

Espectro de absorção no UV/VIS (varredura) na faixa de comprimento de onda de 200 a 500 nm foi realizado a fim de verificar a absorção máxima dos marcadores e definir as condições a serem utilizadas no método analítico de quantificação. Foram preparadas soluções dos padrões de catequina (16 $\mu\text{g/mL}$ em HCl 0,1M) e epicatequina (8 $\mu\text{g/mL}$ em HCl 0,1M).

3.4.2. Desenvolvimento das condições cromatográficas

A condição cromatográfica inicialmente testada foi baseada em método descrito por SOUZA et al., 2008 (método 1). Os métodos posteriores desenvolvidos foram resultados de modificações em alguns parâmetros, conforme descrito na Tabela 1. Foi empregada a coluna cromatográfica C18, 250 x 4,6 mm. 5 μm , Varian, modo de eluição isocrático e volume de injeção de 20 μL . O comprimento de onda utilizado foi determinado pela avaliação dos espectros de absorção no UV dos marcadores conforme descrito no item 3.4.1.

Tabela 1. Condições cromatográficas empregadas na escolha do método de separação, identificação e quantificação dos marcadores catequina e epicatequina por CLAE

MÉTODOS	CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS
Método 1	Fase Móvel: água + ácido. Acético 1%: Acetonitrila (90:10) Fluxo: 0,8 mL/min.
Método 2	Fase Móvel: água + ácido. Acético 1%: Acetonitrila (90:10) Fluxo: 1 mL/min; Forno: 30 °C
Método 3	Fase Móvel: água + ácido Acético 1%: Acetonitrila (90:10) Fluxo: 1 mL/min; Forno: 35 °C
Método 4	Fase Móvel: água + ácido Acético 1%: Acetonitrila:Metanol (85:10:5) Fluxo: 1 mL/min; Forno: 35 °C

3.5. FITOTERÁPICOS CONTENDO *M. ilicifolia*

Foram avaliadas onze amostras de cápsulas de gelatina dura, contendo pó ou extrato seco de *M. ilicifolia* (Tabela 2), que receberam as denominações de A, B, C, D, E, F, G, H, e I. Os produtos foram adquiridos no mercado farmacêutico local, estavam em perfeito estado de conservação e dentro do prazo de validade. Da amostra A foram adquiridos três lotes distintos que foram denominados de A1, A2 e A3.

Tabela 2. Cápsulas de gelatina dura contendo pó ou extrato seco de *M. ilicifolia*, com seus respectivos valor rotulado, matéria-prima e procedência

FITOTERÁPICO	VALOR ROTULADO (mg) DE <i>M. ilicifolia</i>	MATÉRIA-PRIMA	PROCEDÊNCIA
A1	380	Extrato seco	Industrializado
A2	380	Extrato seco	Industrializado
A3	380	Extrato seco	Industrializado
B	380	Extrato seco	Industrializado
C	420	Extrato seco	Industrializado
F	400	Extrato seco	Industrializado
I	300	Extrato seco	Manipulado
D	250	Pó	Industrializado
E	500	Pó	Industrializado
G	400	Pó	Manipulado
H	300	Pó	Manipulado

3.6. VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO DE QUANTIFICAÇÃO DE CATEQUINA E EPICATEQUINA POR CLAE

A validação do método analítico de quantificação de catequina e epicatequina por CLAE foi realizada de acordo com a Resolução RE N° 899/2003 da ANVISA. Os parâmetros avaliados foram seletividade, linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão, robustez e limites de detecção e quantificação (BRASIL, 2003a).

3.6.1. Seletividade

A seletividade do método foi verificada pela análise dos cromatogramas obtidos da solução de HCl 0,1M, da solução do excipiente do fitoterápico A (amido a 0,105 mg/mL) e da solução dos excipientes contidos no fitoterápico F (amido a 0,247 mg/mL, estearato de magnésio a 0,00125 mg/mL e dióxido de silício a 0,00175 mg/mL) com os cromatogramas de solução padrão dos marcadores catequina e epicatequina. As concentrações dos excipientes de cada cápsula foram baseadas em informações fornecidas na bula dos produtos e calculadas a partir do peso médio de 20 cápsulas. Os demais fitoterápicos não continham excipientes.

3.6.2. Linearidade

A linearidade foi avaliada para cada marcador, através da construção de três curvas padrão contendo sete níveis de concentração (0,5; 0,75; 1,25; 2,5; 5; 10 e 20 µg/mL). A área absoluta média obtida nas três curvas foi utilizada na construção de um gráfico, plotando a área média *versus* a concentração do marcador (µg/mL). Calculou-se a equação da reta por meio do estudo de regressão linear, pelo Método dos Mínimos Quadrados.

3.6.3. Precisão

A amostra utilizada foi obtida conforme a preparação descrita no item 3.3.1.

A precisão do método foi avaliada em dois níveis: repetibilidade e precisão intermediária. A repetibilidade foi verificada com seis determinações a 100% do teste e a precisão intermediária foi conduzida em dois dias diferentes por dois analistas distintos, observando-se a concordância entre os resultados obtidos. A precisão foi expressa como o desvio padrão relativo (coeficiente de variação) da série de medidas.

3.6.4. Exatidão

A amostra utilizada foi obtida conforme a preparação descrita no item 3.3.1.

A exatidão foi avaliada pelo método de adição de padrão, no qual se adiciona quantidades conhecidas do padrão de referência (0,3886 µg/mL de catequina e 1,5378 µg/mL de epicatequina) à amostra, em três níveis de concentração (80%, 100% e 120%). Pode ser expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente.

3.6.5. Robustez

A amostra utilizada foi obtida conforme a preparação descrita no item 3.3.1.

A robustez foi avaliada realizando-se pequenas variações nos parâmetros analíticos, como alterações nas condições cromatográficas (temperatura do forno: 34,5°C; 35°C e 35,5°C) e no preparo da amostra (tempo de extração: 8, 10 e 12 minutos).

3.6.6. Limites de detecção e de quantificação

Para calcular os limites de detecção e quantificação foram construídas três curvas de calibração contendo concentrações do marcador próximas ao suposto limite. O limite de quantificação é considerado como o menor nível determinável com precisão e exatidão aceitáveis. A partir dos dados obtidos da equação da reta das curvas de calibração é possível estabelecer os limites por meio das equações a seguir:

$$LD = \frac{DP \times 3}{IC} \quad (\text{Equação 2})$$

$$LQ = \frac{DP \times 10}{IC} \quad (\text{Equação 3})$$

Onde,

DP = Desvio padrão do intercepto
 IC = Inclinação da curva de calibração
 LD = Limite de detecção
 LQ = Limite de quantificação

3.7. PESO MÉDIO

A determinação de peso foi conduzida segundo os critérios estabelecidos pela Farmacopéia Brasileira IV (1988). Vinte cápsulas de cada formulação foram pesadas individualmente. A variação permitida é de $\pm 7,5\%$ para cápsulas com peso médio ou valor nominal declarado acima de 300 mg e de $\pm 10,0\%$ para cápsulas com peso médio ou valor nominal declarado abaixo de 300 mg. Se uma ou mais cápsulas diferirem dos limites indicados, pesam-se vinte unidades individualmente e, após remoção do conteúdo, realiza-se nova pesagem das cápsulas vazias. O peso do conteúdo da cápsula é determinado pela diferença de peso entre a cápsula cheia e a vazia. Podem ser toleradas, no máximo, duas unidades fora dos limites especificados em relação ao peso médio, porém nenhuma poderá estar acima ou abaixo do dobro das porcentagens indicadas. Se duas, porém não mais que seis cápsulas, estiverem em desacordo com a variação permitida, é determinado o peso do conteúdo de mais 40 unidades, tolerando-se no máximo 6 unidades em 60 cápsulas cuja a diferença exceda os limites especificados, entretanto, nenhuma cuja diferença ultrapasse o dobro dos mesmos.

3.8. UNIFORMIDADE DE DOSES UNITÁRIAS

O teste de uniformidade de doses unitárias foi realizado conforme a Farmacopéia Brasileira IV (1988) pelo método de variação de peso, visto que todas as amostras de cápsulas de espinheira-santa utilizadas continham 50 mg ou mais de matéria-prima vegetal, compreendendo 50% ou mais, em peso, da dose unitária da forma farmacêutica. Foram pesadas, individualmente, 10 cápsulas e, após remoção do conteúdo realizou-se nova pesagem. O peso do conteúdo da cápsula foi determinado pela diferença de peso entre a cápsula cheia e a vazia. A partir do resultado do doseamento foi calculado o teor de cada cápsula, considerando distribuição homogênea do mesmo.

3.9. TEOR DE CATEQUINA E EPICATEQUINA NO PRODUTO ACABADO

Pesou-se o equivalente a 100 mg de conteúdo das cápsulas (extrato seco ou pó) de *M. ilicifolia* (Equação 4). O preparo da amostra, realizado em triplicata, foi conduzido conforme descrito no item 3.3.1, seguindo-se de análise em CLAE-UV a 280 nm.

$$m = (PM \times 100) / VR \quad (\text{Equação 4})$$

Onde:

m= massa (mg)

PM = peso médio de 20 cápsulas (mg)

VR= valor rotulado de pó ou extrato seco de Espinheira-santa (mg)

3.10. DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS DO ENSAIO DE DISSOLUÇÃO

3.10.1. Método de preparo dos meios de dissolução

Os meios de dissolução foram preparados conforme descrito na Farmacopéia Americana (USP 30, 2007).

3.10.1.1. Solução de HCl 0,1 M pH 1,2

Foram transferidos 8,5 mL de ácido clorídrico P.A. para balão volumétrico de 1000 mL, completando o volume com água destilada. Após homogeneizar, o pH foi medido.

3.10.1.2. Solução tampão fosfato monopotássico 0,2 M pH 6,8

Foram pesados 27,22 g de fosfato de potássio monobásico o qual foi transferido para um balão volumétrico de 1000 mL, seguindo-se de adição de água destilada. Após, foi submetido à agitação em banho de ultrassom até completa dissolução, completando-se, em seguida, o volume com o mesmo solvente. Dessa solução foi transferida uma alíquota de 50 mL para um balão volumétrico de 200 mL, em que foram adicionados 22,4 mL de solução de NaOH 0,2 M. O volume foi completado com água destilada e o pH foi medido.

3.10.1.3. Solução de hidróxido de sódio 0,2 M

A fim de preparar a solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,2 M utilizada na preparação do tampão descrito no item 3.10.1.2, foram pesados 8 g de NaOH em balão volumétrico de 1000 mL. Após adição de água destilada, foi submetido à agitação em banho de ultrassom até completa dissolução, completando-se, em seguida, o volume com o mesmo solvente.

3.10.2. Avaliação da solubilidade dos marcadores catequina e epicatequina na faixa de pH fisiológico (1,2 a 6,8)

A solubilidade dos marcadores foi determinada em três diferentes meios: água (pH 4,9), HCl 0,1 M (pH 1,2) e tampão fosfato monopotássico (pH 6,8) a fim de estabelecer o meio a ser utilizado nos ensaios de dissolução. O teste foi realizado com o pó da amostra autêntica de *M. ilicifolia*, obtido como descrito no item 3.3 e com os padrões dos marcadores. Quantidades em excesso do pó (3,66 mg/mL) e dos padrões catequina (12,44 µg/mL) e epicatequina (46,48 µg/mL) foram adicionados a 25 mL de meio. Para assegurar “*sink condition*” foram utilizados cinco vezes o volume de meio necessário para obter uma solução saturada dos marcadores, baseando-se no teor de catequina e epicatequina para cada fitoterápico. As amostras foram submetidas à agitação orbital em mini-incubadora a 37°C. Alíquotas foram retiradas em 1, 2 e 24 horas e analisadas por CLAE-UV a 280 nm.

3.10.3. Teste de estabilidade

A estabilidade da substância em solução deve ser determinada nas etapas preliminares do desenvolvimento, sendo geralmente determinada a 37°C durante duas horas para formulações de liberação rápida (SKOUG et al., 1997).

O estudo de estabilidade da catequina e da epicatequina, nas condições do ensaio de dissolução, foi conduzido com o padrão dos marcadores e com o pó da amostra autêntica de *M. ilicifolia*, obtido como descrito no item 3.3. As soluções preparadas em HCl 0,1 M foram aquecidas a $40 \pm 0,5^\circ\text{C}$ por 120 minutos e posteriormente, permaneceram em temperatura ambiente por 6 horas. Após, alíquotas foram filtradas em Millex e analisadas por CLAE-UV a 280 nm.

3.10.4. Estudo de estabilidade térmica

As propriedades físicas da catequina e da epicatequina e/ou de seus produtos de reação em função da temperatura foram avaliadas através de termogravimetria (TG) e análise térmica diferencial (DTA) no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica - FARMATEC, da Universidade Federal de Goiás (Goiânia, Goiás). A curva termogravimétrica foi obtida em célula calorimétrica, nas seguintes condições: razão de aquecimento: $10^\circ\text{C}/\text{min}$; peso da amostra: 7 mg para epicatequina e 3,3 mg para catequina; faixa de temperatura: 25-650 °C; atmosfera dinâmica de nitrogênio; fluxo: 50 mL/min; material da célula: platina e software de controle e avaliação TA-60WS.

3.10.5. Ensaio de dissolução

Foram testadas quatro condições preliminares para o ensaio de dissolução das cápsulas de espinheira-santa. Em todas as condições os ensaios foram desenvolvidos utilizando o aparato pá, HCl 0,1 M como meio de dissolução e temperatura do meio a $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5$. O meio de dissolução foi desaerado por filtração a vácuo. Após 60 minutos de teste, a velocidade de agitação foi modificada para 100 rpm por mais 15 minutos. Alíquotas de 3 mL foram coletadas nos tempos 5, 10, 15, 30, 60 e 75 minutos. Filtros de 10 μm foram acoplados ao amostrador automático para filtrar as amostras durante a coleta. Afundadores (*sinkers*) foram utilizados para auxiliar na centralização das cápsulas sob a pá.

Foram avaliadas as influências da velocidade de agitação e do volume do meio de dissolução, conforme as condições expressas na Tabela 3.

Tabela 3. Especificações dos parâmetros avaliados em quatro condições preliminares para o ensaio de dissolução de cápsulas contendo pó ou extrato seco de *M. ilicifolia*

PARÂMETROS	1	2	3	4
Volume do meio de dissolução (mL)	500	500	900	900
Velocidade de agitação (rpm)	50	75	50	75

3.11. VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE DISSOLUÇÃO

O método de dissolução foi validado baseado nos critérios estabelecidos na USP 30- <1092> *The dissolution procedure: Development and Validation*. Foram avaliados os parâmetros de seletividade, linearidade, precisão e exatidão (USP, 2007a).

3.11.1. Seletividade

O teste de seletividade foi realizado adicionando-se a 900 mL de HCl 0,1 M, aquecido a $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5$, cápsulas vazias de cada um dos fitoterápicos, previamente lavadas, inseridas em um afundador. Após 60 minutos sob agitação a 100 rpm, alíquotas de 3 mL foram coletadas e analisadas por CLAE-UV a 280 nm.

3.11.2. Linearidade

A linearidade foi avaliada para cada marcador, por meio da construção de três curvas padrão contendo seis níveis de concentração (0,2; 0,4; 0,8; 1,25; 2 e 4 $\mu\text{g/mL}$).

3.11.3. Precisão e Exatidão

A exatidão foi avaliada pelo método de recuperação por adição de padrão, no qual quantidade conhecida de solução padrão (0,44 µg/mL de catequina e 0,43 µg/mL de epicatequina) foi adicionada a seis cubas contendo, cada uma, 900 mL de meio de dissolução pré-aquecido a $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5$ e uma cápsula da amostra A, inserida em um afundador. Após agitação por 30 minutos a 75 rpm, alíquotas de 3 mL foram coletadas e analisadas por CLAE.

As mesmas soluções empregadas no teste de exatidão foram utilizadas para avaliar a precisão (repetibilidade) do método. A repetibilidade, verificada pela análise individual das seis amostras coletadas do dissolutor após 30 minutos de teste, foi expressa como o desvio padrão relativo da série de medidas.

3.12. PERFIL DE DISSOLUÇÃO DE CÁPSULAS CONTENDO PÓ OU EXTRATO SECO DE *M. ilicifolia*

O teste de dissolução foi conduzido a partir da quantificação dos marcadores catequina e epicatequina. Para os fitoterápicos contendo extrato seco foram coletadas amostras de 3 mL nos tempo 7, 12, 20, 30, 45 e 60 minutos e, para as cápsulas contendo pó de espinheira-santa, as coletas foram realizadas em 4, 7, 12, 20, 30, 45 e 60 minutos. A concentração dos marcadores foi determinada por CLAE-UV em comprimento de onda de 280 nm. Após foram construídas curvas de porcentagem dissolvida (%) *versus* tempo (min) (perfil de dissolução), que foram utilizadas nos cálculos de cinética e eficiência de dissolução.

3.13. ANÁLISE COMPARATIVA DO PERFIL DE DISSOLUÇÃO DE CÁPSULAS CONTENDO PÓ OU EXTRATO SECO DE *M. ilicifolia*

3.13.1. Métodos modelo dependentes

Os perfis de dissolução foram analisados por métodos modelo dependentes aplicando-se os modelos matemáticos expressos na Tabela 4 para a determinação da cinética de dissolução (KOESTER et al., 2004; MAHLE et al., 2007). Considerou-se a quantidade liberada entre 0 e 45 minutos e o processo de linearização do perfil foi executado no programa Curve Expert 1.4.

Tabela 4. Modelos matemáticos empregados na análise comparativa do perfil de dissolução de cápsulas contendo *M. ilicifolia*, com suas respectivas equações

MODELO	EQUAÇÃO
Ordem zero	$Q_t = Q_0 - k_0t$
Primeira ordem	$\ln Q_t = \ln Q_0 - k_1t$
Higuchi	$Q_t = k_H \sqrt{t}$

Q_t =quantidade de fármaco liberada no tempo t ; Q_0 = quantidade inicial de fármaco na forma farmacêutica; k_0 , k_1 , k_H = constante de velocidade de dissolução; \ln = logaritmo neperiano

Após a seleção do modelo, para cada produto, foram calculados alguns parâmetros relativos à cinética de dissolução, como o tempo no qual se dissolve 85% do ativo ($t_{85\%}$) e a quantidade dissolvida após 45 minutos do início do ensaio de dissolução (Q_{45}). Esses parâmetros foram definidos matematicamente conforme a equação da reta de regressão que melhor definiu o perfil de dissolução de cada produto (SERRA, STORPIRTIS, 2007).

3.13.2. Eficiência de dissolução

Os cálculos de eficiência de dissolução foram realizados pelo método dos trapézoides, como descrito por Khan (1975), a partir das curvas de porcentagem dissolvida *versus* tempo (perfil de dissolução). A porcentagem de eficiência de dissolução (% ED) foi determinada obtendo-se a área sob a curva (ASC) entre 0 e 60 minutos e a área total do retângulo (ASC_{TR}), descrita pela ordenada (quantidade máxima dissolvida em 60 minutos) e pela abscissa (tempo igual a 60 minutos). A ED foi expressa em porcentagem da área do retângulo, sendo calculada conforme a equação 5 (KHAN, 1975; SERRA, STORPIRTIS, 2007; MAHLE et al., 2007). A comparação entre os valores obtidos foi realizada utilizando o teste de Tukey.

$$\%ED = \frac{ASC_{(0-60min)}}{ASC_{TR}} \times 100 \quad (\text{equação 5})$$

3.14. TAMANHO DE PARTÍCULA DO CONTEÚDO DAS CÁPSULAS DE *M. ilicifolia*

Foi verificado o tamanho de partícula do conteúdo das cápsulas de Espinheira-santa por microscopia óptica. Para a amostra D utilizou-se um aumento de 10x e para as demais amostras de 40x.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As substâncias catequina e epicatequina foram utilizadas como marcadores neste estudo, visto que o método de doseamento descrito na Farmacopéia Brasileira IV para espinheira-santa consiste na análise de taninos totais (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2002). Ademais, há na literatura métodos cromatográficos para quantificação de catequina e epicatequina em extratos de *M. ilicifolia* (SOUZA et al., 2008; LOPES et al., 2010) e estudos demonstrando que a atividade farmacológica desta espécie está relacionada com a presença desses taninos (BAGGIO et al., 2007; BAGGIO et al., 2009; PESSUTO et al., 2009).

4.1. MATERIAL VEGETAL

O teor de umidade do pó da amostra autêntica, obtido após secagem das folhas de *M. ilicifolia* em estufa a 40°C por 72 horas, foi determinado em 7,97% utilizando balança de infravermelho.

4.1.1. Extração do material vegetal

Uma amostra autêntica de *M. ilicifolia* foi utilizada nas etapas de desenvolvimento e validação do método analítico para quantificação de catequina e epicatequina por CLAE.

A qualidade do extrato pode variar quanto à natureza e quantidade dos constituintes de acordo com o solvente e o método de extração empregado (SRINIVASAN, 2005). A proporção droga:solvente utilizada e a escolha de HCl 0,1 M como solvente da extração foram selecionados visando simular as condições do teste de dissolução. A extração com o uso de ultrassom tem se apresentado como uma técnica promissora por promover a extração exaustiva de princípios ativos de drogas vegetais, com gasto de energia relativamente pequeno e economia de tempo (SILVA, ARAGÃO, 2009).

4.2. DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DOS MARCADORES CATEQUINA E EPICATEQUINA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

4.2.1. Espectrofotometria UV/Vis

Por intermédio da análise em espectro de absorção no UV/VIS (varredura) foi possível verificar duas bandas de absorção máxima para catequina em 229,4 e 279,9 nm (Figura 5) e para a epicatequina em 226,8 e 278,5 nm (Figura 6).

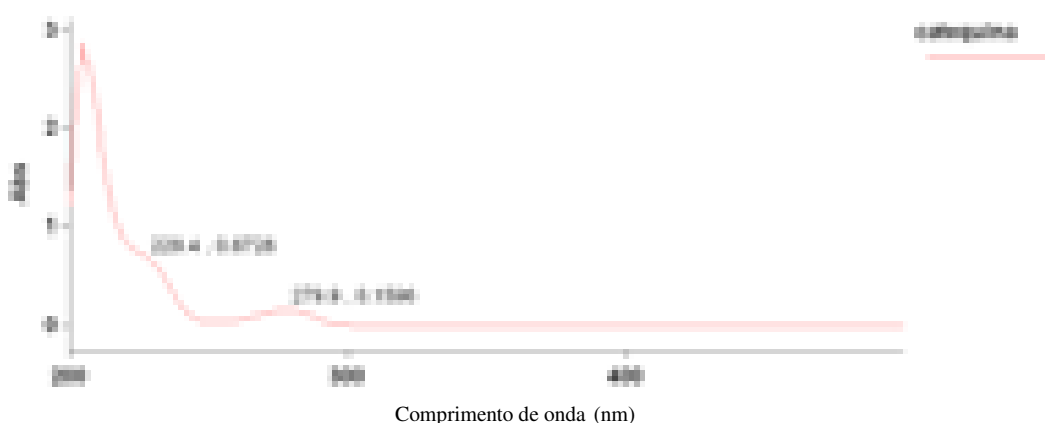


Figura 5. Espectro de absorção no UV da Catequina.

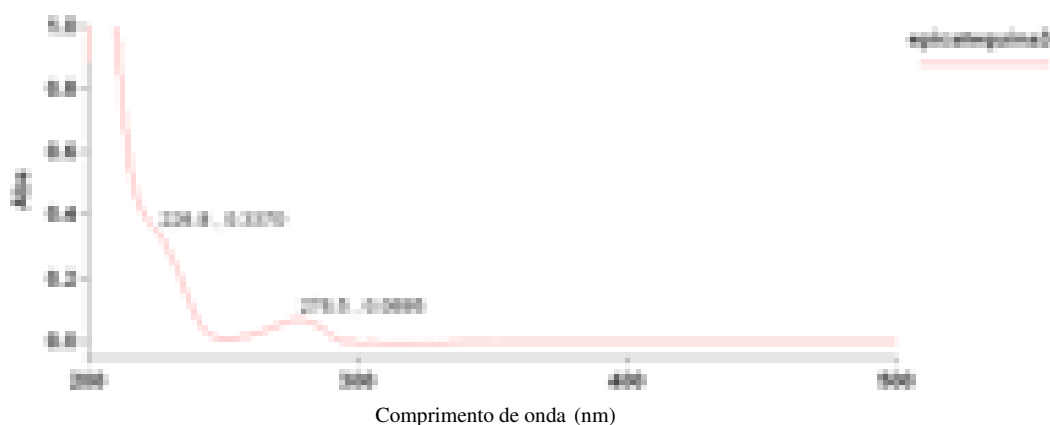


Figura 6. Espectro de absorção no UV da Epicatequina.

Espectro de absorção com dois máximos de absorção também é observado para flavonóides (240-285 nm referente à absorção do anel A e 304-350 nm devida à absorção do anel B) que possuem estrutura química semelhante a das catequinas, distinguindo-se destas pela presença de grupo carbonilo no anel C (ZUANAZZI, MONTANHA, 2007; CAMPOS, 2009).

Os valores de comprimento de onda obtidos neste trabalho coincidem com outros da literatura (FERNÁNDEZ et al., 2000; SOUZA et al., 2008) que analisaram catequinas por cromatografia líquida nos comprimentos de onda de 275 - 280 nm. Assim, o comprimento de onda de 280 nm foi selecionado para detecção de catequina e epicatequina nas análises por CLAE.

4.2.2. Desenvolvimento das condições cromatográficas

A separação cromatográfica foi conduzida com coluna analítica C-18 baseado em métodos descritos na literatura (SOUZA et al., 2008; LOPES et al., 2010). Utilizou-se como condição cromatográfica preliminar o método citado na literatura por Souza et. al. (2008) para análise do extrato das folhas de *M. ilicifolia* por cromatografia líquida. Os parâmetros avaliados foram: tempo de retenção, fator de assimetria (FA entre 0,95 e 1,15) e número de pratos teóricos ($N > 2000$) (FDA, 1994; WATSON, 1999). Em virtude do elevado tempo de retenção (t_r) (10,91 min para catequina e 18,87 min para epicatequina), foram realizadas modificações na condição inicial. O método 4 foi o selecionado por apresentar menor tempo de retenção dos marcadores catequina e epicatequina, mantendo os valores recomendados para o número de pratos teóricos. Nas quatro condições os valores de FA do pico foram semelhantes (Tabela 5). O cromatograma obtido após análise do pó de *M. ilicifolia* pelo método 4 pode ser visualizado na Figura 7.

Tabela 5. Métodos cromatográficos, empregados com seus respectivos valores de tempo de retenção (t_r), Fator de Assimetria e Número de pratos teóricos (N)

Métodos	Condições Cromatográficas	Marcador	t_r (min)	FA	Nº de Pratos Teóricos
1	H ₂ O + ác. Acético 1%: ACN (90:10); 0,8 ml/min	Catequina	10,91	1,28	11588,56
		Epicatequina	18,87	1,31	11643,43
2	H ₂ O + ác. Acético 1%: ACN (90:10); 1,0 ml/min; 30 °C	Catequina	7,41	1,22	14232,95
		Epicatequina	11,86	1,18	14942,22
3	H ₂ O + ác. Acético 1%: ACN (90:10); 1,0 ml/min; 35 °C	Catequina	6,89	1,33	13063,05
		Epicatequina	10,73	1,20	15673,84
4	H ₂ O + ác. Acético 1%: ACN: MeOH (85:10:5); 1,0 mL/min; 35 °C	Catequina	5,66	1,30	8539,46
		Epicatequina	8,25	1,20	11122,18

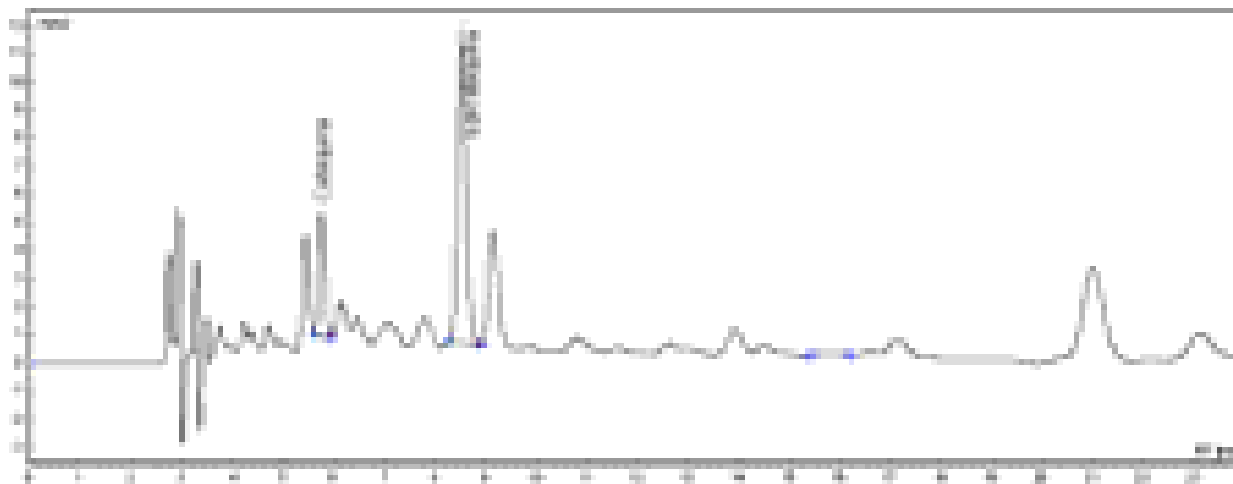


Figura 7. Cromatograma da amostra autêntica de *M. ilicifolia* em HCl 0,1 M. Observa-se os marcadores catequina ($t_r=5,66$ min) e epicatequina ($t_r=8,25$ min). Condições cromatográficas: fase móvel composta por água:acetonitrila:metanol:ácido acético (84:10:5:1), em eluição isocrática, fluxo de 1 mL/min, coluna Varian C18 250 x 4,6 mm, 5 μ m e detector a 280 nm

4.3. VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO DE QUANTIFICAÇÃO DE CATEQUINA E EPICATEQUINA POR CLAE

Há na literatura vários trabalhos que abordam o desenvolvimento e a validação de métodos analíticos para avaliar fitoterápicos e matérias-primas vegetais (OLIVEIRA et al., 2006; HALSTEAD et al., 2007; XIE et al., 2007; KRATZ et al., 2008; SOUZA et al., 2008; COSTA et al., 2010; LOPES et al., 2010; SOUSA et al., 2010).

A validação de método analítico para fitoterápicos difere dos fármacos sintéticos devido à complexidade da matéria-prima vegetal. A CLAE é uma ferramenta bastante útil na análise de produtos vegetais, pois possibilita a separação de misturas complexas e de interferentes, assegurando seletividade ao método e o monitoramento de marcadores por meio de doseamento (SKOUG et al., 1997; FISHER, 2005; FARIAS, 2007).

4.3.1. Seletividade

O método de separação, identificação e quantificação da catequina e da epicatequina por CLAE foi capaz de separar os dois marcadores. Verifica-se ausência de interferentes nos tempos de retenção dos taninos nas análises do solvente utilizado nas diluições (HCl 0,1M; Figura 8) e dos excipientes contidos nos fitoterápicos A (Figura 9) e F (Figura 10), garantindo, assim, a seletividade do método proposto.

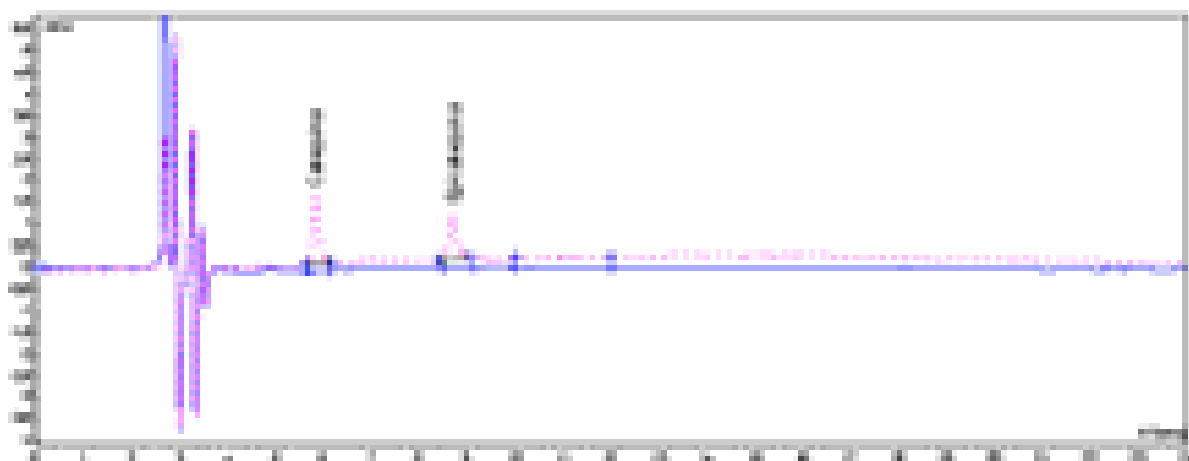


Figura 8. Cromatograma da solução padrão de catequina e epicatequina em HCl 0,1 M (...) e cromatograma de solução de HCl 0,1 M (—). Condições cromatográficas: fase móvel composta por água:acetonitrila:metanol:ácido acético (84:10:5:1), em eluição isocrática, fluxo de 1 mL/min, coluna Varian® C18 250 x 4,6 mm, 5 µm e detector a 280 nm.

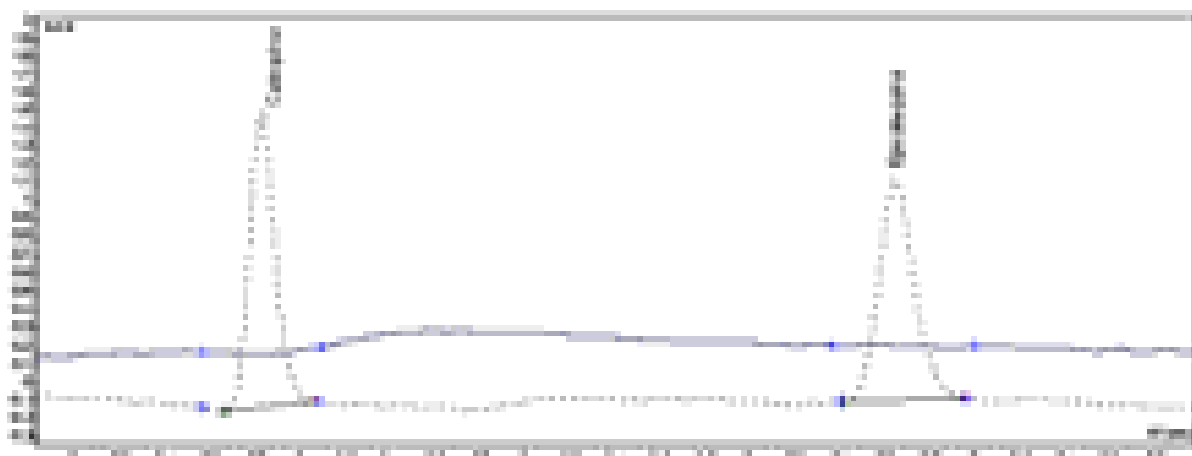


Figura 9. Cromatograma da solução padrão de catequina e epicatequina em HCl 0,1 M (...) e cromatograma de solução de amido a 0,105mg/mL em HCl 0,1 M (—). Condições cromatográficas: fase móvel composta por água:acetonitrila:metanol:ácido acético (84:10:5:1), em eluição isocrática, fluxo de 1 mL/min, coluna Varian® C18 250 x 4,6 mm, 5 µm e detector a 280 nm.

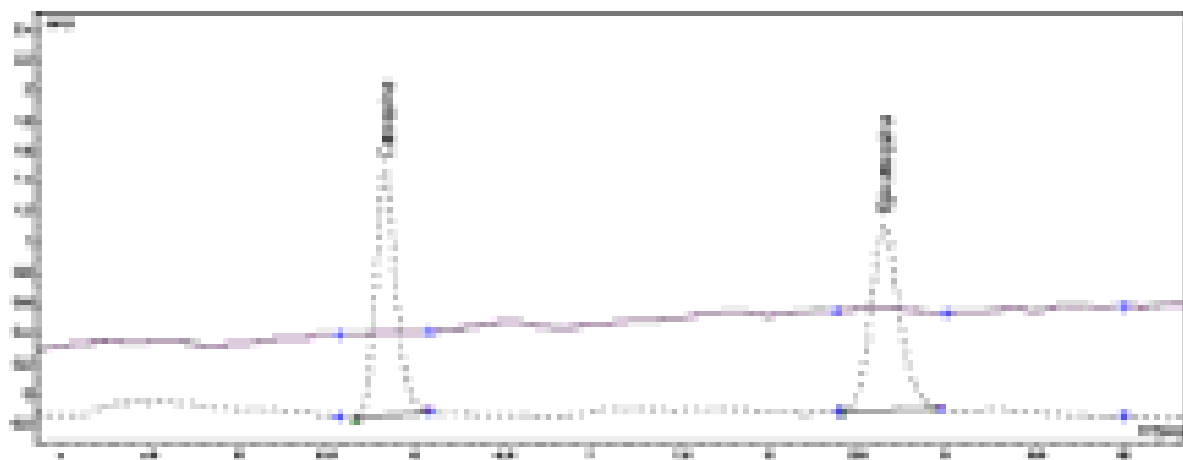


Figura 10. Cromatograma da solução padrão de catequina e epicatequina em HCl 0,1 M (...) e cromatograma de solução de amido a 0,247 mg/mL, estearato de magnésio a 0,00125 mg/mL e dióxido de silício a 0,00175 mg/mL em HCl 0,1 M (—). Condições cromatográficas: fase móvel composta por água:acetonitrila:metanol:ácido acético (84:10:5:1), em eluição isocrática, fluxo de 1 mL/min, coluna Varian® C18 250 x 4,6 mm, 5 µm e detector a 280 nm.

4.3.2. Linearidade

Os resultados obtidos demonstram coeficientes de correlação linear adequados de 1 para catequina e 0,9999 para a epicatequina (Figuras 11 e 12), dentro dos limites especificados pela ANVISA ($r \geq 0,99$), para a validação de métodos cromatográficos (BRASIL, 2003a).

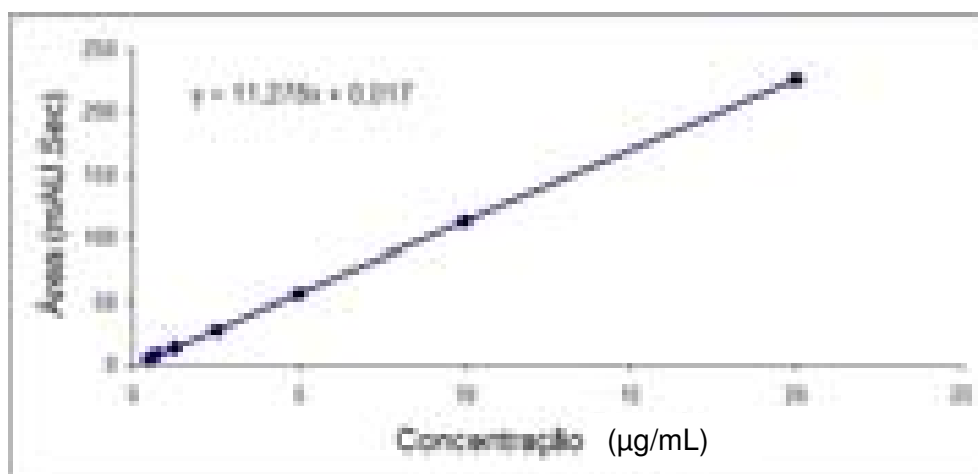


Figura 11. Curva de calibração da Catequina obtida por CLAE-UV utilizando concentrações de 0,5 a 20 µg/mL

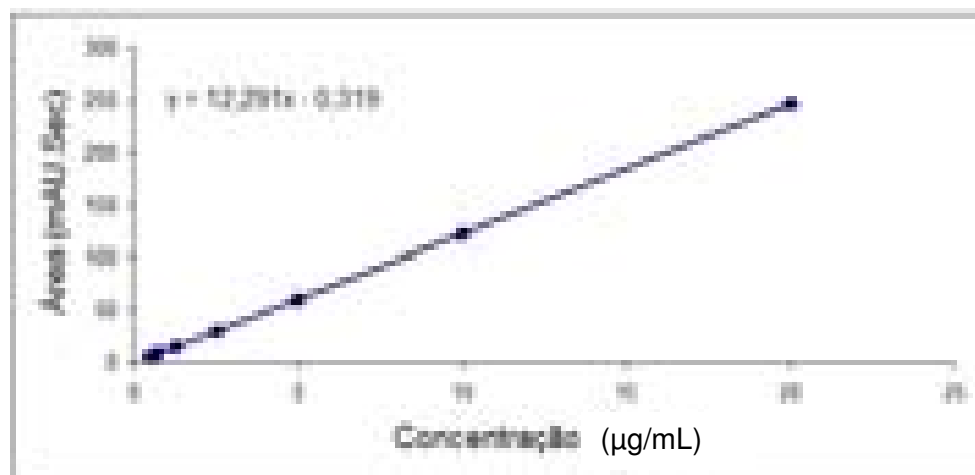


Figura 12. Curva de calibração da Epicatequina obtida por CLAE-UV utilizando concentrações de 0,75 a 20 µg/mL

4.3.3. Precisão

Os resultados da repetibilidade e da precisão intermediária podem ser visualizados nas tabelas 6 a 9. O método apresentou-se preciso para os dois marcadores, com desvio padrão relativo (DPR) inferior a 5% conforme preconizado pela ANVISA (BRASIL, 2003a).

Tabela 6. Resultados da repetibilidade do método analítico por CLAE-UV para quantificação de catequina, em cápsulas contendo *M. ilicifolia*.

Amostra	Área (mAU.Sec)	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	% Catequina
1	17,8	1,5768	0,3154
2	17,6	1,5591	0,3118
3	17,5	1,5502	0,3100
4	17	1,5059	0,3012
5	17,7	1,5679	0,3136
6	17,4	1,5413	0,3083
	Média	1,5502	0,3100
	DP	0,0251	0,0050
	DPR	1,62	1,62

DP = Desvio padrão

Tabela 7. Resultados da repetibilidade do método analítico por CLAE-UV para quantificação de epicatequina, em cápsulas contendo *M. ilicifolia*

Amostra	Área (mAU.Sec)	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	% Epicatequina
1	71,4	5,8467	1,1693
2	71,8	5,8792	1,1758
3	71,2	5,8304	1,1661
4	72	5,8954	1,1791
5	71,9	5,8873	1,1775
6	68,6	5,6192	1,1238
	Média	5,8264	1,1653
	DP	0,1045	0,0209
	DPR	1,79	1,79

Tabela 8. Precisão intermediária do método por CLAE-UV para quantificação de catequina em cápsulas contendo *M. ilicifolia*

Analista	Amostra	Área (mAU.Sec)	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	% Catequina
I	1	17,8	1,5768	0,3154
	2	17,6	1,5591	0,3118
	3	17,5	1,5502	0,3100
	4	17	1,5059	0,3012
	5	17,7	1,5679	0,3136
	6	17,4	1,5413	0,3083
II	1	18,8	1,6655	0,3331
	2	18,7	1,6566	0,3313
	3	19	1,6832	0,3366
	4	18,7	1,6566	0,3313
	5	18,4	1,6300	0,3260
	6	18,6	1,6477	0,3295
	Média		1,6034	0,3207
	DP		0,0593	0,0119
	DPR		3,698	3,698

Tabela 9. Precisão intermediária do método por CLAE-UV para quantificação de epicatequina em cápsulas contendo *M. ilicifolia*

Analista	Amostra	Área (mAU.Sec)	Concentração (µg/mL)	% Epicatequina
I	1	71,4	5,8467	1,1693
	2	71,8	5,8792	1,1758
	3	71,2	5,8304	1,1661
	4	72	5,8954	1,1791
	5	71,9	5,8873	1,1775
	6	68,6	5,6192	1,1238
II	1	66,7	5,4648	1,0930
	2	65,6	5,3755	1,0751
	3	67,3	5,5136	1,1027
	4	67,6	5,5380	1,1076
	5	66,9	5,4811	1,0962
	6	65,8	5,3917	1,0783
		Média	5,6436	1,1287
		DP	0,2082	0,0416
		DPR	3,69	3,69

4.3.4. Exatidão

A exatidão do método foi avaliada em três níveis de concentração (80, 100 e 120%) em ensaios de recuperação por adição de padrão. Quantidades conhecidas de padrão (0,3886 µg/mL de catequina e 1,5378 µg/mL de epicatequina, equivalentes a cerca de 20% do teor da amostra autêntica), determinadas pela média de três amostras de solução padrão de catequina e epicatequina, foram adicionadas aos diferentes níveis de amostras de *M. ilicifolia* e por diferença foi obtida a concentração de marcador presente na matriz. A faixa de valores encontrados situa-se entre 95,79 e 103,41% (Tabelas 10 e 11).

Tabela 10. Resultados da exatidão 80%, 100% e 120% do método por CLAE-UV para quantificação de catequina em cápsulas contendo *M. ilicifolia*

% da Amostra	Amostra	Área (mAU.Sec)	Concentração (µg/mL)	Recuperação (%) de Catequina
80%	1	14,7	1,30	104,19
	2	13,5	1,20	95,67
	3	14,2	1,26	100,64
		Média	1,21	100,17
		DP	0,04	4,28
		DPR	3,19	4,27
100%	1	18	1,59	102,08
	2	18,2	1,61	103,22
	3	18	1,59	102,08
		Média	1,62	102,46
		DP	0,04	0,66
		DPR	2,22	0,64
120%	1	21,3	1,89	100,68
	2	21	1,86	99,26
	3	21,2	1,88	100,21
		Média	1,88	100,05
		DP	0,01	0,72
		DPR	0,72	0,72

Tabela 11. Resultados da exatidão 80%, 100% e 120% do método por CLAE-UV para quantificação de epicatequina em cápsulas contendo *M. ilicifolia*

% da Amostra	Amostra	Área (mAU.Sec)	Concentração (µg/mL)	Recuperação (%) de Epicatequina
80%	1	55,200	4,53	96,77
	2	54,933	4,51	96,31
	3	56,133	4,61	98,39
		Média	4,50	97,16
		DP	0,12	1,09
		DPR	2,63	1,13
100%	1	70,633	5,78	98,84
	2	72,633	5,95	101,62
	3	69,733	5,71	97,60
		Média	5,81	99,35
		DP	0,12	2,06
		DPR	2,07	2,07
120%	1	83,833	6,86	97,64
	2	85,100	6,96	99,11
	3	82,533	6,75	96,14
		Média	6,73	97,63
		DP	0,14	1,48
		DPR	2,14	1,52

4.3.5. Robustez

Para avaliar a robustez do método analítico foram realizadas alterações nas condições cromatográficas (temperatura do forno) e no preparo da amostra (tempo de extração).

O método foi robusto para as variações de temperatura do forno e tempo de extração para ambos os marcadores, visto que os valores de DPR obtidos foram inferiores a 5% (Tabelas 12, 13, 14 e 15).

Tabela 12. Robustez do método por CLAE-UV para quantificação de catequina em cápsulas contendo *M. ilicifolia*, variando a temperatura da coluna cromatográfica

Temperatura (°C)	Amostra	Área (mAU.Sec)	Concentração (µg/mL)	% Catequina
34,5	1	17	1,5059	0,3012
	2	16,5	1,4615	0,2923
	3	17,3	1,5325	0,3065
35	1	17,8	1,5768	0,3154
	2	17,6	1,5591	0,3118
	3	17,4	1,5413	0,3083
35,5	1	18,6	1,6477	0,3295
	2	17,7	1,5679	0,3136
	3	18,1	1,6034	0,3207
		Média	1,5551	0,3110
		DP	0,0541	0,0108
		DPR	3,48	3,48

Tabela 13. Robustez do método por CLAE-UV para quantificação de epicatequina em cápsulas contendo *M. ilicifolia*, variando a temperatura da coluna cromatográfica

Temperatura (°C)	Amostra	Área (mAU.Sec)	Concentração (µg/mL)	% Epicatequina
34,5	1	69,9	5,7248	1,1450
	2	69	5,6517	1,1303
	3	71,1	5,8223	1,1645
35	1	69,1	5,6598	1,1320
	2	69,8	5,7167	1,1433
	3	69,4	5,6842	1,1368
35,5	1	70,2	5,7492	1,1498
	2	69,1	5,6598	1,1320
	3	70,1	5,7411	1,1482
		Média	5,7122	1,1424
		DP	0,0553	0,0111
		DPR	0,97	0,97

Tabela 14. Robustez do método por CLAE-UV para quantificação de catequina em cápsulas contendo *M. ilicifolia*, variando tempo de extração da amostra

Tempo de extração (min)	Amostra	Área (mAU.Sec)	Concentração (µg/mL)	% Catequina
8	1	17,8	1,5768	0,3154
	2	17,2	1,5236	0,3047
	3	17,4	1,5413	0,3083
10	1	17,8	1,5768	0,3154
	2	17,6	1,5591	0,3118
	3	17,4	1,5413	0,3083
12	1	18,3	1,6211	0,3242
	2	17,7	1,5679	0,3136
	3	17,6	1,5591	0,3118
Média			1,5630	0,3126
DP			0,0281	0,0056
DPR			1,80	1,80

Tabela 15. Robustez do método por CLAE-UV para quantificação de epicatequina em cápsulas contendo *M. ilicifolia*, variando tempo de extração da amostra

Tempo de extração (min)	Amostra	Área (mAU.Sec)	Concentração (µg/mL)	% Epicatequina
8	1	72,6	5,9442	1,1888
	2	70,3	5,7573	1,1515
	3	70,1	5,7411	1,1482
10	1	69,1	5,6598	1,1320
	2	69,8	5,7167	1,1433
	3	69,4	5,6842	1,1368
12	1	70,3	5,7573	1,1515
	2	70,8	5,7979	1,1596
	3	68	5,5705	1,1141
Média			5,7366	1,1473
DP			0,1027	0,0205
DPR			1,79	1,79

4.3.6. Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção dos marcadores catequina e epicatequina foram estabelecidos, respectivamente, em 0,03 µg/mL e 0,05 µg/mL, baseados nos parâmetros das curvas analíticas ($r = 0,9988$ para catequina e $r = 0,9993$ para epicatequina; Figuras 13 e 14). O limite de quantificação calculado para a catequina foi de 0,1 µg/mL, apresentando coeficiente de variação de 4,56% e exatidão de 99,88%. Para a epicatequina o limite de quantificação foi de 0,2 µg/mL, com coeficiente de variação de 3,56% e exatidão de 97,21%.

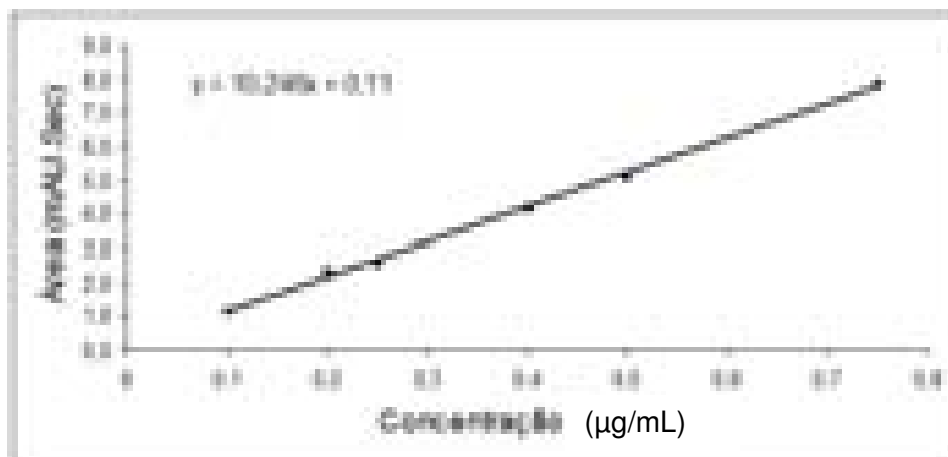


Figura 13. Curva de calibração da Catequina obtida por CLAE-UV utilizando concentrações de 0,1 a 0,75 µg/mL

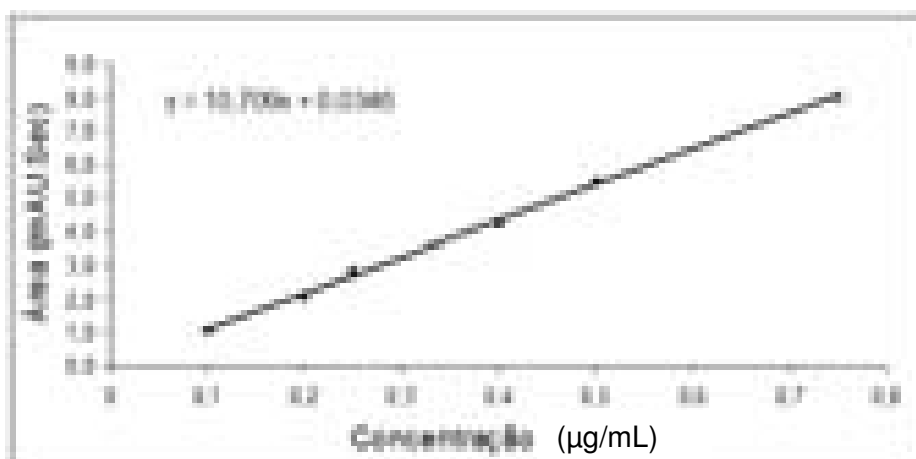


Figura 14. Curva de calibração da Epicatequina obtida por CLAE-UV utilizando concentrações de 0,1 a 0,75 µg/mL

4.4. PESO MÉDIO

Os resultados da determinação do peso médio dos fitoterápicos de *M. ilicifolia* encontram-se na Tabela 16. Os fitoterápicos C e D foram considerados em desacordo, apresentando, respectivamente, cinco e dez unidades que diferiram das especificações descritas no item 3.7.

Tabela 16. Peso médio, desvio padrão e desvio padrão relativo das cápsulas A1, A2, A3, B, C, D, E, F, G, H e I, contendo pó ou extrato seco de *M. ilicifolia*.

FITOTERÁPICO	PESO MÉDIO	DP	DPR (%)
A1*	0,4313	0,0069	1,61
A2*	0,4536	0,0164	3,62
A3*	0,5326	0,0103	2,30
B*	0,3977	0,0117	1,93
C*	0,4335	0,0267	6,15
F*	0,4846	0,0063	1,31
I*	0,3047	0,0029	0,96
D**	0,1504	0,0215	14,26
E**	0,3239	0,0051	1,56
G**	0,4069	0,0148	3,63
H**	0,2978	0,0081	2,71

* Fitoterápicos contendo extrato seco de *M. ilicifolia*

**Fitoterápicos contendo pó de *M. ilicifolia*

4.5. UNIFORMIDADE DE DOSES UNITÁRIAS

Os resultados obtidos no teste de variação de peso de cápsulas contendo *M. ilicifolia* estão representados na Tabela 17. O fitoterápico D foi considerado reprovado no teste de variação de peso, apresentando uma unidade fora da faixa de 75% a 125%, 5 unidades fora da faixa 85% a 115% e um elevado DPR (16,65%), não sendo necessário passar para a segunda etapa do teste.

MARTINS, BRANDÃO (2006) também evidenciaram não conformidade de fitoterápicos (cápsulas e comprimidos) à base de castanha-da-Índia no teste de variação de peso. Foi observado que 66,7% das preparações analisadas estavam em desacordo com as especificações da Farmacopéia Brasileira IV (1988).

Tabela 17. Variação de peso de 10 unidades de cápsulas contendo pó ou extrato seco de *M. ilicifolia* com seus respectivos valores de média, desvio padrão e desvio padrão relativo

Amostra	A1 (%)	A2 (%)	A3 (%)	B (%)	C (%)	F (%)	I (%)	D (%)	E (%)	G (%)	H (%)
1	99,28	103,73	99,00	102,36	97,72	98,64	101,24	74,93	98,61	100,86	100,77
2	99,53	100,46	97,68	101,89	97,86	100,52	98,71	109,71	99,88	101,84	102,25
3	98,86	99,14	98,38	96,33	101,78	102,31	100,06	80,32	101,98	98,23	98,96
4	101,60	99,36	100,57	102,29	103,81	99,34	100,74	112,63	99,85	101,16	94,26
5	100,34	101,96	99,78	103,37	95,81	99,05	100,88	121,88	100,56	101,16	97,88
6	98,30	101,41	99,62	100,23	109,62	103,12	99,63	96,41	102,90	96,02	97,21
7	99,46	105,07	99,58	92,18	104,48	99,94	98,41	81,85	99,85	103,74	103,76
8	102,01	93,92	99,28	100,85	99,13	99,32	99,83	106,91	99,38	102,56	98,35
9	99,42	101,46	100,03	99,92	104,04	100,04	101,37	98,60	97,90	103,96	95,00
10	101,94	104,59	107,01	98,99	101,97	99,83	99,27	119,15	99,81	93,63	97,65
Média	100,07	101,11	100,09	99,84	101,62	100,21	100,01	100,24	100,07	100,31	98,61
DP	1,33	3,24	2,57	3,36	4,12	1,44	1,03	16,69	1,47	3,36	2,98
DPR	1,33	3,21	2,57	3,37	4,05	1,43	1,03	16,65	1,47	3,35	3,02

4.6. TEOR DE CATEQUINA E EPICATEQUINA NO PRODUTO ACABADO

Conforme os resultados expressos na Tabela 18, é possível verificar entre distintos lotes de um mesmo fabricante (fitoterápico A) variações de 0,124% a 0,144% (DPR \pm 11,85) e de 0,154% a 0,201% (DPR \pm 17,12) no doseamento, respectivamente, dos marcadores catequina e epicatequina. Com exceção do fitoterápico E, os produtos contendo pó de *M. ilicifolia* (D, G e H) apresentaram porcentagens de catequina até 2,5 vezes superiores às das formulações contendo extrato seco. Todavia, uma maior porcentagem do marcador epicatequina foi observada para as cápsulas contendo extrato seco, atingindo valores cerca de 10 vezes mais elevados do que os encontrados nos pós.

Os fitoterápicos A, B, C, E, F e I apresentaram perfis cromatográficos semelhantes (Figuras 1, 2, 3, 4, 5 e 6 do Apêndice). Dentro dos limites de detecção do método analítico, não foi possível verificar a presença do marcador epicatequina no pó do fitoterápico D (Figura 15). Para os produtos E, G e H as concentrações de epicatequina foram inferiores ao limite de quantificação do método analítico. No procedimento de extração do conteúdo das cápsulas G e H foi perceptível um odor semelhante a mel que era ausente nas demais matérias-primas e, no perfil cromatográfico, foi evidenciada a presença de uma substância majoritária ($t_r=4,25$ min) que nas demais amostras era inexpressiva (Figura 16).

A quinta edição da Farmacopéia Brasileira descreve que as folhas secas da espécie *M. ilicifolia* devem conter no mínimo 2,0% de taninos totais, dos quais no mínimo 2,8 mg/g equivalem a epicatequina (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010). Conforme os dados apresentados na Tabela 18, apenas a amostra autêntica e o fitoterápico I estão em conformidade com as especificações descritas. Todavia, este resultado não expressa, necessariamente um desvio de qualidade dos fitoterápicos visto que, deve-se considerar que as condições cromatográficas para quantificação de epicatequina utilizadas neste estudo diferem das condições da Farmacopéia.

A análise do teor das substâncias ativas em fitoterápicos é uma etapa essencial para a segurança e a eficácia de sua utilização na elaboração de produtos farmacêuticos (BARA et al., 2004). Todavia, as matérias-primas vegetais empregadas na produção de fitoterápicos podem apresentar variações qualitativas e quantitativas na sua composição química, dependendo das condições climáticas e agrônômicas de cultivo (KRATZ et al., 2008). Diante da importância da ação sinérgica das substâncias químicas presentes no material botânico na obtenção do efeito terapêutico (BAST et

al., 2002; XIE et al., 2007) é possível inferir que a variabilidade no teor dos constituintes pode acarretar em prejuízo da atividade farmacológica. Ante o exposto, o uso de extratos padronizados contribui para garantir a homogeneidade química, a qualidade e a eficiência dos fitoterápicos (BAUER, 1998; CAPASSO et al., 2000).

Diante da expressiva variação dos teores de catequina e epicatequina nos fitoterápicos contendo *M. ilicifolia* avaliados neste estudo, verifica-se a necessidade do desenvolvimento de extratos padronizados de *M. ilicifolia* para assegurar a homogeneidade química e conseqüentemente a ação terapêutica, como ocorre com o extrato a base de folhas de *Gingko biloba* L., denominado de extrato padronizado EGb 761 (KRATZ, et al., 2008)

Tabela 18. Variação do teor dos marcadores catequina e epicatequina e quantidade de epicatequina por grama de matéria-prima vegetal, nos diferentes fitoterápicos contendo pó ou extrato seco de *M. ilicifolia*

AMOSTRA	CATEQUINA		EPICATEQUINA	
	Teor (%) ± DPR	Teor (%) ± DPR	Teor (%) ± DPR	Q _{EPICAT} (mg/g)
Amostra autêntica	0,339 ± 0,87	1,272 ± 0,42		12,72
A1*	0,124 ± 2,05	0,192 ± 3,16		1,92
A2*	0,154 ± 3,01	0,201 ± 4,14		2,01
A3*	0,129 ± 1,80	0,144 ± 2,27		1,44
B*	0,209 ± 1,71	0,211 ± 2,07		2,11
C*	0,196 ± 0,54	0,232 ± 1,58		2,32
F*	0,205 ± 3,72	0,206 ± 2,76		2,06
I*	0,161 ± 1,15	0,308 ± 1,86		3,08
D**	0,317 ± 3,16	-		-
E**	0,032 ± 11,95	0,045 ^{***} ± 9,96		0,45
G**	0,316 ± 3,20	0,031 ^{***} ± 3,53		0,31
H**	0,314 ± 1,24	0,037 ^{***} ± 7,90		0,37

Q_{EPICAT}: Quantidade de epicatequina, em mg, por grama de matéria-prima vegetal

* Fitoterápicos contendo extrato seco de *M. ilicifolia*

**Fitoterápicos contendo pó de *M. ilicifolia*

***valores inferiores ao limite de quantificação do método analítico



Figura 15. Cromatogramas da amostra autêntica de *M. ilicifolia* (...) e do conteúdo do fitoterápico D (—), evidenciando a ausência do marcador epicatequina no fitoterápico. Condições cromatográficas: fase móvel composta por água:acetonitrila:metanol:ácido acético (84:10:5:1), em eluição isocrática, fluxo de 1 mL/min, coluna Varian C18 250 x 4,6 mm, 5 μ m e detector a 280 nm.

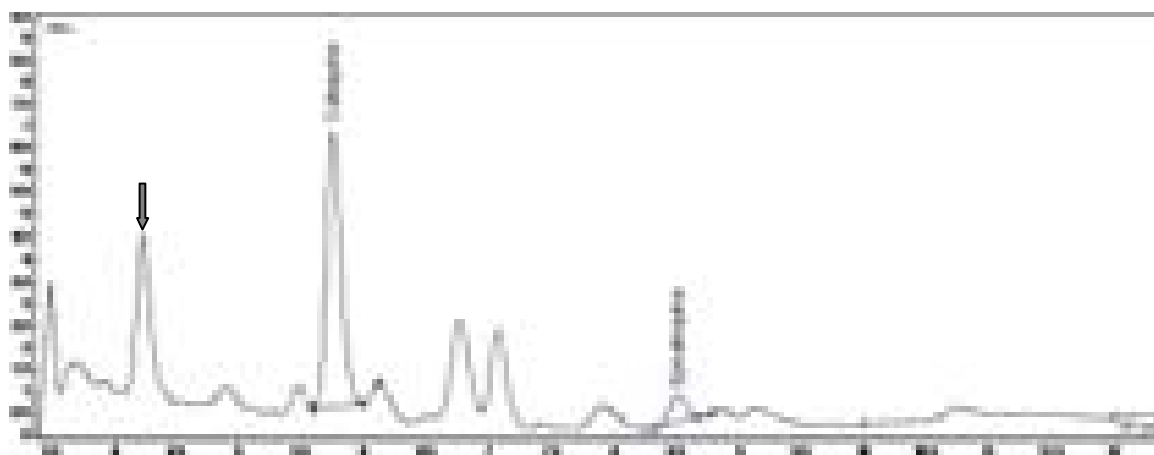


Figura 16. Cromatograma do conteúdo do fitoterápico H. Observa-se um pico no tr de 4,25 min (seta). Condições cromatográficas: fase móvel composta por água:acetonitrila:metanol:ácido acético (84:10:5:1), em eluição isocrática, fluxo de 1 mL/min, coluna Varian C18 250 x 4,6 mm, 5 μ m e detector a 280 nm.

Outros trabalhos também relataram ausência de uniformidade na quantidade dos marcadores em fitoterápicos. Variações expressivas (1,32 a 6,51%) no teor do marcador cafeína foram observadas para fitoterápicos (3 cápsulas e 2 comprimidos) à base de guaraná (SOUSA et al., 2010). Bara et al., (2004) verificaram que 91% das cápsulas analisadas, contendo extrato seco padronizado de *Ginkgo biloba*, estava em desacordo quanto aos valores declarados pelo fabricante em relação ao teor de ginkgoflavonóides. Na análise dos teores de lactonas terpênicas de fitoterápicos (5 comprimidos e 1 cápsulas) à base de *Ginkgo biloba* apenas um medicamento estava em conformidade com os valores preconizados para o extrato padronizado EGb 761. Nos demais, os teores de bilobalídeos estavam abaixo das especificações, enquanto que teores excessivos de ginkgolídeos foram observados (KRATZ et al., 2008). A

análise do teor de β -aescina contida na matéria-prima vegetal de 12 fitoterápicos (9 cápsulas contendo droga em pó e 3 comprimidos com extrato seco) à base de castanha-da-Índia, revelou que 91,7% dos medicamentos estavam em não conformidade com os valores de β -aescina preconizados na literatura (3 a 10% nas sementes e entre 15 e 20% no extrato seco) (MARTINS, BRANDÃO, 2006).

4.7. DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS DO ENSAIO DE DISSOLUÇÃO

A compilação de dados referentes às principais propriedades físicas e químicas das substâncias em estudo (e.g. pK_a , solubilidade e estabilidade em solução) constitui a primeira etapa para o desenvolvimento de um teste de dissolução (MARCOLONGO, 2003).

4.7.1. Avaliação da solubilidade da catequina e da epicatequina na faixa de pH fisiológico (1,2 a 6,8)

A solubilidade foi avaliada para os marcadores catequina e epicatequina, sendo expressa através da percentagem dissolvida. Conforme os resultados da Tabela 19 é possível observar que ambos os marcadores apresentaram alta solubilidade em HCl 0,1 M, e assim, este meio foi selecionado para os ensaios preliminares de dissolução. Ademais, nos meios água e tampão fosfato monopotássico pH 6,8 foi evidenciada alteração da cor das soluções após 24 horas, sugerindo uma possível degradação.

Considerando que as cápsulas são formas farmacêuticas de liberação imediata e que o estômago (pH entre 1 e 2,5; LABAUNE, 1993) é o local mais provável de liberação de seu conteúdo (KLEIN et al., 2005), infere-se que a utilização HCl 0,1 M (pH 1,2), neste estudo é relevante por simular o meio gástrico. A catequina e a epicatequina apresentam $pK_{a1} = 8,16$ e $pK_{a2} = 9,20$, respectivamente, e em meio gástrico, se encontram quase que exclusivamente sob a forma dissociada (LABAUNE, 1993; EL-HADY, EL MAALI, 2008), justificando a elevada solubilidade em HCl 0,1M.

O meio de dissolução HCl 0,1 M (pH 1,2) também foi selecionado para a realização dos ensaios de dissolução de fitoterápicos (cápsulas e comprimidos) contendo guaraná (*Paullinia cupana*), avaliando-se a porcentagem dissolvida dos marcadores catequina, epicatequina, cafeína e teofilina (SOUSA et al., 2010).

O planejamento do estudo de dissolução foi elaborado considerando um volume de meio de dissolução de 500 mL. Assim, baseando-se nos valores rotulados dos fitoterápicos e nos resultados de solubilidade obtidos para o meio HCl 0,1M as

condições *sink* foram satisfeitas. O termo “*sink condition*” pode variar de acordo com a fonte, sendo definido pela Farmacopéia Americana como pelo menos três vezes o volume do meio necessário para obter uma solução saturada do fármaco (USP, 2007a).

Tabela 19. Porcentagem de catequina e epicatequina dissolvida nos meios HCl 0,1 M, água e tampão fosfato pH 6,8

Meios	Tempo de coleta (h)	CATEQUINA		EPICATEQUINA	
		Concentração (µg/mL)	% Dissolvida	Concentração (µg/mL)	% Dissolvida
HCl 0,1M (pH 1,2)	1	11,89	95,52	46,51	86,71
	2	12,07	96,74	46,61	85,95
	24	14,93	120,02	38,46	82,76
Água (pH 4,9)	1	10,34	83,12	36,34	78,20
	24	6,21	49,93	17,60	37,86
Tampão Fosfato Monopotássico (pH 6,8)	1	7,97	64,09	27,30	58,75
	24	3,18	25,60	4,79	10,31

4.7.2. Teste de estabilidade

O teste de estabilidade foi conduzido com padrões dos marcadores e com pó da amostra autêntica de *M. ilicifolia* em HCl 0,1M, visto que este foi o meio selecionado para a realização dos ensaios de dissolução (item 4.7.1). Conforme observado na Tabela 20, os padrões de catequina e epicatequina permaneceram estáveis durante o período de 480 minutos, visto que os valores obtidos encontram-se entre 98% e 102% de acordo com os critérios estabelecidos na USP 30 (USP, 2007a).

Porém, para as análises conduzidas com o pó da amostra autêntica, os valores obtidos para o marcador catequina não se situam nesse critério de aceitação apresentando porcentagens de aproximadamente 106% em 60 minutos de teste (tempo necessário para o ensaio de dissolução) (Tabela 21). Para a epicatequina, os valores se encontram entre 98% e 102% nos primeiros 45 minutos de teste e entre 96% e 104% até 120 minutos. Segundo Skoug et al., (1997) o limite de 2% foi estabelecido arbitrariamente, podendo não ser apropriado para todos os casos. Deve-se considerar que os fitoterápicos são matrizes complexas e que a instabilidade de alguns constituintes pode influenciar na composição do extrato (SRINIVASAN, 2005). Ademais, os limites declarados no teste de estabilidade são destinados a substâncias isoladas, não existindo valores específicos para fitoterápicos.

Tabela 20. Teste de estabilidade dos padrões dos marcadores catequina e epicatequina em HCl 0,1 M

Tempo de amostragem (min)	CATEQUINA			EPICATEQUINA		
	Área (mAU.Sec)	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	%	Área (mAU.Sec)	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	%
0	40,1	64,4	100	3,74	5,86	100
	40,8	64,7	100	3,81	5,89	100
	Média	64,55		Média	5,88	
	DP	0,21		DP	0,02	
	DPR	0,33		DPR	0,36	
30	40,4	65,5	101,71	3,77	5,96	101,71
	40,6	65,4	101,08	3,79	5,96	101,19
	Média	65,45	101,39	Média	5,96	101,45
	DP	0,07	0,44	DP	0,00	0,37
	DPR	0,11	0,44	DPR	0,00	0,36
45	40,3	64,8	100,62	3,76	5,90	100,68
	40,6	64,6	99,85	3,79	5,88	99,83
	Média	64,70	100,23	Média	5,89	100,26
	DP	0,14	0,55	DP	0,01	0,60
	DPR	0,22	0,55	DPR	0,24	0,60
60	40,6	64,8	100,62	3,79	5,90	100,68
	40,7	64,5	99,69	3,80	5,87	99,66
	Média	64,65	100,16	Média	5,89	100,17
	DP	0,21	0,66	DP	0,02	0,72
	DPR	0,33	0,66	DPR	0,36	0,72
120	41,2	64,6	100,31	3,85	5,88	100,34
	40,9	64,7	100,00	3,82	5,89	100,00
	Média	64,65	100,16	Média	5,89	100,17
	DP	0,07	0,22	DP	0,01	0,24
	DPR	0,11	0,22	DPR	0,12	0,24
480	40,4	63,7	98,91	3,77	5,80	98,98
	40,6	64,5	99,69	3,79	5,87	99,66
	Média	64,10	99,30	Média	5,84	99,32
	DP	0,57	0,55	DP	0,05	0,48
	DPR	0,88	0,55	DPR	0,85	0,49

Tabela 21. Teste de estabilidade, em HCl 0,1 M, do pó da amostra autêntica de *M. ilicifolia* avaliado para os marcadores catequina e epicatequina.

Tempo de amostragem (min)	CATEQUINA			EPICATEQUINA		
	Área (mAU.Sec)	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	%	Área (mAU.Sec)	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	%
0	41,7	3,89	100	163,3	14,83	100
	43	4,01	100	163,2	14,82	100
	Média	3,95		Média	14,825	
	DP	0,0849		DP	0,0071	
	DPR	2,15		DPR	0,05	
30	43,2	4,03	103,6	160,9	14,61	98,52
	44,1	4,11	102,4	162,7	14,77	99,66
	Média	4,07	103,0	Média	14,69	99,09
	DP	0,0566	0,781	DP	0,1131	0,810
	DPR	1,39	0,76	DPR	0,77	0,82
45	44,1	4,11	105,6	158,1	14,36	96,83
	44,7	4,17	103,9	162,9	14,79	99,80
	Média	4,14	104,8	Média	14,575	98,31
	DP	0,0424	1,177	DP	0,3041	2,098
	DPR	1,02	1,12	DPR	2,09	2,13
60	44,4	4,14	106,4	158,2	14,37	96,90
	45,3	4,23	105,5	161,3	14,65	98,85
	Média	4,19	105,9	Média	14,51	97,88
	DP	0,0636	0,665	DP	0,1980	1,382
	DPR	1,52	0,63	DPR	1,36	1,41
120	46	4,29	110,3	156,8	14,24	96,02
	46,8	4,36	108,7	160,8	14,60	98,52
	Média	4,33	109,5	Média	14,42	97,27
	DP	0,0495	1,099	DP	0,2546	1,764
	DPR	1,14	1,00	DPR	1,77	1,81
480	47,1	4,39	112,9	149,7	13,60	91,71
	48,1	4,48	111,7	152,7	13,87	93,59
	Média	4,44	112,3	Média	13,74	92,65
	DP	0,0636	0,801	DP	0,1909	1,3320
	DPR	1,43	0,71	DPR	1,39	1,44

%M = Porcentagem de marcador dissolvido em relação ao tempo 0 min

4.7.3. Estudo de estabilidade térmica

As curvas obtidas por TG e DTA para a catequina e a epicatequina podem ser visualizadas, respectivamente nas Figuras 17 e 18. Observa-se que para a catequina até a temperatura de 196,78°C não há perda de massa. Para a epicatequina até 200°C não há perda de massa e na faixa de fusão, há perda de massa de, aproximadamente, 7,156%. Com base nos resultados apresentados foi possível verificar que nas temperaturas do teste de estabilidade ($40 \pm 0,5^\circ\text{C}$) e do ensaio de dissolução ($37^\circ\text{C} \pm 0,5$) não há degradação térmica dos marcadores.

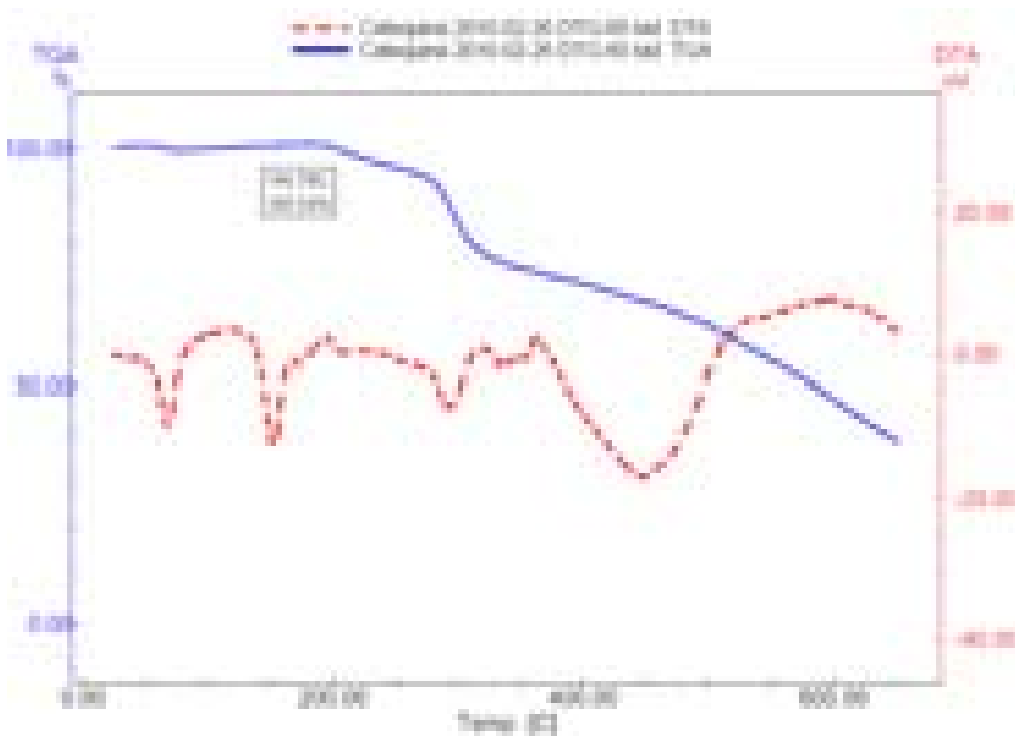


Figura 17. Análise de termogravimetria (TG) e análise térmica diferencial (DTA) do marcador catequina.

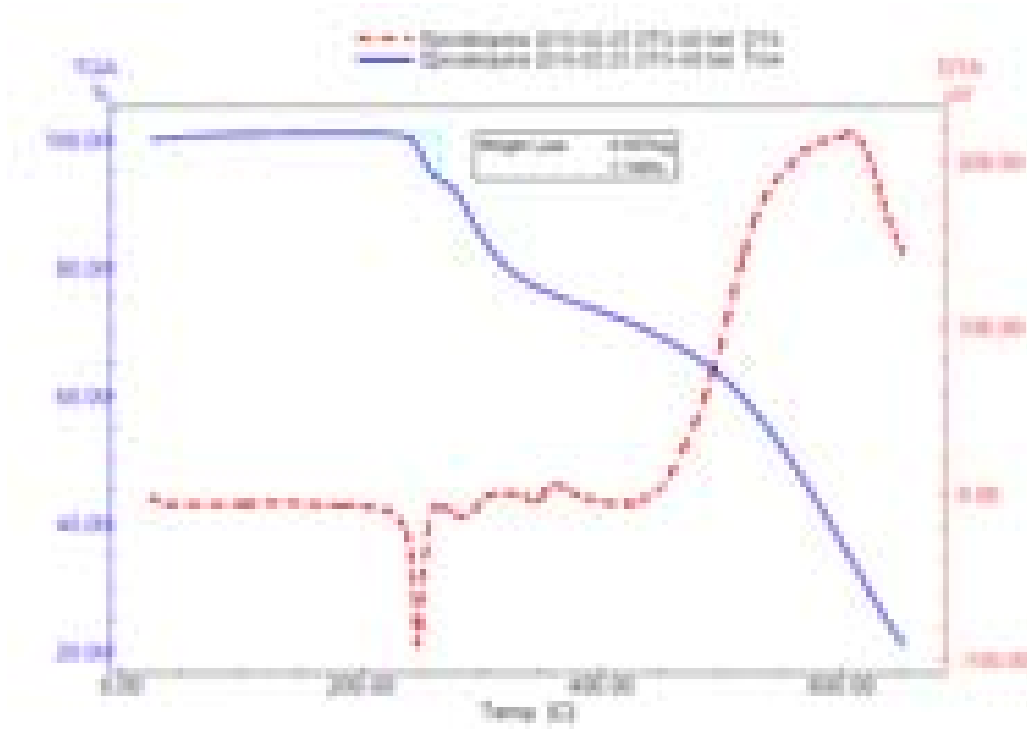


Figura 18. Análise de termogravimetria (TG) e análise térmica diferencial (DTA) do marcador epicatequina.

4.7.4. Ensaio de dissolução

Foram testadas quatro condições preliminares para o ensaio de dissolução (Tabela 3), utilizando cápsulas do fitoterápico A contendo 380 mg de extrato seco de *M. ilicifolia*. As quantidades dissolvidas dos marcadores catequina e epicatequina e os seus perfis de dissolução podem ser observados, respectivamente, nas Figuras 19 e 20. Para ambos os marcadores, a velocidade de agitação influenciou significativamente a dissolução, conforme verificado na Figura 21. Em relação ao volume de meio de dissolução, há diferença significativa entre os volumes testados apenas para o marcador catequina (Figura 22). De acordo com os resultados obtidos, para a realização dos ensaios de dissolução, o volume de meio foi definido em 900 mL e a velocidade de rotação em 75 rpm.

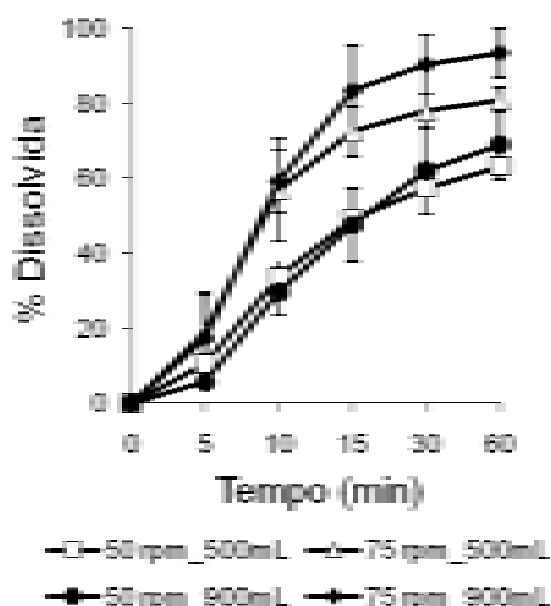


Figura 19. Perfis de dissolução da cápsula A contendo extrato seco de *M. ilicifolia* 380 mg, utilizando catequina como marcador, nas condições preliminares do teste de dissolução

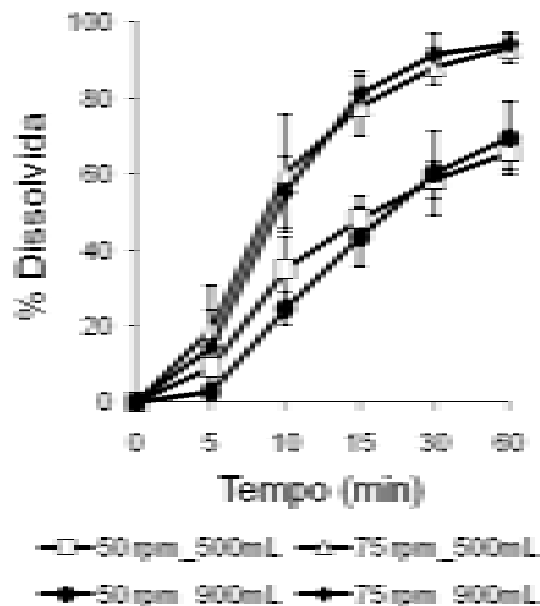


Figura 20. Perfis de dissolução da cápsula A contendo extrato seco de *M. ilicifolia* 380 mg, utilizando epicatequina como marcador, nas condições preliminares do teste de dissolução

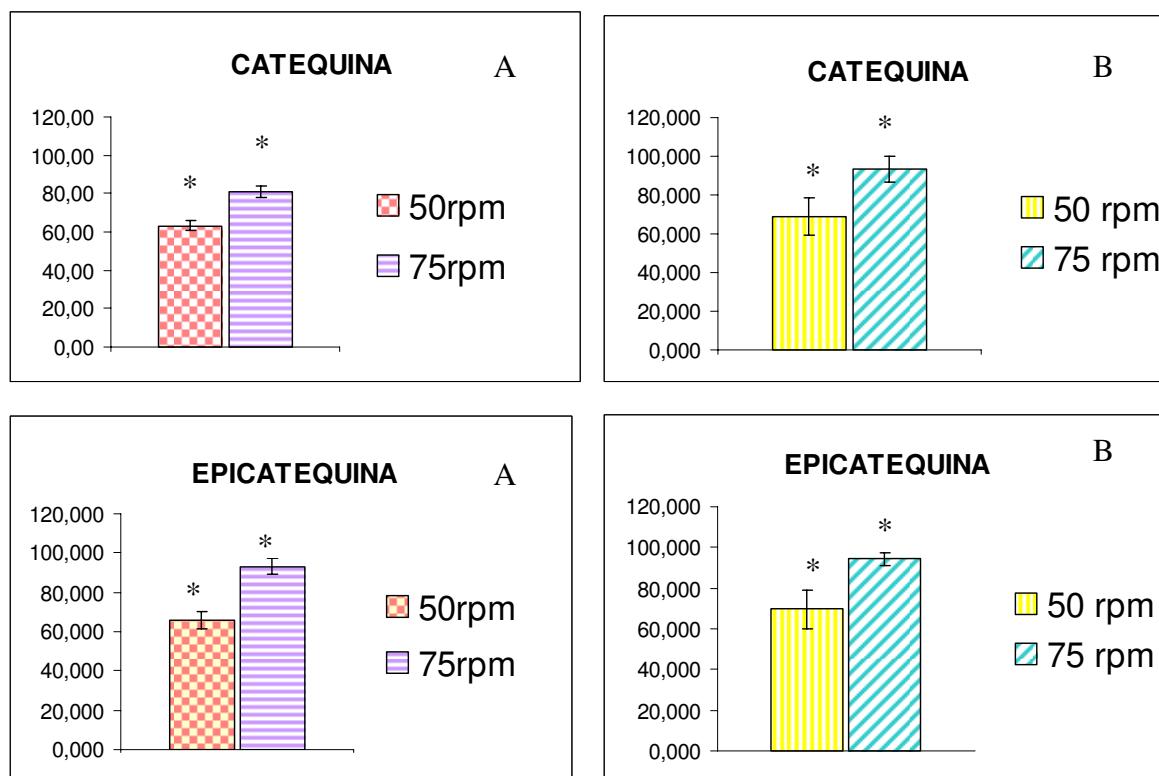


Figura 21. Influência da velocidade de agitação no perfil de dissolução dos marcadores catequina e epicatequina nos volumes de meio de dissolução de 500mL (A) e 900mL (B), onde * $p < 0,05$, de acordo com o teste *T-student*.

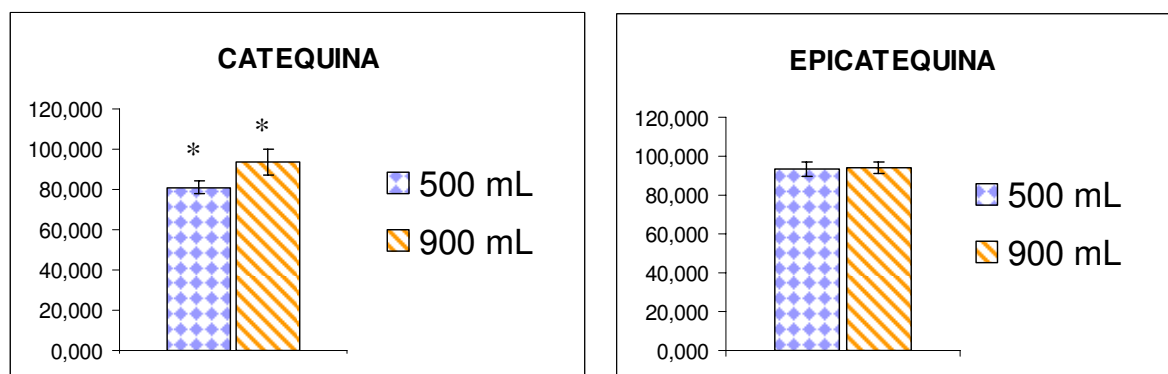


Figura 22. Influência do volume do meio HCl 0,1M no perfil de dissolução dos marcadores catequina e epicatequina, na velocidade de rotação de 75 rpm, onde * $p < 0,05$, de acordo com o teste de *T-student*

4.8. VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE DISSOLUÇÃO

4.8.1. Seletividade

A seletividade foi verificada pela comparação dos cromatogramas obtidos no teste de dissolução dos invólucros dos fitoterápicos A, B, C, D, E, F, G, H e I em HCl 0,1M, com os cromatogramas de solução padrão dos marcadores catequina e

epicatequina. Para todos os fitoterápicos avaliados não foi evidenciada a presença de interferentes nos tempos de retenção dos marcadores, assegurando a seletividade do método (Figura 23).

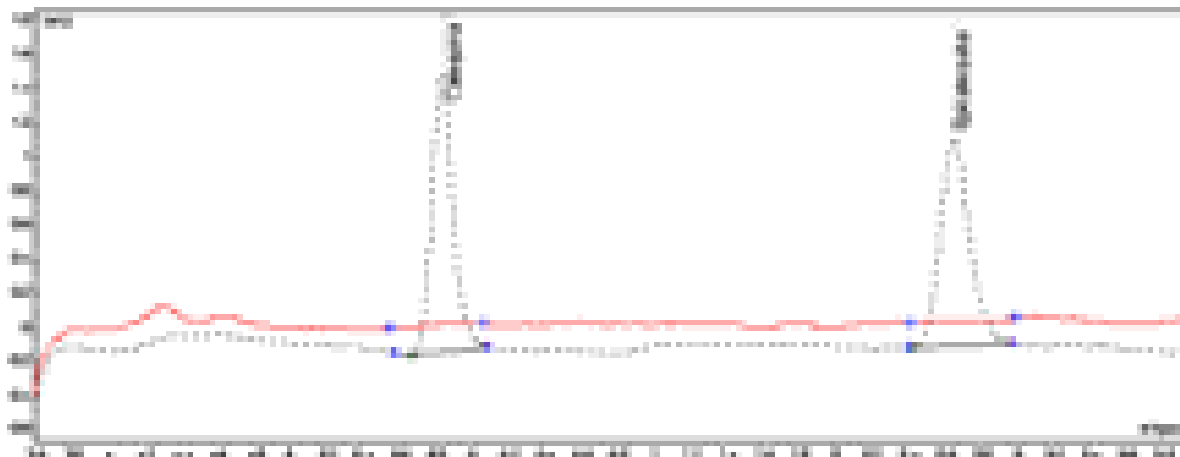


Figura 23. Cromatograma da solução padrão de catequina e epicatequina em HCl 0,1 M (----) e cromatograma da dissolução do invólucro da formulação A em HCl 0,1 M (—).

4.8.2. Linearidade

Os resultados obtidos demonstram para as curvas analíticas de catequina (Figura 24) e epicatequina (Figura 25) coeficientes de correlação linear ($r = 1$ para catequina e $r = 0,9995$ para a epicatequina) em conformidade com o especificado na USP 30 (2007a) ($r \geq 0,99$).

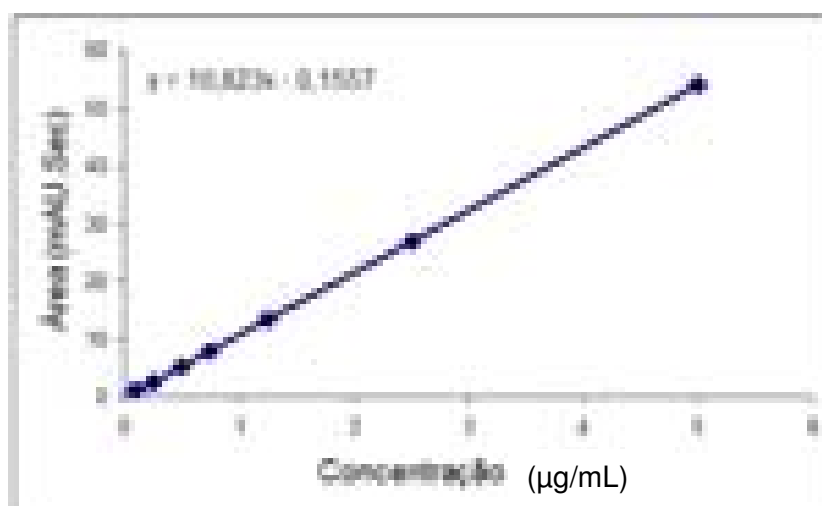


Figura 24. Curva de calibração da Catequina obtida por CLAE-UV utilizando concentrações de 0,1 a 5 $\mu\text{g/mL}$

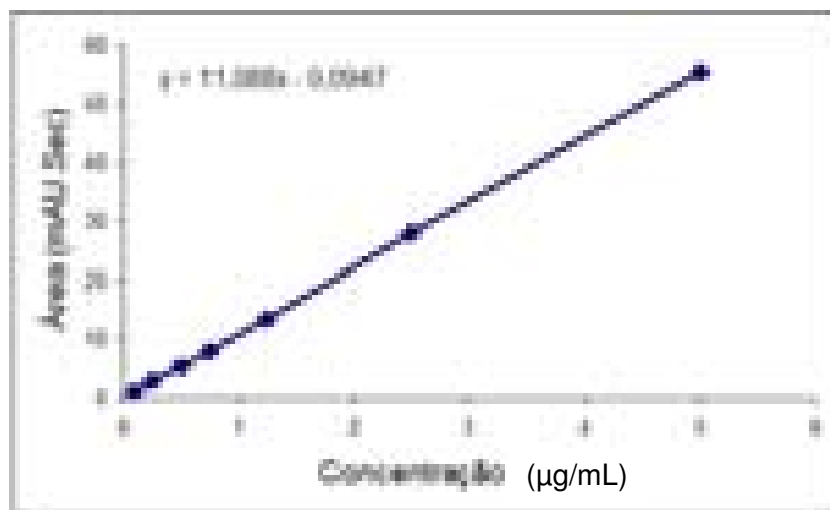


Figura 25. Curva de calibração da Epiatequina obtida por CLAE-UV utilizando concentrações de 0,2 a 5 µg/mL

4.8.3. Precisão e Exatidão

De acordo as especificações estabelecidas na USP 30 (USP, 2007a), o método de dissolução foi preciso, com coeficiente de variação inferior a 5%, e exato, com valores situados entre 95 e 105% para ambos os marcadores (Tabelas 22 e 23).

Tabela 22. Resultados da exatidão do teste de dissolução por CLAE-UV para quantificação de catequina em cápsulas contendo *M. ilicifolia*

% da Amostra	Amostra	Área (mAU.Sec)	Concentração (µg/mL)	Recuperação (%) de Catequina
100%	1	6,05	0,5734	101,36
	2	5,7	0,5410	95,12
	3	6,3	0,5503	97,01
	4	5,25	0,4995	102,86
	5	5,6	0,5318	95,05
	6	5,85	0,5549	97,83
	Média		0,5418	97,3306
	DP		0,0250	2,9127
	DPR		4,62	2,99

Tabela 23. Resultados da exatidão do teste de dissolução por CLAE-UV para quantificação de epicatequina em cápsulas contendo *M. ilicifolia*

% da Amostra	Amostra	Área (mAU.Sec)	Concentração (µg/mL)	Recuperação (%) de Epicatequina
100%	1	10,2	0,928454	95,37
	2	9,85	0,896889	93,87
	3	9,95	0,905907	98,53
	4	9,1	0,829248	102,22
	5	9,8	0,892379	102,06
	6	10,1	0,919435	95,33
		Média	0,8954	97,8971
		DP	0,0351	3,6251
		DPR	3,92	3,70

4.9. PERFIL DE DISSOLUÇÃO DE CÁPSULAS CONTENDO PÓ OU EXTRATO SECO DE *M. ilicifolia*

Visto que a dissolução é etapa limitante do processo de absorção, espera-se que a realização de testes de uniformidade e dissolução avalie o processo de produção e assegure a distribuição homogênea e conseqüentemente a disponibilidade dos marcadores para absorção (TAGLIOLI et al., 2001; SRINIVASAN, 2005).

Foram realizados ensaios de dissolução com as cápsulas A1, A2, A3, B, C, F e I contendo extrato seco de *M. ilicifolia* e com as cápsulas D, E, G e H contendo pó de *M. ilicifolia*, conforme as condições descritas no item 4.7.4.

As figuras 26 a 36 mostram os perfis de dissolução das referidas cápsulas, avaliado para os marcadores catequina e epicatequina.

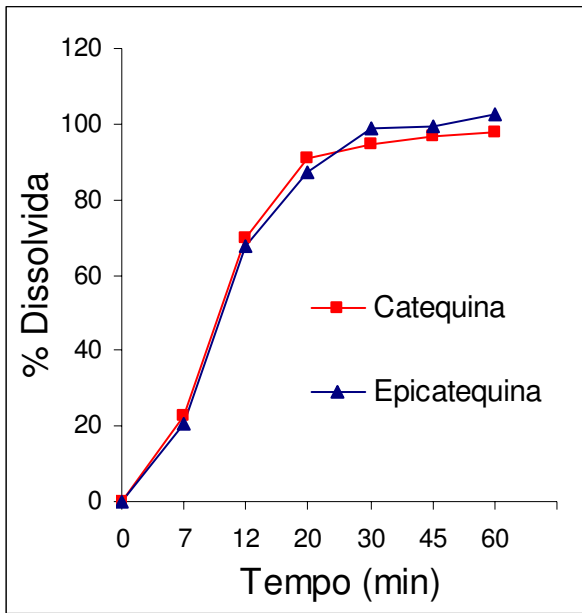


Figura 26. Comportamento de dissolução do fitoterápico A1, contendo 380 mg de extrato seco de *M. ilicifolia*, avaliado para os marcadores catequina e epicatequina

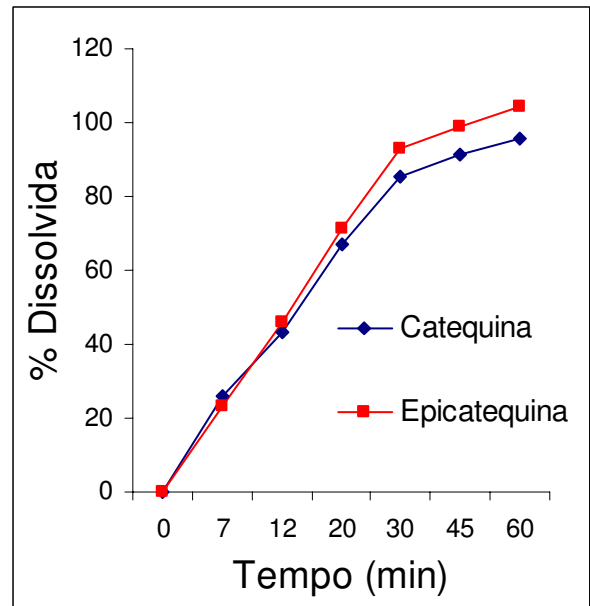


Figura 27. Comportamento de dissolução do fitoterápico A2, contendo 380 mg de extrato seco de *M. ilicifolia*, avaliado para os marcadores catequina e epicatequina

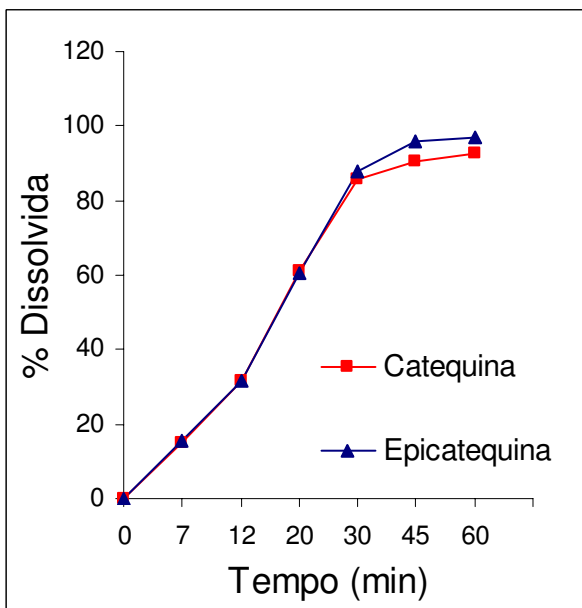


Figura 28. Comportamento de dissolução do fitoterápico A3, contendo 380 mg de extrato seco de *M. ilicifolia*, avaliado para os marcadores catequina e epicatequina

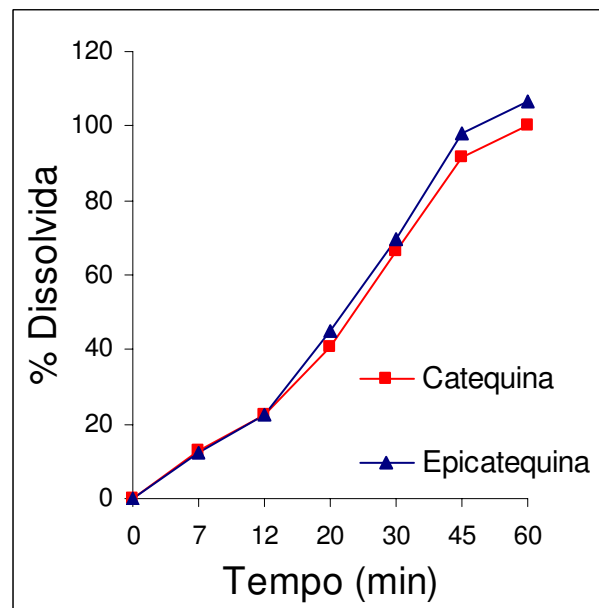


Figura 29. Comportamento de dissolução do fitoterápico B, contendo 380 mg de extrato seco de *M. ilicifolia*, avaliado para os marcadores catequina e epicatequina

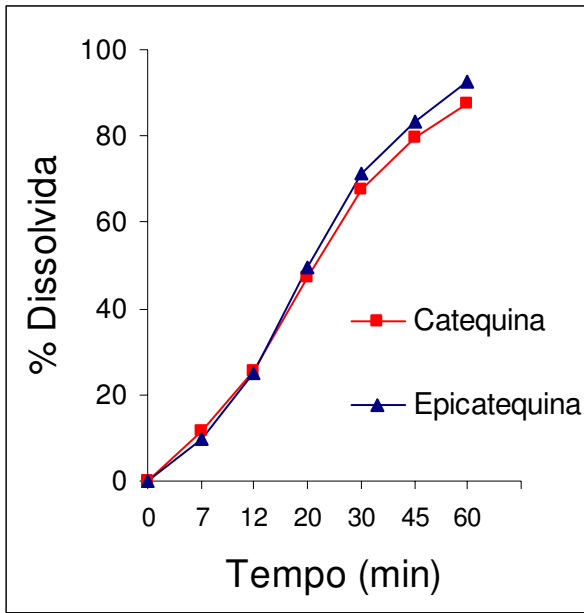


Figura 30. Comportamento de dissolução do fitoterápico C, contendo 420 mg de extrato seco de *M. ilicifolia*, avaliado para os marcadores catequina e epicatequina

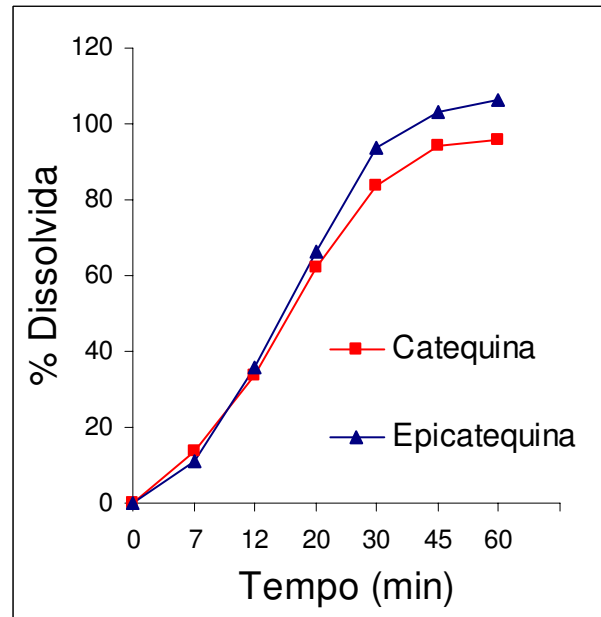


Figura 31. Comportamento de dissolução do fitoterápico F, contendo 400 mg de extrato seco de *M. ilicifolia*, avaliado para os marcadores catequina e epicatequina

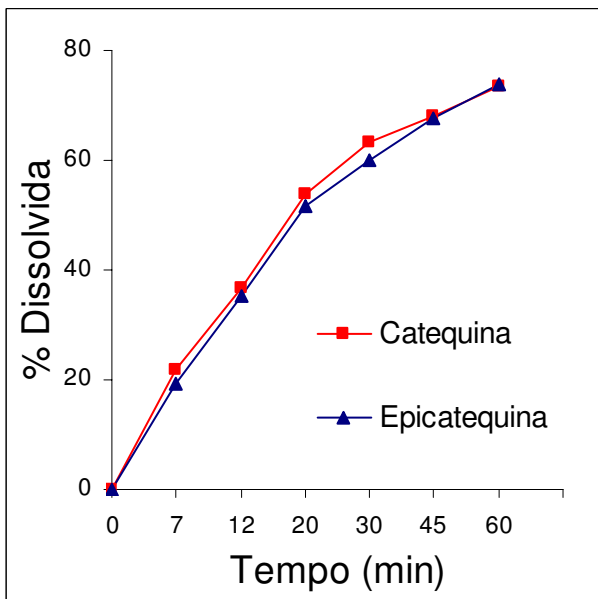


Figura 32. Comportamento de dissolução do fitoterápico I, contendo 300 mg de extrato seco de *M. ilicifolia*, avaliado para os marcadores catequina e epicatequina

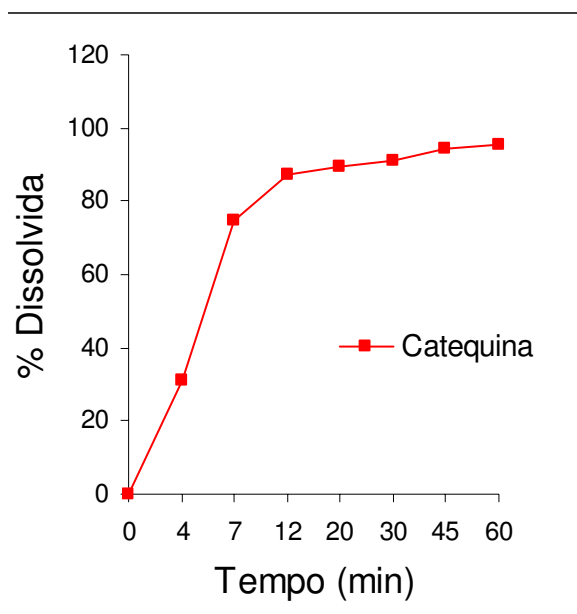


Figura 33. Comportamento de dissolução do fitoterápico D, contendo 250 mg de pó de *M. ilicifolia*, avaliado para o marcador catequina

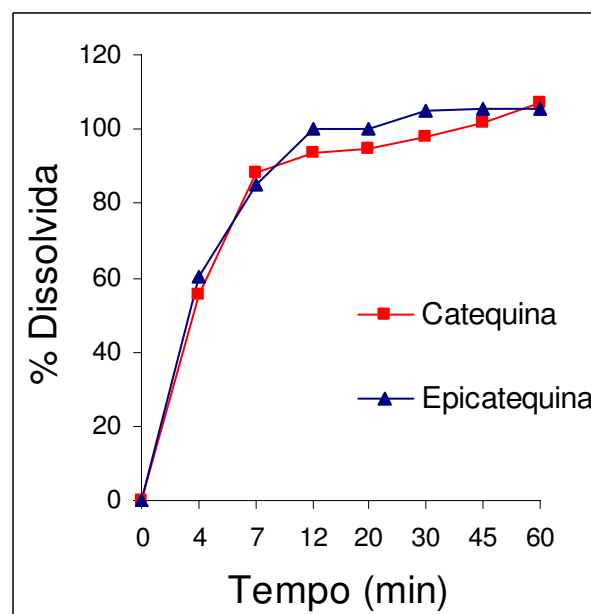


Figura 34. Comportamento de dissolução do fitoterápico E, contendo 500 mg de pó de *M. ilicifolia*, avaliado para os marcadores catequina e epicatequina

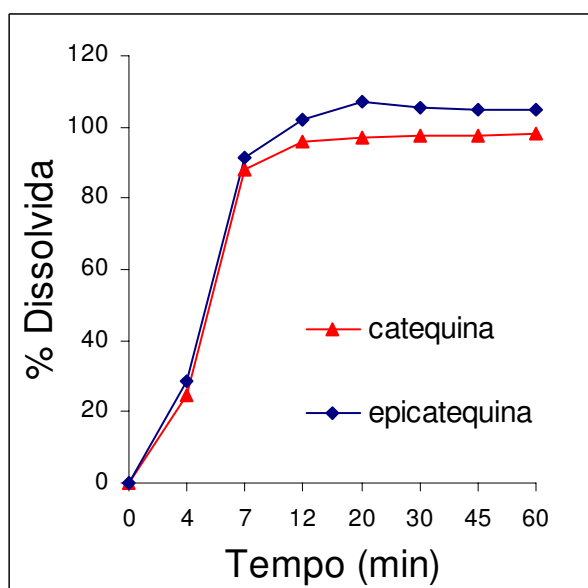


Figura 35. Comportamento de dissolução do fitoterápico G, contendo 400 mg de pó de *M. ilicifolia*, avaliado para os marcadores catequina e epicatequina

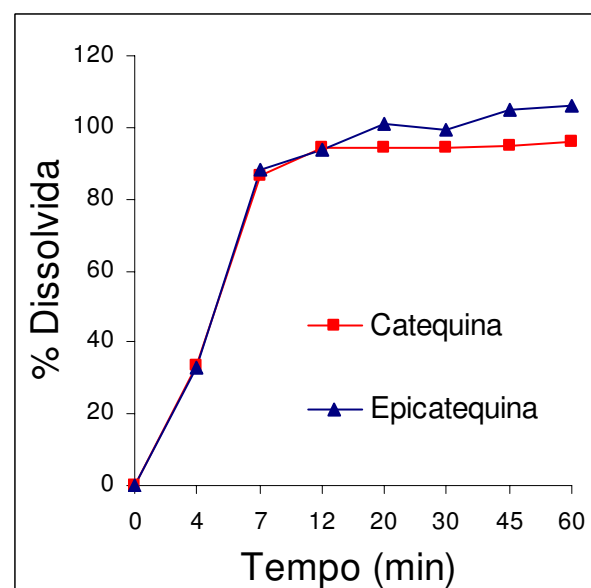


Figura 36. Comportamento de dissolução do fitoterápico H, contendo 300 mg de pó de *M. ilicifolia*, avaliado para os marcadores catequina e epicatequina

Produtos de liberação imediata geralmente liberam de 85 a 100% de seu conteúdo entre 30 e 45 minutos (USP 30, 2007a). Como critério de aceitação, a Farmacopéia Americana recomenda que a quantidade de fármaco dissolvida (Q), expressa como porcentagem do conteúdo rotulado, se situe na faixa de 75 a 80% (USP 30, 2007a). A especificação para produtos fitoterápicos no primeiro estágio do teste de

dissolução é que a quantidade média dissolvida, não seja inferior a $Q + 10\%$ (USP 30, 2007b).

Ante o exposto e devido à ausência de especificações para o teste de dissolução de formulações contendo *M. ilicifolia*, o presente trabalho considerou em conformidade aquelas amostras que após 45 minutos de ensaio apresentar 85% ($Q+10\%$) de catequina e epicatequina dissolvidas no meio. Neste estudo não foram realizadas comparações entre as formulações contendo pó e extrato seco de *M. ilicifolia* visto que são matérias-primas com características distintas e para esta análise seria necessária a obtenção de dados de seus comportamentos *in vivo*.

Os fitoterápicos D, E, G e H, contendo o pó de *M. ilicifolia* apresentaram uma rápida liberação de seu conteúdo, com porcentagens dissolvidas acima de 85% em 12 minutos. A rápida liberação inicial de um fármaco pode ser indesejável terapeuticamente. Deve-se avaliar se o organismo é capaz de absorver prontamente todo o fármaco liberado no início do processo de dissolução, sem prejuízo para se manter concentrações plasmáticas ideais (KRESSMANN et al., 2002; MARCOLONGO, 2003) .

Dentre os fitoterápicos contendo extrato seco de *M. ilicifolia*, as amostras C e I não estavam em conformidade, de acordo com os critérios adotados, apresentando em 45 minutos, respectivamente, 79,49% e 67,83% de catequina dissolvida e 83,18% e 67,79% de epicatequina dissolvida. Partículas de extrato seco apresentam forma esférica uniforme e uma rápida dissolução, devido à grande área específica (OLIVEIRA, PETROVICK, 2010). Todavia, os extratos secos podem formar aglomerações durante o ensaio de dissolução resultando em baixa área superficial devido à incompleta molhabilidade ou aglomeração (TAGLIOLI et al., 2001). Isto poderia justificar os comportamentos de dissolução dos fitoterápicos C e I. Também foi possível observar diferenças entre os perfis de dissolução de distintos lotes de um mesmo fabricante (fitoterápico A). O conteúdo da amostra A1 foi liberado mais rapidamente do que o das amostras A2 e A3, as quais apresentaram perfis semelhantes.

Taglioli et al. (2001) compararam formulações compostas por *Passiflora* sp., *Senna* sp., e *Gingko biloba* contendo droga em pó ou extrato liofilizado. Os fitoterápicos à base de *Passiflora* sp. e *Senna* sp. produzidos com extrato liofilizado apresentaram, após o mesmo período, maior porcentagem de liberação dos marcadores em relação às formulações com droga em pó. Os fitoterápicos contendo o extrato seco, o

granulado e o pó de *Ginkgo biloba* revelaram um bom desempenho e podem ser considerados praticamente equivalentes *in vitro*.

Outro estudo avaliou a dissolução de cápsulas contendo *Passiflora* sp de acordo com a quantidade dissolvida de flavonóides totais. Para os fitoterápicos contendo extrato seco foram liberados 87% de flavonóides totais enquanto que, para as formulações contendo droga em pó a quantidade dissolvida foi 75% (COSTA et al., 2010).

Além dos trabalhos citados, há na literatura alguns estudos disponíveis abordando ensaio de dissolução de fitoterápicos. Sittichai et al., (2007) realizaram um estudo de dissolução de cápsulas de açafrão (*Curcuma longa* L.) onde a adição de 0,8% de lauril sulfato de sódio no meio (ácido clorídrico 0,05 M) resultou em aumento da liberação de curcuminóides de 1% para 75% em 60 minutos.

Comprimidos contendo extrato nebulizado de *M. ilicifolia* Mart., contendo 133,6 mg/g de polifenóis, utilizando o pirogalol como substância de referência, foram submetidos à ensaio de dissolução conduzido com o aparato pá, velocidade de agitação de 100 rpm e volume de meio de 900 mL (água a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$). Apesar da elevada quantidade de extrato contida nos comprimidos (375 mg), verificou-se relevante influência dos adjuvantes no perfil de dissolução, principalmente dos diluentes (celulose microcristalina e lactose). A adição de lactose, que é mais hidrossolúvel do que a celulose microcristalina, resultou em formulações de liberação mais rápida e com maior eficiência de dissolução (SOUZA, et al., 2001).

Os perfis de dissolução de seis fitoterápicos à base de *Ginkgo biloba* L. foram avaliados com base no conteúdo de bilobalídeo dissolvido. Todos os fitoterápicos comercializados sob a forma de comprimido estavam em conformidade com o critério de aceitação da Farmacopéia Americana (USP 29) que preconiza que não menos do que 75% da concentração total do bilobalídeo devem estar dissolvidos após 45 minutos de teste. Apenas um dos medicamentos, o qual era comercializado sob a forma de cápsulas, estava em desacordo com o compêndio oficial (KRATZ et al., 2008).

O comportamento de dissolução de cinco fitoterápicos (cápsulas e comprimidos) contendo guaraná (*Paullinia cupana*) foi avaliado baseando-se na quantidade dissolvida dos marcadores cafeína, teofilina, catequina e epicatequina. Verificou-se que 100% dos fitoterápicos estavam em desacordo quanto à presença dos quatro marcadores. Das três cápsulas analisadas, apenas uma atingiu 80% de marcadores dissolvidos, enquanto que as demais não excederam 60%. Entre os comprimidos, um apresentou 100% de cafeína dissolvida (único marcador detectado para este

fitoterápico) e o outro, possivelmente por problemas farmacotécnicos, não liberou mais do que 40% de seus marcadores (SOUSA et al., 2010).

4.10. ANÁLISE COMPARATIVA DO PERFIL DE DISSOLUÇÃO DE CÁPSULAS CONTENDO PÓ OU EXTRATO SECO DE *M. ilicifolia*

4.10.1. Métodos modelo dependentes

Após a linearização dos perfis de dissolução das cápsulas contendo *M. ilicifolia* foram obtidos os coeficientes de correlação (r) nos diferentes modelos (ordem zero, primeira ordem e Higuchi) (Tabela 24). O modelo mais adequado é aquele que apresenta coeficiente de correlação mais próximo de 1 (um) (RODRIGUES et al., 2008). Baseando-se nos resultados encontrados, observa-se que, para todos os fitoterápicos, o modelo matemático que mais se ajustou aos perfis foi o de primeira ordem, para o qual, se forem mantidas as condições *sink*, a velocidade de liberação será proporcional à quantidade de fármaco presente na formulação (MULYE, TURCO, 1995). Formas farmacêuticas de liberação imediata seguem o perfil cinético de primeira ordem e, assim os resultados obtidos neste estudo estão de acordo com os descritos na literatura (MULYE, TURCO, 1995; WAGNER, 1969).

A dissolução de comprimidos contendo elevadas quantidades de extrato nebulizado de *M. ilicifolia* Mart., conduzido com o aparato pá, velocidade de agitação de 100 rpm e volume de meio de 900 mL (água a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) sofreu relevante influência da adição de adjuvantes, principalmente dos diluentes (celulose microcristalina e lactose). A adição de lactose resultou em formulações de liberação mais rápida que apresentaram cinética de liberação de primeira ordem. Já as formulações com celulose microcristalina exibiram um perfil lento e gradual com cinética de liberação de ordem zero (SOUZA et al., 2001).

Tabela 24. Aplicação dos modelos ordem zero, primeira ordem e Higuchi nos perfis de dissolução de fitoterápicos contendo *M. ilicifolia*

FITOTERÁPICO	COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO (r)		
	Ordem Zero	Primeira Ordem	Higuchi
A1*	0,84812	0,99994	0,93287
A2*	0,94490	1,00000	0,98215
A3*	0,95703	0,99999	0,95507
B*	0,99750	0,99999	0,94337
C*	0,97869	1,00000	0,95978
F*	0,96513	1,00000	0,95887
I*	0,92439	1,00000	0,98371
D**	0,68247	0,99982	0,87720
E**	0,64288	0,99898	0,85463
G**	0,61751	0,99906	0,83186
H**	0,61026	0,99933	0,82639

* Fitoterápicos contendo extrato seco de *M. ilicifolia*

** Fitoterápicos contendo pó de *M. ilicifolia*

Conforme os critérios adotados, a determinação de parâmetros cinéticos como Q45 e $t_{85\%}$ revelam-se úteis na comparação dos perfis de dissolução. As equações obtidas e os parâmetros cinéticos calculados para cada produto estão descritos na Tabela 25 e as Figuras 37 e 38 apresentam os perfis resultantes da aplicação do modelo matemático de primeira ordem para os valores médios de dissolução dos fitoterápicos A (lotes 1, 2 e 3), B, C, D, E, F, G, H e I.

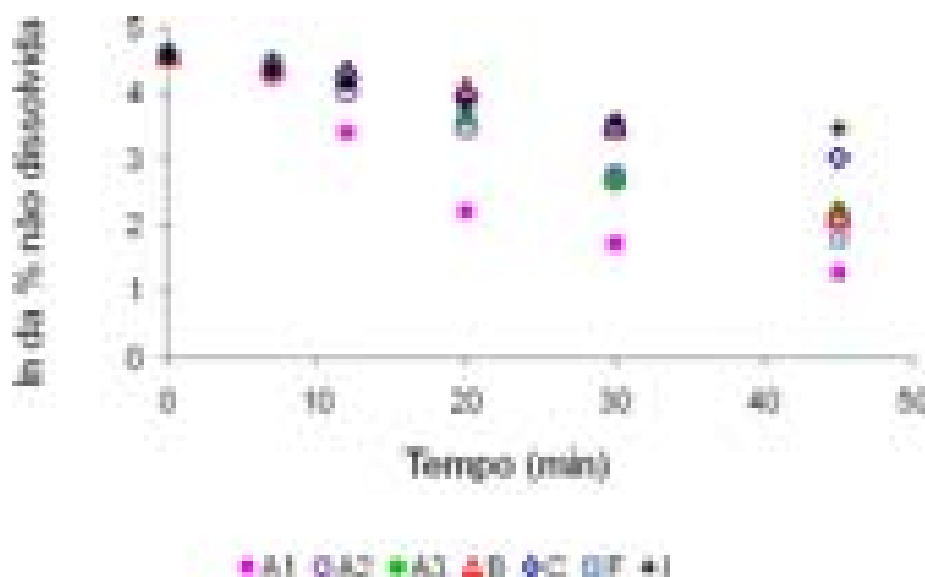


Figura 37. Transformação logarítmica da porcentagem de catequina não dissolvida nos fitoterápicos A1, A2, A3, B, C, F e I, contendo extrato seco de *M. ilicifolia*, aplicando o modelo de primeira ordem. Os valores correspondem à média de seis determinações

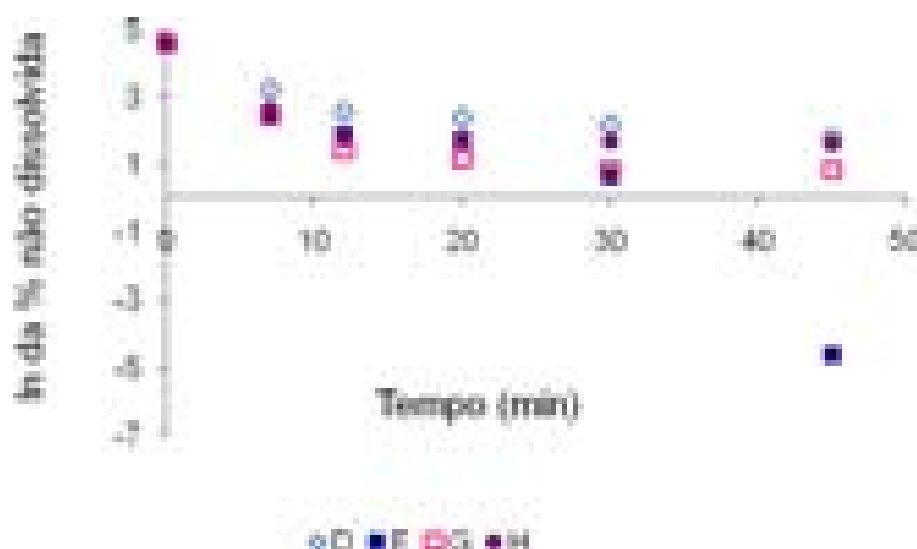


Figura 38. Transformação logarítmica da porcentagem de catequina não dissolvida nos fitoterápicos D, E, G, e H, contendo pó de *M. ilicifolia*, aplicando o modelo de primeira ordem. Os valores correspondem à média de seis determinações

De acordo com dados expressos na Tabela 25 é possível fazer algumas considerações:

- Observa-se que o lote A1 atinge 85% de catequina dissolvida em menor tempo, quando comparado com os demais lotes do mesmo fabricante (lotes A2 e A3), ou seja, apresenta maior velocidade de liberação.
- Os fitoterápicos E, G e H, contendo o pó de *M. ilicifolia*, liberam 85% de seu conteúdo em menos de 12 minutos.
- Os cálculos de Q45 revelam que os fitoterápicos C e I não conseguem atingir 85% do marcador dissolvido em 45 minutos.

As mesmas conclusões foram obtidas com a análise dos perfis de dissolução evidenciando que o modelo cinético de primeira ordem teve boa aplicação para estes fitoterápicos. A exceção foi para o produto D para o qual a quantidade calculada do tempo para liberar 85% de seu conteúdo foi muito superior à verificada experimentalmente. Este fato pode ser decorrente de inadequação da formulação, visto que o fitoterápico D apresentou desvio de qualidade nos testes de peso médio e variação de peso. Ademais, a liberação dos fármacos pode envolver diversas etapas que envolvem fenômenos físicos ou químicos, dificultando sua descrição por modelos matemáticos (COSTA, LOBO, 2001).

Tabela 25. Equações e parâmetros cinéticos obtidos a partir dos perfis de dissolução dos fitoterápicos contendo *M. ilicifolia*, segundo a cinética de primeira ordem

FITOTERÁPICO	EQUAÇÃO	PARÂMETROS CINÉTICOS	
		t _{85%}	Q45
A1*	$\ln\%ND = -0,0812 t + 4,4680$	21,67	97,74
A2*	$\ln\%ND = -0,0582 t + 4,6510$	33,38	92,37
A3*	$\ln\%ND = -0,0586 t + 4,7533$	34,90	91,70
B*	$\ln\%ND = -0,0542 t + 4,8894$	40,25	88,41
C*	$\ln\%ND = -0,0374 t + 4,6870$	52,91	79,83
F*	$\ln\%ND = -0,0664 t + 4,8393$	32,10	93,63
I*	$\ln\%ND = -0,0260 t + 4,4971$	68,81	72,14
D**	$\ln\%ND = -0,0533 t + 3,7967$	20,42	95,95
E**	$\ln\%ND = -0,1782 t + 4,5025$	10,07	99,97
G**	$\ln\%ND = -0,0707 t + 3,2266$	7,33	98,95
H**	$\ln\%ND = -0,0509 t + 3,3119$	11,86	97,22

$\ln\%ND$ =logaritmo neperiano da porcentagem não dissolvida; t=tempo (minutos); t_{85%} = tempo no qual se dissolve 85% de catequina (minutos); Q45 = quantidade de catequina dissolvida aos 45 minutos (%)

* Fitoterápicos contendo extrato seco de *M. ilicifolia*

** Fitoterápicos contendo pó de *M. ilicifolia*

4.10.2. Eficiência de dissolução

A eficiência de dissolução obtida para os fitoterápicos contendo extrato seco ou pó de *M. ilicifolia* está representada, respectivamente, nas figuras 39 e 40. A partir dos resultados de %ED, verifica-se semelhança entre os perfis dos lotes A2 e A3 os quais diferem estatisticamente do lote A1. Os valores de %ED do fitoterápico C, considerado não conforme no teste de dissolução, foram inferiores aos resultados encontrados para quase todos os fitoterápicos em conformidade. A exceção foi a amostra B que, apesar de liberar seu conteúdo mais lentamente e apresentar baixas porcentagens de ED, cumpriu as especificações do teste de dissolução.

Essas considerações estão de acordo com os dados obtidos experimentalmente no perfil de dissolução e matematicamente, após aplicação do modelo cinético de primeira ordem.

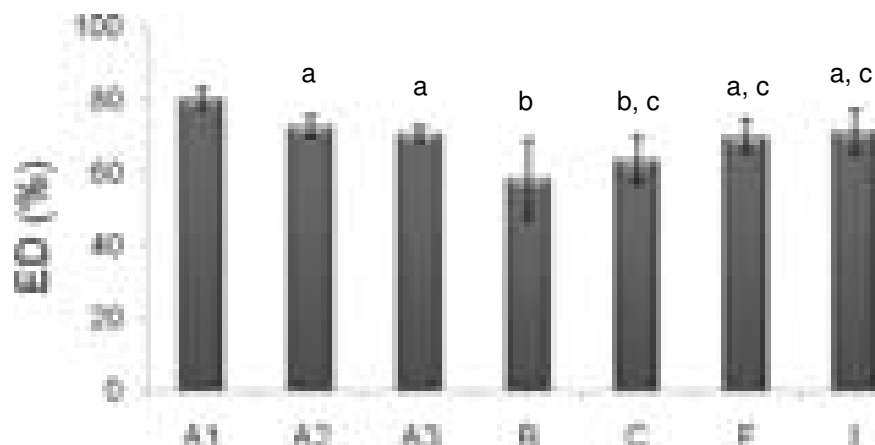


Figura 39. Eficiência de dissolução (ED) dos fitoterápicos contendo extrato seco de *M. ilicifolia*, avaliada para o marcador catequina. Amostras com letras iguais não diferem estatisticamente, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$)

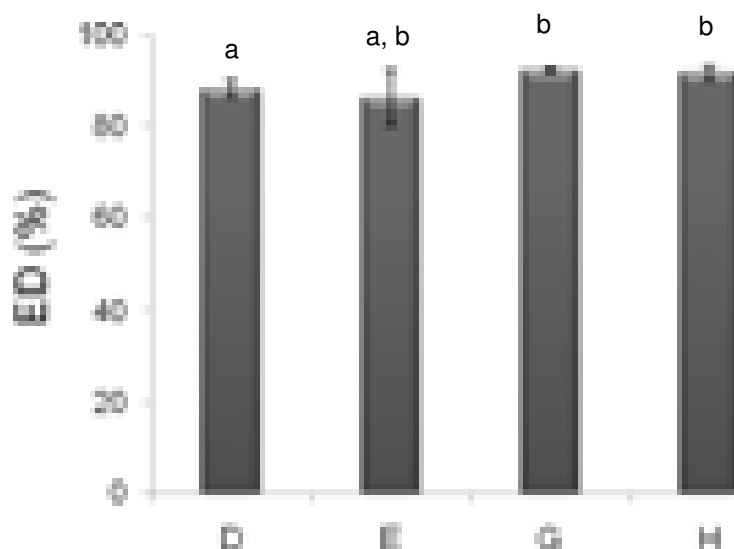


Figura 40. Eficiência de dissolução (ED) dos fitoterápicos contendo pó de *M. ilicifolia*, avaliada para o marcador catequina. Amostras com letras iguais não diferem estatisticamente, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

4.11. TAMANHO DE PARTÍCULA DO CONTEÚDO DAS CÁPSULAS DE *M. ilicifolia*

O tamanho de partícula, devido à sua influência no comportamento de dissolução, foi verificado por microscopia óptica para o conteúdo das cápsulas analisadas neste estudo (Tabela 26).

A análise microscópica das amostras A1, A2, A3, B, C, F e I (Figuras 41, 42, 43, 44, 45, 46 e 47) revelou a presença de um campo de visualização relativamente limpo com cristais prismáticos (presença de refringência) do excipiente empregado na obtenção do extrato seco. As partículas obtidas tinham formato esférico e superfície rugosas, cujos tamanhos se situam entre 5,42 e 43,46 μm . A otimização das variáveis do processo de produção de extratos secos assegura, em parte, o controle da uniformidade e do tamanho das partículas dos produtos (OLIVEIRA, PETROVICK, 2010). Todavia, a variação nos tamanhos de partículas dos extratos secos de *M. ilicifolia* observada neste trabalho pode ser em decorrência da absorção de umidade durante a manipulação com conseqüente formação de aglomerados, os quais podem ser visualizados nas Figuras 41, 42, 43, 44, 45, 46 e 47.

Em relação às amostras D, E, G e H (Figuras 48, 49, 50 e 51) constituídas pelo pó de *M. ilicifolia*, observou-se um campo de visualização bem mais "sujo" com a presença de partículas de formato irregular variando de 3,04 a 122,61 μm e com ausência de cristais prismáticos. A variação de tamanho observada para o pó de *M. ilicifolia*, pode ser provavelmente devido à falta de tamisação da matéria-prima. É interessante ressaltar que na microscopia de pó do produto D, detectou-se fragmentos maiores (Figura 48), o que pode justificar o desvio de qualidade desse fitoterápico nos ensaios de peso médio e variação de peso, possivelmente por ser tratar de um pó grosso.

Tabela 26. Tamanho de partícula do conteúdo das cápsulas de *M. ilicifolia*

Amostras	Tamanho de Partícula (μm)
A1*	10,41 – 31,08
A2*	8,5 – 17,7
A3*	10,5 – 25,59
B*	26,6 – 36,24
C*	13,27 – 27,83
F*	5,42 – 43,46
I*	20,90 – 42,82
D**	35,07 – 122,61
E**	3,72 – 11,67
G**	3,04 – 11,51
H**	8,30 – 24,65

*Fitoterápicos contendo extrato seco de *M. ilicifolia*

**Fitoterápicos contendo pó de *M. ilicifolia*

Através dos resultados expressos na Tabela 26, é possível verificar que o tamanho de partícula não foi um dos principais fatores que modulam a dissolução das

cápsulas de *M. ilicifolia*, visto que, o fitoterápico D, apesar do maior tamanho de suas partículas (35,07 – 122,61 μm), apresentou uma rápida liberação de seu conteúdo (87% em 12 minutos).

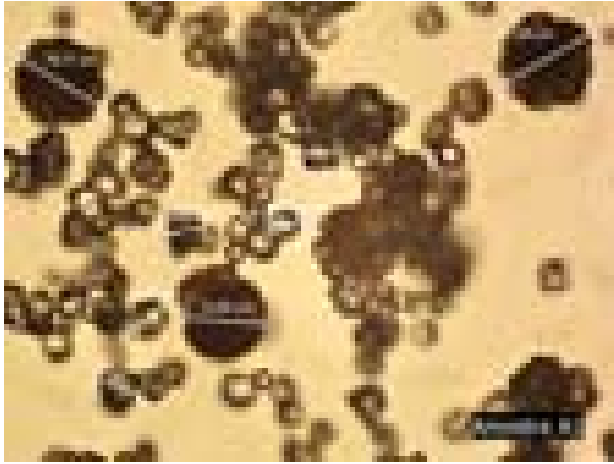


Figura 41. Conteúdo das cápsulas A1, vistas por microscopia óptica (40x)

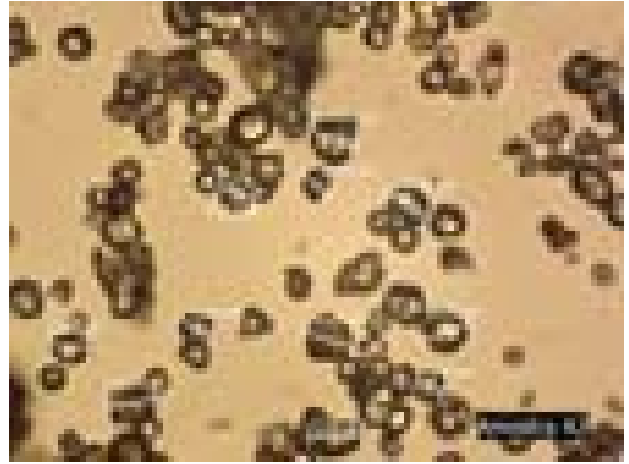


Figura 42. Conteúdo das cápsulas A2, vistas por microscopia óptica (40x)

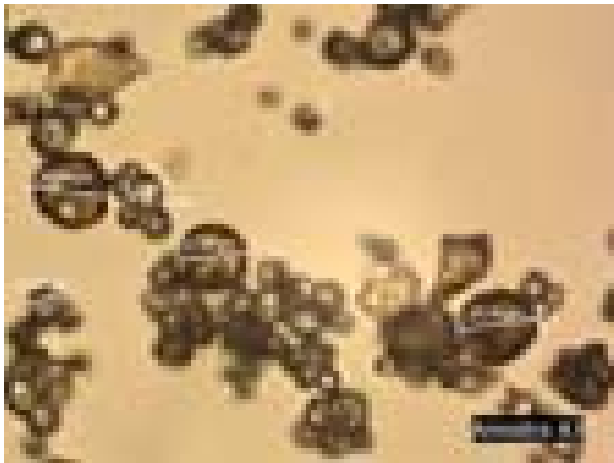


Figura 43. Conteúdo das cápsulas A3, vistas por microscopia óptica (40x)

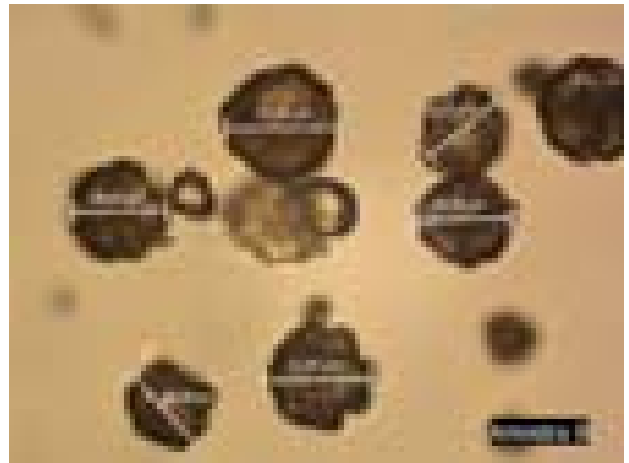


Figura 44. Conteúdo das cápsulas B, vistas por microscopia óptica (40x)

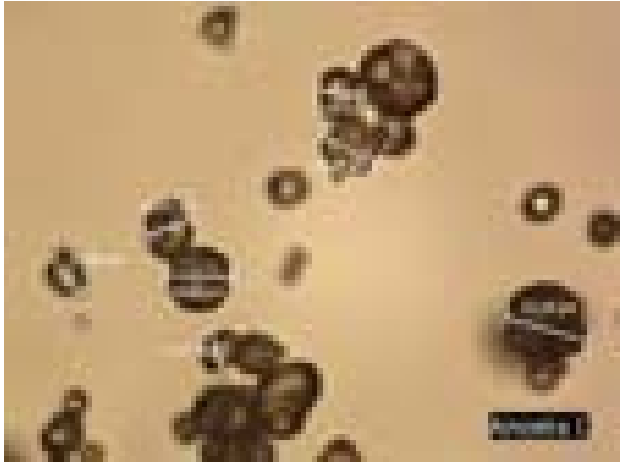


Figura 45. Conteúdo das cápsulas C, vistas por microscopia óptica (40x)

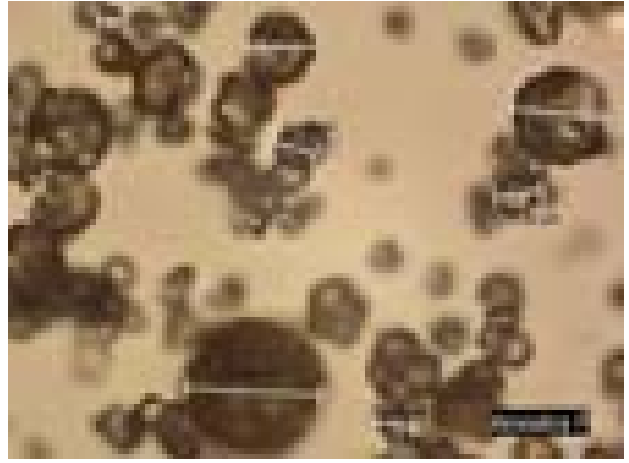


Figura 46. Conteúdo das cápsulas F, vistas por microscopia óptica (40x)

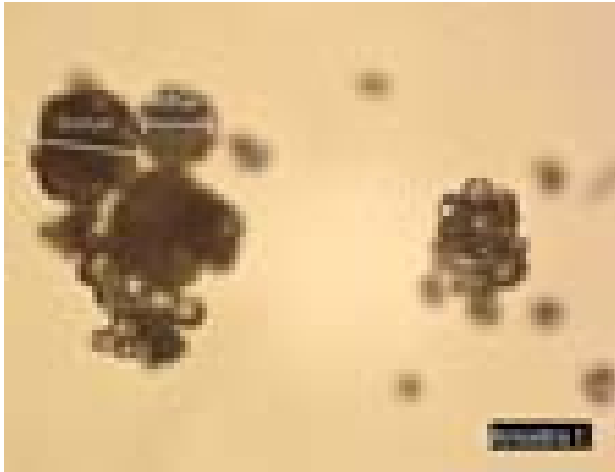


Figura 47. Conteúdo das cápsulas I, vistas por microscopia óptica (40x)

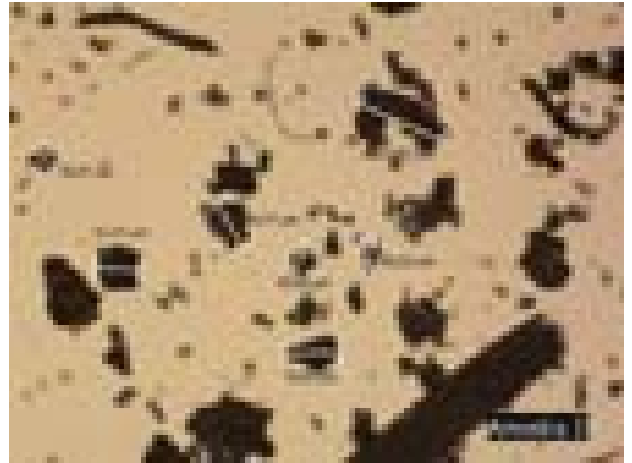


Figura 48. Conteúdo das cápsulas D, vistas por microscopia óptica (10x)

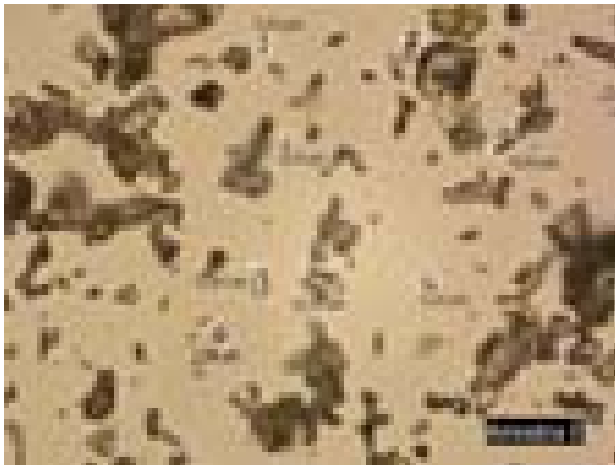


Figura 49. Conteúdo das cápsulas E, vistas por microscopia óptica (40x)

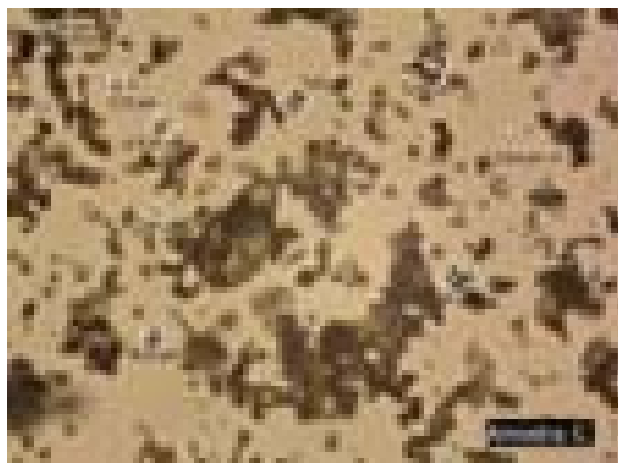


Figura 50. Conteúdo das cápsulas G, vistas por microscopia óptica (40x)

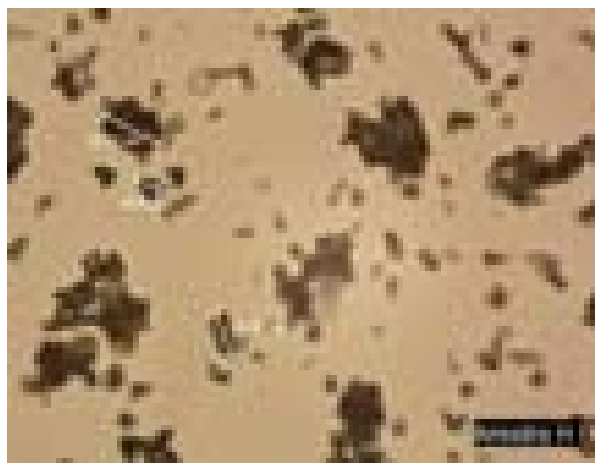


Figura 51. Conteúdo das cápsulas H, vistas por microscopia óptica (40x)

Os ensaios realizados para verificar a qualidade dos fitoterápicos de *M. ilicifolia* foram peso médio, variação de peso, dissolução, perfil cromatográfico e análise sensorial. Apenas 45,45% dos fitoterápicos avaliados estavam em conformidade em todos os testes realizados (Figura 52). Avaliando a porcentagem dos fitoterápicos não conformes em cada ensaio executado (Figura 53), é possível observar que o perfil cromatográfico foi o principal fator responsável pela não conformidade das amostras (36,36%). Neste trabalho foram considerados em desacordo no perfil cromatográfico os fitoterápicos que demonstraram ausência ou baixa concentração de epicatequina, visto que na literatura existem alguns trabalhos que apontam a participação deste marcador na atividade farmacológica (BAGGIO et al., 2007; BAGGIO et al., 2009; CRESTANI et al., 2009; PESSUTO et al., 2009) e sua utilização como marcador em métodos cromatográficos para análise de *M. ilicifolia* (SOUZA et al., 2008; LOPES et al., 2010).

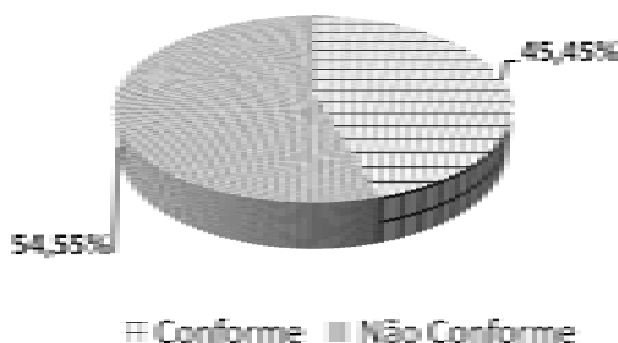


Figura 52. Porcentagem dos fitoterápicos contendo pó ou extrato seco de *M. ilicifolia* conforme e não conforme

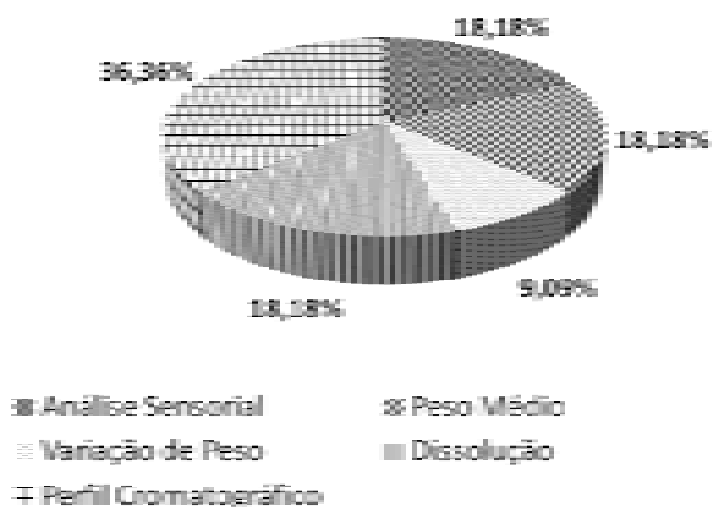


Figura 53. Porcentagem dos fitoterápicos contendo pó ou extrato seco de *M. ilicifolia* não conforme em cada ensaio

Alguns casos de desvio de qualidade de preparações de *M. ilicifolia* já foram relatados na literatura. A avaliação de 18 amostras de espinheira-santa comercializadas no Estado do Paraná revelou que nenhum produto foi aprovado em todos os aspectos avaliados (apresentação do produto, características organolépticas, físico-químicas e microbiológicas) (CHIMIN et al., 2008). NASCIMENTO et al., (2005) após análise de 6 produtos de espinheira-santa comercializadas em Recife-PE, observaram desvio de qualidade nos teores de impurezas e umidade, no conteúdo dos rótulos e nas análises microscópicas e macroscópicas. A avaliação da matéria-prima vegetal de *M. ilicifolia* (pó adquirido de fornecedores distintos) revelou 30% de reprovação, sendo que uma das amostras pertencia ao gênero *Sorocea* (RIBEIRO et al., 2005).

Considerando os resultados obtidos neste trabalho, é evidente a necessidade do controle de qualidade dos fitoterápicos contendo *M. ilicifolia* e de fiscalização efetiva desses produtos a fim de assegurar o efeito terapêutico e a segurança. O ensaio de dissolução revelou ser uma ferramenta essencial para garantir a qualidade dos fitoterápicos contendo *M. ilicifolia*, visto que foi capaz de detectar desvio de qualidade do fitoterápico I o qual estava dentro das especificações nos demais testes.

CONCLUSÃO

O método analítico desenvolvido e validado para quantificação dos marcadores catequina e epicatequina por cromatografia líquida de alta eficiência mostrou-se preciso, linear, seletivo, exato e robusto, segundo os critérios preconizados na RE n°899, 2003.

Os parâmetros que demonstraram melhor capacidade de liberação da catequina e da epicatequina foram: ácido clorídrico 0,1 M (900 mL a $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$), aparato pá e velocidade de agitação de 75 rpm. O método selecionado foi validado encontrando-se em conformidade com os critérios estabelecidos na USP 30.

Visto que a catequina e a epicatequina estão relacionadas com a atividade farmacológica da *Maytenus ilicifolia*, a grande variabilidade encontrada para o teor dos marcadores nos fitoterápicos pode acarretar em prejuízo no efeito terapêutico. Assim, o uso de extratos padronizados poderia contribuir para garantir a homogeneidade química, a qualidade e a eficiência dos fitoterápicos.

No teste de peso médio os fitoterápicos C e D estavam em desacordo com as especificações. O produto D também estava em não conformidade na determinação de variação de peso e no perfil cromatográfico.

No ensaio de dissolução, as amostras C e I não cumpriram com as especificações ($Q < 85\%$ em 45 minutos). Considerando que a amostra I estava não conforme apenas no ensaio de dissolução, pode-se sugerir a importância deste teste na rotina do controle de qualidade de fitoterápicos.

Para as formulações contendo o pó verificou-se rápida liberação dos marcadores no meio de dissolução e elevada eficiência de dissolução.

O método desenvolvido foi capaz de evidenciar diferenças entre lotes de um mesmo fabricante. O fitoterápico A1 revelou liberação mais rápida de seu conteúdo e maior eficiência de dissolução do que os produtos A2 e A3.

Após linearização dos perfis de dissolução, verificou-se que, para os marcadores catequina e epicatequina, o modelo cinético de primeira ordem foi o que melhor se adequou ao perfil de todos os fitoterápicos avaliados.

O tamanho de partícula não foi o fator modulador da dissolução de cápsulas contendo pó ou extrato seco *M. ilicifolia*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDOU, H. M.; HANNA, S.; MUHAMMAD N. Dissolução, In: GENNARO, A. R. *Remington, A Ciência e a Prática da Farmácia*. 20 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 2004.

AGUIAR, G.; FARIA, L. G.; FERRAZ, H. G.; SERRA, C. H. R.; PORTA, V. Avaliação biofarmacotécnica *in vitro* de formas farmacêuticas sólidas contendo doxiciclina. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. v.41, n.4, p. 451-458, 2005.

ALONSO, J.; DESMARCHELIER, C. *Maytenus ilicifolia* Martius (Congorosa). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. v.6, n.1, p. 11-22, 2007.

ALVARENGA, N.; CANELA, N.; GÓMEZ, R.; YALUFF, G.; MALDONADO, M. Leishmanicidal activity of *Maytenus ilicifolia* roots. *Fitoterapia*. v.79, p.381-383, 2008.

ANTONELLI-USHIROBIRA, T. M.; YAMAGUTI, E.; UHEMURA, L. M.; DE MELLO, J. C. P. Controle de qualidade de amostras de *Paullinia cupana* H. B. K. var. *sorbilis* (Mart.) Ducke. *Acta Farm. Bonaerense*. v.23, n.3, p. 383-386, 2004.

AULTON, M. *Delineamento de formas farmacêuticas*. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

BAGGIO, C. H.; FREITAS, C. S.; OTOFUJI, G. M.; CIPRIANI, T. R.; SOUZA, L. M.; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M.; MARQUES, M. C. A. M.; MESIA-VELA, S. Flavonoid-rich fraction of *Maytenus ilicifolia* Mart. ex. Reiss protects the gastric mucosa of rodents through inhibition of both H⁺, K⁺ - ATPase activity and formation of nitric oxide. *Journal of Ethnopharmacology*. v.113, p.433-440, 2007.

BAGGIO, C. H.; FREITAS, C. S.; MAYER, B.; SANTOS, A. C.; TWARDOWSCHY, A.; POTRICH, F. B.; CIPRIANI, T. R.; SOUZA, L. M.; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M.; MARQUES, M. C. A. M.; MESIA-VELA, S. Muscarinic-dependent inhibition of gastric emptying and intestinal motility by fractions of *Maytenus ilicifolia* Mart ex Reissek. *Journal of Ethnopharmacology*. v.123, p. 385-391, 2009.

BARA, M. T. F.; CIRILO, H. N.; OLIVEIRA, V. Determinação de ginkgoflavonóides por cromatografia líquida de alta eficiência em matérias-primas e produtos acabados. *Revista Eletrônica de Farmácia*. v.1, n.1, p.1-7, 2004.

BARA, M. T. F.; RIBEIRO, P. A. M.; ARANTES, M. C. B.; AMORIM, L. L. S. S.; PAULA, J. R. Determinação do teor de princípios ativos em matérias-primas vegetais. *Rev. Brasileira de Farmacognosia*, n. 16(2), p. 211-215, 2006.

BARNES, J. Quality, efficacy and safety of complementary medicines: fashions, facts and the future. Part I. Regulation and quality. *Br. J. Clin. Pharmacol.* v.55, p.226-233, 2003.

BAST, A.; CHANDLER, F.; CHOY, P. C.; DELMULLE, L. M.; GRUENWALD, J.; HALKES, S. B. A.; KELLER, K.; KOEMAN, J. H.; PETERS, P.; PRZYREMBEL, H.; REE, E. M.; RENWICK, A. G.; VERMEER, I. T. M. Botanical health products,

positioning and requirements for effective and safe use. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. v.12, p.195-211, 2002.

BAUER, R. Quality criteria and standardization of phytopharmaceuticals: can acceptable drug standards be achieved? *Drug Information Journal*. v.32, p.101-110, 1998.

BENT, S. Herbal medicine in the United States: Review of efficacy, safety and regulation. *J. Gen. Intern. Med.* v.23, n.6, p.854-859, 2007.

BRASIL, RE nº 899, de 29 de maio de 2003a. Determina a publicação do “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”. Disponível em: http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=15132&mode=PRINT_VERSION.

Acesso em 5 de abril de 2010.

BRASIL, RE nº 901, de 29 de maio de 2003b. Determina a publicação do “Guia para ensaios de dissolução para formas farmacêuticas sólidas orais de liberação imediata (FFSOLI)”. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=1830&mode=PRINTVERSION>.

Acesso em 5 de abril de 2010.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, 2006. Disponível em <http://www.saude.gov.br/bvs>. Acesso em 08 de outubro de 2010.

BRASIL, Portaria GM/MS nº 3.237, de 24 de dezembro de 2007. Aprova as normas de execução e de financiamento da assistência farmacêutica na atenção básica em saúde. Disponível em http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/portaria_3237_atencao_basica.pdf.

Acesso em 08 de outubro de 2010.

BRASIL, Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS), 2009. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENISUS.pdf>. Acesso em 12 de março de 2010.

BRASIL, RDC nº 14, de 31 de março de 2010. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Disponível em: <http://www.brasilsus.com.br/legislacoes/rdc/103507-14.html>. Acesso em 8 de setembro de 2010a.

BRASIL, Posicionamentos da Câmara Técnica de Fitoterápicos (CATEF) quanto ao registro de Medicamentos Fitoterápicos. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/catef/posicionamento_registro_fitoterapicos.pdf. Acesso em 8 de setembro de 2010b.

BRASIL, Consulta de medicamentos contendo *Maytenus ilicifolia*. Disponível em: http://www7.anvisa.gov.br/datavisa/consulta_produto/Medicamentos/frmConsultaMedicamentosPersistir.asp. Acesso em 17 de novembro de 2010c.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. v.33, p.179-189, 2000.

CAMPOS, M. G. Flavonóides, In: CUNHA, A. P. *Farmacognosia e Fitoquímica*. 2 ed. Lisboa: Editora Fundação Calouste Gulbenkian, p. 239-253, 2009.

CAPASSO, R.; IZZO, A. A.; PINTO, L.; BIFULCO, T.; VITOBELLO, C.; MASCOLO, N. Phytotherapy and quality of herbal medicines. *Fitoterapia*. v.71, p. S58-S65, 2000.

CARVALHO, A. C. B.; BALBINO, E. E.; MACIEL, A.; PERFEITO, J. P. S. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. v.18, n.2, p.314-319, 2008.

CHIMIN, A.; LIMA, E. L.; BELTRAME, F. L.; PEREIRA, A. V.; ESMERINO, L. A. Avaliação da qualidade de amostras comerciais de *Maytenus ilicifolia* (espinheira-santa) comercializadas no Estado do Paraná. *Latin American Journal of Pharmacy*. v.27, n.4, p.591-597, 2008.

CIPRIANI, T. R.; MELLINGER, C. G.; SOUZA, L. M.; BAGGIO, C. H.; FREITAS, C. S.; MARQUES, M. C. A.; M. C. A.; GORIN, P. A. J.; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M. Polygalacturonic acid: Another anti-ulcer polysaccharide from the medicinal plant *Maytenus ilicifolia*. *Carbohydrate Polymers*. v.78, p.361-363, 2009.

CIPRIANI, T. R.; MELLINGER, C. G.; SOUZA, L. M.; BAGGIO, C. H.; FREITAS, C. S.; MARQUES, M. C. A.; GORIN, P. A. J.; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M. Acidic heteroxylans from medicinal plants and their anti-ulcer activity. *Carbohydrate*. v.74, p. 274-278, 2008.

CIPRIANI, T. R.; MELLINGER, C. G.; SOUZA, L. M.; BAGGIO, C. H.; FREITAS, C. S.; MARQUES, M. C. A.; M. C. A.; GORIN, P. A. J.; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M. A polysaccharide from a tea (infusion) of *Maytenus ilicifolia* leaves with anti-ulcer protective effects. *J. Nat. Prod*. v.69, p.1018-1021, 2006.

COELHO, R. G.; DI STASI, L. C.; VILEGAS, W. Chemical constituents from the infusion of *Zollernia ilicifolia* Vog. and comparison with *Maytenus* species. *Naturforsch*, v.58c, p.47-52, 2003.

CORDEIRO, D. S.; OLIVEIRA, W. P. Technical aspects of the production of dried extract of *Maytenus ilicifolia* leaves by jet spouted bed drying. *International Journal of Pharmaceutics*. v.299, p. 115-126, 2005.

CORDEIRO, P. J. M.; VILEGAS, J. H. Y.; LANÇAS, F. M. HRGC-MS analysis of terpenoids from *Maytenus ilicifolia* and *Maytenus aquifolium* ("espinheira-santa"). *J. Braz. Chem. Soc*. v.10, n.6, p.523-526, 1999.

COSTA, A.R.T.; ALVES, S.F.; CONCEIÇÃO, E.C., GARROTE, C.F.D.; PAULA, J.R.; BARA, M.T.F. Dissolution test of herbal medicines containing *Passiflora* sp. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 2010 (no prelo)

COSTA, P.; LOBO, J. M. S. Modeling and comparison of dissolution profiles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. v.13, p. 123-133, 2001.

COULAUD-CUNHA, S.; OLIVEIRA, R. S.; WAISSMANN, W. Venda livre de *Sorocea bomplandii* Bailon como espinheira-santa no município de Rio de Janeiro-RJ. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. v.14, p.51-53, 2005.

CRESTANI, S.; RATTMANN, Y. D.; CIPRIANI, T. R.; SOUZA, L. M.; IACOMINI, M.; KASSUYA, C. A. L.; MARQUES, M. C. A.; SANTOS, E. S. A potent and nitric oxide-dependent hypotensive effect induced in rats by semi-purified fractions from *Maytenus ilicifolia*. *Vascular Pharmacology*. v.51, p. 57-63, 2009.

DASH, S.; MURTHY, P. N.; NATH, L.; CHOWDHURY, P. Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research*. v.67, n.3, p.217-223, 2010.

DUARTE, M. R.; DEBUR, M. C. Stem and leaf morphoanatomy of *Maytenus ilicifolia*. *Fitoterapia*. v.76, p.41-49, 2005.

EL-HADY, D. A.; EL-MAALI, N. A. Determination of catechin isomers in human plasma subsequent to green tea ingestion using chiral capillary electrophoresis with a high-sensitivity cell. *Talanta*, v. 76, n.1, p. 138-145, 2008.

EL-YAZIGI, A. Desintegration: dissolution analysis of percent dissolved time data. *J. Pharm. Sci.* v.70, n.5, p.535-537, 1981.

ERNST, E. Risks of herbal medicines products. *Pharmacoepidemiology and drug safety*. v.13, p. 767-771, 2004.

FARIAS, M. R. Avaliação da qualidade de matérias primas-vegetais, In SIMÕES et al. *Farmacognosia da planta ao medicamento*. 6 ed. Porto Alegre: Editora UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, p.266-274, 2007.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA IV ed. Brasil, 1988.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. IV ed. Espinheira-Santa *Mayteni folium*. Brasil, 2002.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. V ed. Espinheira-Santa *Mayteni folium*. Brasil, 2010.

FDA – FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, CENTER FOR DRUG EVALUATION AND RESEARCH. Reviewer Guidance Validation of chromatographic methods, 1994. www.fda.gov. Acesso em 13 de abril de 2010.

FEDERAÇÃO BRASILEIRA DAS REDES ASSOCIATIVISTAS DE FARMÁCIAS – FEBRAFAR. Medley entra no mercado de medicamentos fitoterápicos. Disponível em: [HTTP://www.febrafar.com.br/index.php?cat_id=5&pag_id=5571](http://www.febrafar.com.br/index.php?cat_id=5&pag_id=5571). Acesso em: 01 de outubro de 2010.

FERNÁNDEZ, P. L.; MARTÍN, M. J.; GONZÁLES, A. G.; PABLOS, F. HPLC determination of catechins and caffeine in tea. Differentiation of green, black and instand teas. *Analyst*. v.125, p.421-425, 2000.

FERREIRA, P. M.; OLIVEIRA, C. N.; OLIVEIRA, A. B.; LOPES, M. J.; ALZAMORA, F.; VIEIRA, A. R. A lyophilized aqueous extract of *Maytenus ilicifolia* leaves inhibits

histamine-mediated acid secretion in isolated frog gastric mucosa. *Planta*. v.219, p.319-324, 2004.

FISHER, D. C. H. Controle de Fitoterápicos, In: GIL, E. S. *Controle Físico-Químico de Qualidade de Medicamentos*. 1 ed. Campo Grande: Editora UNIDERP, p. 245-277, 2005.

HALSTEAD, C. W.; LEE, S.; KHOO, C. S.; HENNEL, J. R.; BENSOUSSAN, A. Validation of a method for the simultaneous determination of four schisandra lignans in the raw herb and commercial dried aqueous extracts of *Schisandra chinensis* (Wu Wei Zi) by RP-LC with DAD. *Journal of Pharmaceutical and Biopharmaceutical Analysis*. v.45, p. 30-37, 2007.

ITOKAWA, H.; SHIROTA, O.; MORITA, H.; TAKEYA, K. Cangorins F-J, five additional oligo nicotinated sesquiterpene polyesters from *Maytenus ilicifolia*. *Journal of Natural Products*. v.57, n.4, p.460-470, 1994.

JORGE, R. M.; LEITE, J. P. V.; OLIVEIRA, A. B.; TAGLIATI, C. A. Evaluation of antinociceptive, anti-inflammatory and antiulcerogenic activities of *Maytenus ilicifolia*. *Journal of Ethnopharmacology*. v.94, p. 93-100, 2004.

KHAN, K. A.; RHODES, C.T. The concept of dissolution efficiency. *J. Pharm. Pharmacol.* v.27, p.48-49, 1975.

KLEIN, S.; WUNDERLICH, M.; DRESSMAN, J.; STIPPLER, E. Development of Dissolution Tests on the Basis of Gastrointestinal Physiology, In: *Pharmaceutical Dissolution Testing*. 1 ed. New York: Ed. Taylor & Francis Group, p.193-225, 2005.

KOESTER, L. S.; ORTEGA, G. G.; MAYORGA, P.; BASSANI, V. L. Mathematical evaluation of in vitro release profiles of hidroxypropylmethylcellulose matrix tablets containing carbamazepine associated to β -cyclodextrin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. v.58, p.177-179, 2004.

KOLL, K.; BLATTER, A.; REICH, E.; VEIT, M. Validation of standardized high-performance thin-layer chromatographic methods for quality control and stability testing of herbals. *Journal of AOAC International*. v.86, n.5, p.909-915, 2003.

KRATZ, J. M.; TERRAZAS, C. B.; MOTTA, M. J.; REGINATTO, F. H.; SIMÕES, C. M. O. Determinação da composição química e dos perfis de dissolução *in vitro* de medicamentos à base de *Ginkgo biloba* disponíveis no mercado brasileiro. *Latin American Journal Pharmacy*. v.27, n.5, p.674-680, 2008.

KRESSMANN, S.; BIBER, A.; WONNEMANN, M.; SCHUG, B.; BLUME, H. H.; MULLER, W. E. Influence of pharmaceutical quality on the bioavailability of active components from *Ginkgo biloba* preparations. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. v.54, p.1507-1514, 2002.

LABAUNE, J. P. *Farmacocinética*. São Paulo: Editora Andrei LTDA, 1993.

LANÇAS, F. M. *Validação de Métodos Cromatográficos*. São Carlos : Editora RiMa, 2004.

LEITE, J. P. V.; RASTRELLI, L.; ROMUSSI, G.; OLIVEIRA, A. B.; VILEGAS, J. H. Y.; VILEGAS, W.; PIZZA, C. Isolation and HPLC quantitative analysis of flavonoid glycosides from Brazilian beverages (*Maytenus ilicifolia* and *Maytenus aquifolium*). *J. Agric. Food Chem.* v.49, p. 3796-3801, 2001.

LOPES, G. C.; BLAINSKI, A.; SANTOS, P. V. P.; DICIAULA, M. C.; MELLO, J. C. P. Development and validation of an HPLC method for the determination of epicatechin in *Maytenus ilicifolia* (Schrad.) Planch., Celastraceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 2010 (no prelo).

MAHLE, F.; GOELZER, F.; ADRIANO, J.; FELIPPE, M.; VIER, N.; CARLI, R. B. G.; ROSA, T.; COUTO, A. G.; SILVA, R. M. L. Avaliação do perfil de dissolução de comprimidos de hidroclorotiazida comercializados no Brasil. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada.* v.28, n.3, p.265-271, 2007.

MANADAS, R.; PINA, M. E.; VEIGA, F. A dissolução *in vitro* na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas.* v.38, n.4, p.375-399, 2002.

MARCOLONGO, R. *Dissolução de medicamentos: fundamentos, aplicações, aspectos regulatórios e perspectivas na área farmacêutica.* 2003. 127 p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2003.

MARTINS, E. L. P.; BRANDÃO, M. G. L. Qualidade de amostras comerciais preparadas com *Aesculus hippocastanum* L. (castanha-da-Índia). *Revista Brasileira de Farmacognosia.* v.16, n.2, p.224-229, 2006.

MELO, J. G.; NASCIMENTO, V. T.; AMORIM, E. L. C.; LIMA, C. S. A.; ALBUQUERQUE, U. P. Avaliação da qualidade de amostras comerciais de boldo (*Peumus boldus* Molina), pata-de-vaca (*Bauhinia spp.*) e ginko (*Ginkgo biloba* L.). *Revista Brasileira de Farmacognosia.* v.14, n.2, p.111-120, 2004.

MIGLIATO, K. F.; MOREIRA, R. R. D.; MELLO, J. P. C.; SACRAMENTO, L. V. S.; CORRÊA, M. A.; SALGADO, H. R. N. Controle de qualidade do fruto de *Syzygium cumini* L. Skeels. *Revista Brasileira de Farmacognosia.* v.17, n.1, p.94-101, 2007.

MONTANARI, T.; CARVALHO, J. E.; DOLDER, H. Effect of *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex. Reiss on spermatogenesis. *Contraception.* v.57, p.335-339, 1998.

MONTANARI, T.; BEVILACQUA, E. Effect of *Maytenus ilicifolia* Mart. On pregnant mice. *Contraception.* v.65, 171-175, 2002.

MULYE, N. V.; TURCO, S. J. A simple model based on first order kinetics to explain release of highly water soluble drugs from porous dicalcium phosphate dihydrate matrices. *Drug Development and Industrial Pharmacy.* v. 21, n.8, p. 943-953, 1995.

NASCIMENTO, V. T.; LACERDA, E. U.; MELO, J. G.; LIMA, C. S. A.; AMORIM, E. L.C.; ALBUQUERQUE, U. P. Controle de qualidade de produtos à base de plantas medicinais comercializadas na cidade do Recife-PE: erva-doce (*Pimpinella anisum* L.), quebra-pedra (*Phyllanthus spp.*), espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart.) e camomila (*Matricaria recutita* L.). *Rev. Bras. PL. Med.* v.7, n.3, p.56-64, 2005.

OLIVEIRA, M. A. C.; ALBUQUERQUE, M. M.; XAVIER, H. S.; STRATTMANN, R. R.; GRANGEIRO JÚNIOR, S.; QUEIROZ, A. T. Desenvolvimento e validação de metodologia para quantificação de alcalóides totais como berberina em fitoterápicos contendo *Berberis vulgaris* L. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.16, n.3, p.357-364, 2006.

OLIVEIRA, O. W.; PETROVICK, P. R. Secagem por aspersão (*spray drying*) de extratos vegetais: bases e aplicações. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. v.20, n.4, p.641-650, 2010.

PESSUTO, M. B.; COSTA, I. C.; SOUZA, A. B.; NICOLI, F. M.; MELLO, J. C. P. Atividade antioxidante de extratos e taninos condensados das folhas de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. *Química Nova*. v.32, n.2, p. 412-416, 2009.

QUEIROGA, C. M.; SILVA, G. F.; DIAS, P. C.; POSSENTI, A.; CARVALHO, J. E. Evaluation of the antiulcerogenic activity of friedelan-3 β -ol and friedelin isolated from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae). *Journal of Ethnopharmacology*. v.72, p. 465-468, 2000.

RATTMANN, Y. D.; CIPRIANI, T. R.; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M.; RIECK, L.; MARQUES, M. C. A.; SANTOS, J. E. S. Nitric oxide-dependent vasorelaxation induced by extractive solutions and fractions of *Maytenus ilicifolia* Mart ex Reissek (Celastraceae) leaves. *Journal of Ethnopharmacology*. v.104, p.328-335, 2006.

RIBEIRO, P. A. M.; ARANTES, M. C. B.; SANDOVAL JR, J. C. S.; AMORIM, L. L. R. S. S.; PAULA, J. R.; BARA, M. T. F. Controle de qualidade físico-químico de matérias-primas vegetais. *Revista Eletrônica de Farmácia*. v.2, n.2, p.176-179, 2005.

RODRIGUES, P. O.; CARDOSO, T. M.; SILVA, M. A. S.; MATOS, J. R. Caracterização termoanalítica e estudo do perfil de dissolução de comprimidos contendo metronidazol. *Latin American Journal of Pharmacy*. v. 27, n.4, p. 528-534, 2008.

ROUSSEAU, C. G.; SCHACHTER, H. Regulatory issues concerning the safety, efficacy and quality of herbal remedies. *Birth Defects Research (Part B)*. v.68, p. 505-510, 2003.

SANT'ANA, P. J. P.; ASSAD, A. L. D. Programa de pesquisa em produtos naturais: a experiência da CEME. *Química Nova*. v.27, n.3, p.508-512, 2004.

SERRA, C. H. R.; STORPIRTIS, S. Comparação de perfis de dissolução da cefalexina através de estudos de cinética e eficiência de dissolução (ED%). *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. v.43, n.1, p.79-88, 2007.

SILVA, I. D. D.; ARAGÃO, C. F. S. Avaliação de parâmetros de extração de *Cinchona* Vahl por métodos farmacopéicos e não farmacopéicos. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. v.19, n.3, p.776-780, 2009.

SITTICHAJ, N.; KARABESRI, S.; SUTHISON, E.; TENGAMNUAY, P. An approach to developing dissolution standards for turmeric capsules in basket rotating method. *Thai Journal of Pharmaceutical sciences*, v. 31, p. 8390, 2007.

SKOUG, J. W.; HALSTEAD, G. W.; THEIS, D. L.; FREEMAN, J. E.; FAGAM, D. T.; ROHRS, B. R. Roteiro para desenvolvimento e validação do teste de dissolução em formas farmacêuticas sólidas para uso oral. *Pharmaceutical Technology*. p.34-43, 1997.

SOUSA, S. A.; PASCOA, H.; CONCEIÇÃO, E.C.; ALVES, S.F.; DINIZ, D.G.A.; PAULA, J.R.; BARA, M.T.F. Dissolution test of herbal medicines containing *Paullinia cupana*: validation of methods for quantification and assessment of dissolution. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2010 (no prelo).

SOUZA, T. P.; BASSANI, V. L.; ORTEGA, G. G.; COSTA, T. C. T. D.; PETROVICK, P. R. Influence of adjuvants on the dissolution profile of tablets containing high doses of spray-dried extract of *Maytenus ilicifolia*. *Pharmazie*, v.56, p. 730-733, 2001.

SOUZA, L. M.; CIPRIANI, T. R.; IACOMINI, M.; GORIN, P. J.; SASSAKI, G. L.. HPLC/ESI-MS and NMR analysis of flavonoids and tannins. In bioactive extract from leaves of *Maytenus ilicifolia*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 47, p.59-67, 2008.

SOUZA-MOREIRA, T. M.; SALGADO, H. R. N.; PIETRO, R. C. L. R. O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. v.20, n.3, p.435-440, 2010.

SRINIVASAN, V. S. Bioavailability of Ingredients in Dietary Supplements: A Practical Approach to the In Vitro Demonstration of the Availability of Ingredients in Dietary Supplements, In: *Pharmaceutical Dissolution Testing*. 1 ed. New York: Ed. Taylor & Francis Group, p.407-419, 2005.

TAGLIOLI, V.; BILIA, A. R.; GHIARA, C.; MAZZI, G.; MERCATI, V.; VINCIERI, F. F. Evaluation of the dissolution behaviour of some commercial herbal drugs and their preparations. *Pharmazie*. v.56, p.868-870, 2001.

TIBERTI, L. A.; YARIWAKE, J. H.; NDJOKO, K.; HOSTETTMANN, K. Identification of flavonols in leaves of *Maytenus ilicifolia* and *M. aquifolium* (Celastraceae) by LC/UV/MS analysis. *Journal of Chromatography B*. v.846, p.378-384, 2007.

TOZER, T. N.; ROWLAND, M. *Introdução à Farmacocinética e à Farmacodinâmica*. Porto Alegre: Editora Artmed, 2009

UNITED STATES PHARMACOPEIA, 30. ed. (USP 30). <1092> *The dissolution procedure: Development and Validation*. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 2007a.

UNITED STATES PHARMACOPEIA, 30. ed. (USP 30). <2040> *Desintegration and Dissolution of Dietary Supplements*. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 2007b.

VARELAS, C. G.; DIXON, D. G.; STEINER, C. A. Zero order release from biphasic polymer hydrogels. *Journal of Controlled Release*. v.34, p.185-192, 1995.

WAGNER, J. G. Interpretation of percent dissolved-time plots derived from in vitro testing of conventional tablets and capsules. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. v. 58, n.10, p. 1253-1257, 1969.

WATSON, D. G. *Pharmaceutical Analysis*. Londres: Editora Churchill livingstone, 1999.

XAVIER, H. S.; D'ANGELO, L. C. A. Perfil cromatográfico dos componentes polifenólicos de *Maytenus ilicifolia* Mart. (Celastraceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*. v.1, p. 20-28, 1995.

XIE, Y.; JIANG, Z. H.; ZHOU, H.; CAI, X.; WONG, Y. F.; LIU, Z. Q.; BIAN, Z. X.; XU, H. X.; LIU, L. Combinative method using HPLC quantitative and qualitative analysis for quality consistency assessment of a herbal medicinal preparation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. v.43, p. 204-212, 2007.

YUKSEL, N.; KANIK, A. E.; BAYKARA, T. Comparison of in vitro dissolution profiles by ANOVA-based, model-dependent and –independent methods. *International Journal Pharmaceutics*. v. 209, p. 57-67, 2000.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Flanóides, In: SIMÕES et al. *Farmacognosia da planta ao medicamento*. 6 ed. Porto Alegre: Editora UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, p.600, 2007.

6. APÊNDICE

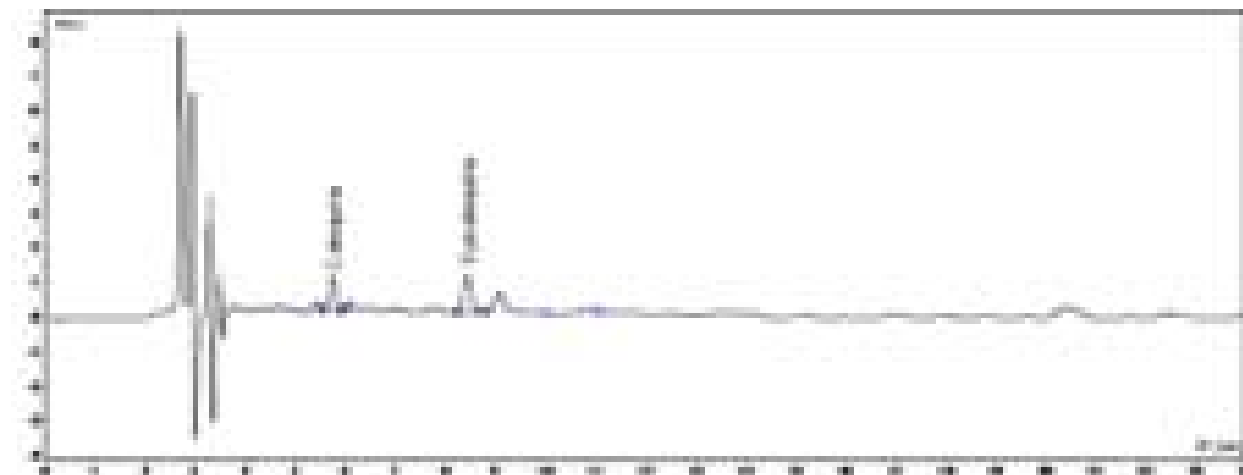


Figura 1. Cromatograma do conteúdo do fitoterápico A. Condições cromatográficas: fase móvel composta por água:acetonitrila:metanol:ácido acético (84:10:5:1), em eluição isocrática, fluxo de 1 mL/min, coluna Varian C18 250 x 4,6 mm, 5 µm e detector a 280 nm.

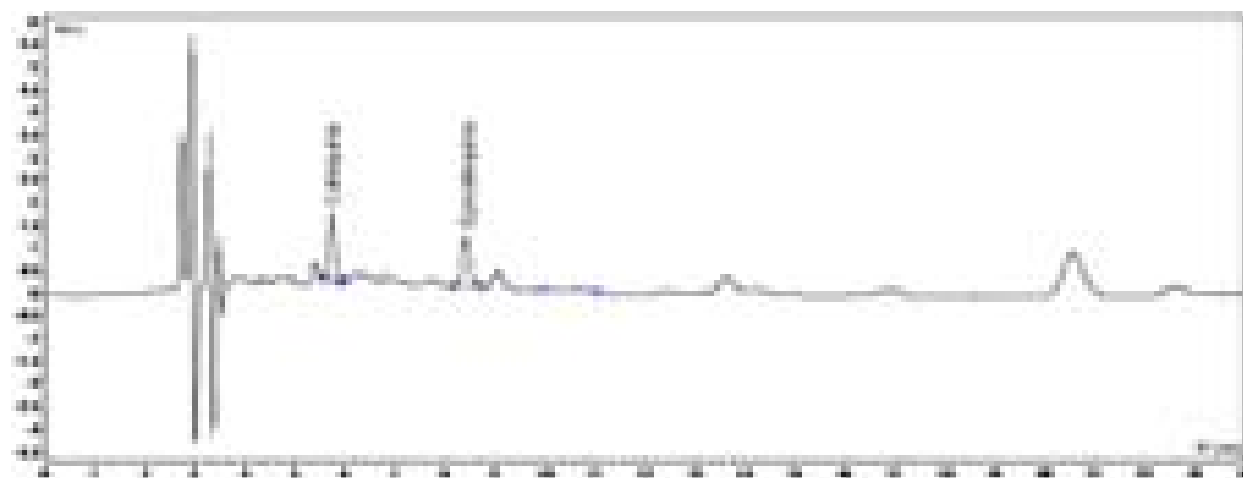


Figura 2. Cromatograma do conteúdo do fitoterápico B. Condições cromatográficas: fase móvel composta por água:acetonitrila:metanol:ácido acético (84:10:5:1), em eluição isocrática, fluxo de 1 mL/min, coluna Varian C18 250 x 4,6 mm, 5 µm e detector a 280 nm.

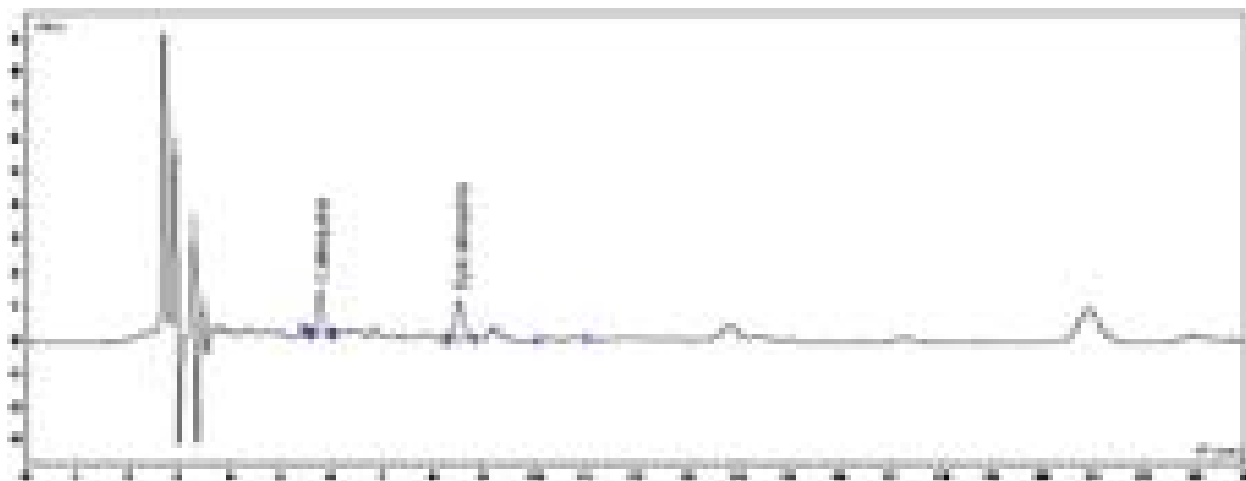


Figura 3. Cromatograma do conteúdo do fitoterápico C. Condições cromatográficas: fase móvel composta por água:acetonitrila:metanol:ácido acético (84:10:5:1), em eluição isocrática, fluxo de 1 mL/min, coluna Varian C18 250 x 4,6 mm, 5 μ m e detector a 280 nm.

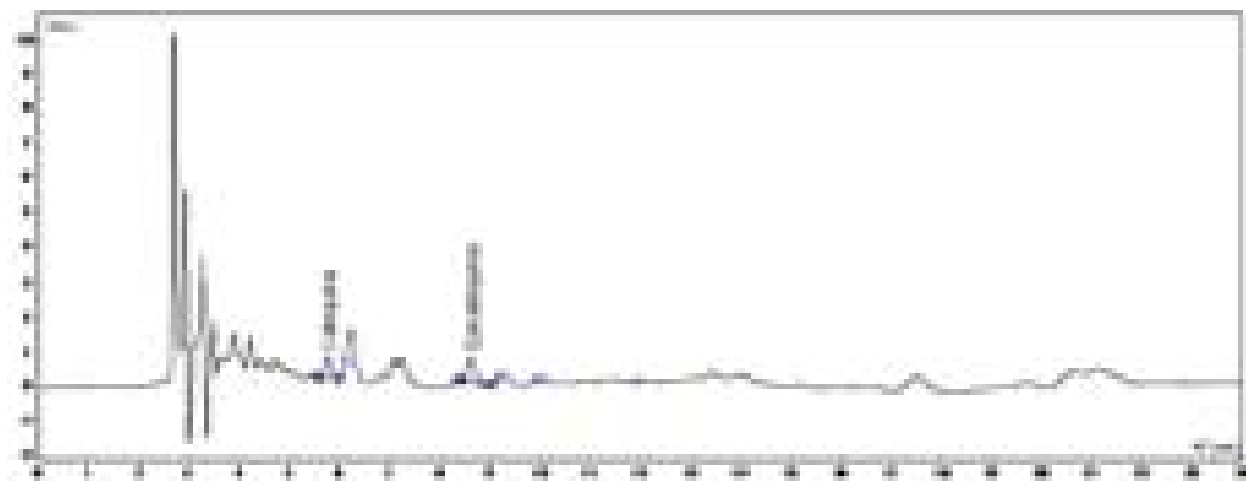


Figura 4. Cromatograma do conteúdo do fitoterápico E. Condições cromatográficas: fase móvel composta por água:acetonitrila:metanol:ácido acético (84:10:5:1), em eluição isocrática, fluxo de 1 mL/min, coluna Varian C18 250 x 4,6 mm, 5 μ m e detector a 280 nm.

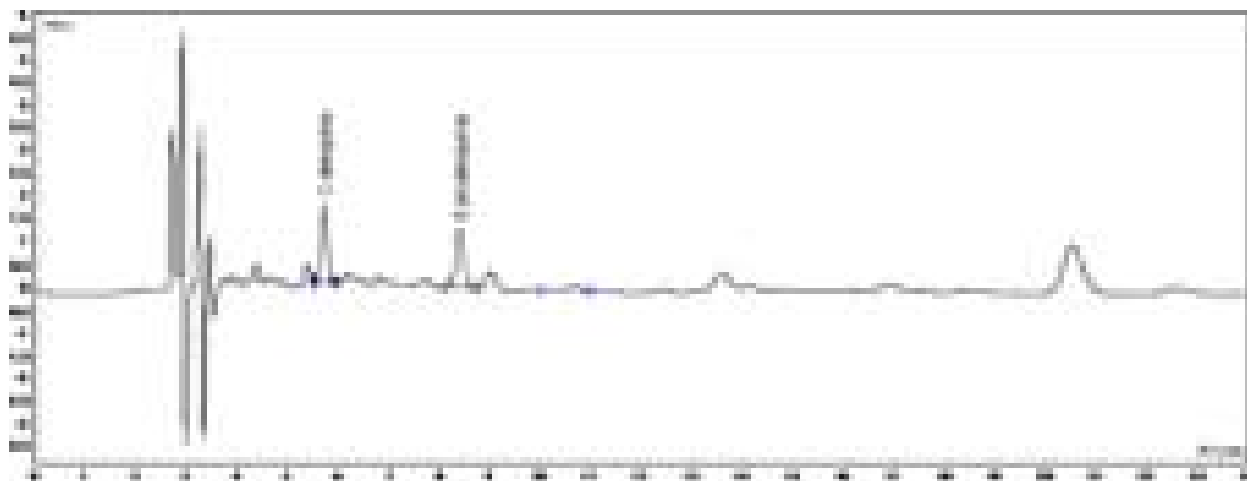


Figura 5. Cromatograma do conteúdo do fitoterápico F. Condições cromatográficas: fase móvel composta por água:acetonitrila:metanol:ácido acético (84:10:5:1), em eluição isocrática, fluxo de 1 mL/min, coluna Varian C18 250 x 4,6 mm, 5 μ m e detector a 280 nm.

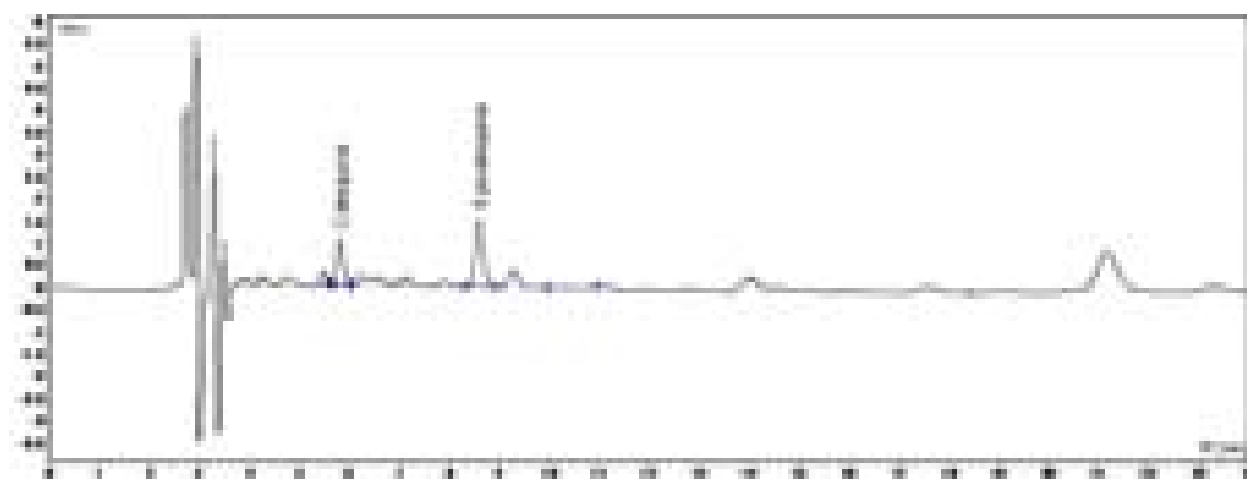


Figura 6. Cromatograma do conteúdo do fitoterápico I. Condições cromatográficas: fase móvel composta por água:acetonitrila:metanol:ácido acético (84:10:5:1), em eluição isocrática, fluxo de 1 mL/min, coluna Varian C18 250 x 4,6 mm, 5 μ m e detector a 280 nm.

Tabela 1. Coeficiente angular, coeficiente linear, média e desvio padrão das curvas de calibração, limite de detecção e limite de quantificação da catequina

	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Média	DP	LD	LIQ
a	10,162	10,102	10,473	10,246	0,199	0,03	0,1
b	0,1407	0,1793	0,0099	0,110	0,089		

Tabela 2. Coeficiente angular, coeficiente linear, média e desvio padrão das curvas de calibração, limite de detecção e limite de quantificação da epicatequina

	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Média	DP	LD	LIQ
a	10,114	10,976	11,036	10,709	0,516	0,05	0,2
b	0,2416	-0,0746	-0,0632	0,035	0,179		

Tabela 3. Quantidade dissolvida de catequina nos tempos de 0 a 60 minutos, nas condições preliminares do teste de dissolução

Tempo (min)	% Dissolvida de Catequina			
	Condição			
	1 (500 ml_ 50 rpm)	2 (500 ml_ 75 rpm)	3 (900 ml_ 50 rpm)	4 (900 ml_ 75 rpm)
0	0	0	0	0
5	10,58	18,96	5,68	17,53
10	33,60	56,92	29,71	59,16
15	49,01	72,42	47,59	83,37
30	57,41	77,86	61,94	90,35
60	63,13	80,89	68,96	93,45
75	92,70	89,91	97,96	97,79

Tabela 4. Quantidade dissolvida de epicatequina nos tempos de 0 a 60 minutos, nas condições preliminares do teste de dissolução

Tempo (min)	% Dissolvida de Epicatequina			
	Condição			
	1 (500 ml_ 50 rpm)	2 (500 ml_ 75 rpm)	3 (900 ml_ 50 rpm)	4 (900 ml_ 75 rpm)
0	0	0	0	0
5	9,09	19,07	2,56	14,54
10	34,92	60,22	24,61	55,23
15	48,14	77,86	43,41	81,17
30	58,50	88,33	60,27	91,46
60	65,76	93,15	69,58	94,24

Tabela 5. Porcentagem de catequina dissolvida no ensaio de dissolução dos fitoterápicos A1, A2, A3, B, C, D, E, F, G, H e I

TEMPO (min)	% CATEQUINA DISSOLVIDA										
	A1	A2	A3	B	C	D	E	F	G	H	I
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	22,63	26,06	14,80	13,06	11,80	74,81	88,41	13,44	88,24	86,31	21,85
12	69,56	42,98	31,64	22,33	25,58	87,02	93,43	33,70	95,86	94,15	36,70
20	90,91	67,27	61,26	40,47	47,42	89,25	94,44	61,99	96,82	94,13	53,69
30	94,46	85,31	85,54	66,58	67,62	91,26	98,08	83,75	97,67	94,55	63,30
45	96,48	91,49	90,64	91,53	79,40	94,17	101,69	94,06	97,76	94,96	67,83
60	97,94	95,47	92,91	100,40	87,48	95,29	106,95	95,53	97,87	95,80	73,43

Tabela 6. Porcentagem de epicatequina dissolvida no ensaio de dissolução dos fitoterápicos A1, A2, A3, B, C, D, E, F, G, H e I

TEMPO (min)	% EPICATEQUINA DISSOLVIDA										
	A1	A2	A3	B	C	D	E	F	G	H	I
0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0
7	20,69	23,25	15,47	12,20	9,91	-	84,81	11,07	91,59	88,01	19,12
12	67,84	45,80	31,59	22,28	25,16	-	100,20	35,75	101,93	93,83	35,29
20	87,25	71,29	60,46	44,79	49,58	-	99,86	66,19	106,90	100,84	51,64
30	98,60	92,94	87,80	69,38	71,36	-	105,02	93,74	105,48	99,28	60,03
45	99,40	98,77	96,02	98,09	83,18	-	105,58	103,18	105,13	105,01	67,79
60	102,75	104,28	97,09	106,80	92,82	-	105,58	106,56	105,13	105,86	73,94

Tabela 7. Média (n=6) da eficiência de dissolução de cápsulas contendo espinheira-santa, avaliada para os marcadores catequina e epicatequina, com seus respectivos valores de desvio padrão

AMOSTRAS	ED CATEQUINA (%)		ED EPICATEQUINA (%)	
	MÉDIA	DP	MÉDIA	DP
A1	80,53	2,724	78	3,081
A2	72,71	2,931	71,54	3,336
A3	70,55	2,063	69,91	2,893
B	58,17	10,679	57,98	9,956
C	63,59	6,282	62,79	6,752
D	88,18	1,864	-	-
E	86,23	5,933	89,45	3,948
F	69,92	4,429	68,61	3,957
G	92,32	0,543	92,72	1,875
H	91,6	1,486	89,9	5,95
I	71,41	5,987	68,75	7,351