

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

FACULDADE DE FARMÁCIA

SANDRA ALVES DE SOUSA

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO DE
CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA E ENSAIO DE
DISSOLUÇÃO PARA AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE
FITOTERÁPICOS CONTENDO *Paullinia cupana* Kunth.**

Goiânia

2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE FARMÁCIA

SANDRA ALVES DE SOUSA

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO POR
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA E DISSOLUÇÃO
PARA AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE FITOTERÁPICOS
CONTENDO *Paullinia cupana* Kunth.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, como um dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Fármacos e Medicamentos.

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Teresa Freitas Bara

Goiânia

2009

Sandra Alves de Sousa

APLICAÇÃO DO ENSAIO DE DISSOLUÇÃO NA AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE
FITOTERÁPICOS À BASE DE *Paullinia cupana* Kunth.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, como um dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovado em: ____ de ____ de 2009.

Banca Examinadora

Prof^a. Dra Maria Teresa Freitas Bara – Orientador/Presidente

Faculdade de Farmácia – UFG

Prof. Dr. João Carlos Pallazo de Mello – 1º Examinador

Universidade Estadual de Maringá – UEM

Prof^a. Dra Dione Marçal Lima – 2º Examinador

Faculdade de Farmácia – UFG

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por estar comigo em todos os momentos, principalmente nos mais difíceis, me dando força e sabedoria para a conquista de mais esta vitória.

Aos meus queridos pais, Elvira e Vandair, que sempre me incentivaram a estudar, adquirir novos conhecimentos e a prosseguir nesta jornada fossem quais fossem os obstáculos a serem ultrapassados.

Ao meu esposo, Deividy, pelo apoio e compreensão por tantos finais de semana sacrificados no laboratório, e pela ajuda com impressões e copias do trabalho.

Ao meu irmão, Elder, companheiro em todos os momentos.

A minha orientadora, Prof. Dr. Maria Teresa Freitas Bara, que com sua extrema sabedoria, paciência e amizade, me mostrou o significado e a beleza da pesquisa científica, fazendo com que a cada dia passado o meu interesse se tornasse maior. Sem seus conhecimentos e sua forma de transmiti-los este trabalho não seria possível.

A professora, Dra. Danielle, pela disposição e orientação quanto ao uso do HPLC, que permitiu dar continuidade ao trabalho.

Aos professores Dr. Edemilson e Dr. Realino pelas considerações e palavras de incentivo e apoio.

Ao LCQM, por disponibilizar os equipamentos e principalmente as farmacêuticas Suzana e Ezequiane, que me auxiliaram no desenvolvimento dos experimentos.

A minha chefe e amiga, farmacêutica Antonia de Fatima, por compreender as dificuldades e as ausências no trabalho.

As minhas amigas, Ane e Tatiana, pela disposição em me ajudar no que fosse necessário.

Ao colegas do mestrado, pelos bons momentos e trocas de experiência que me proporcionaram.

A todos os professores do programa de pós-graduação em ciências farmacêuticas, que de uma forma ou de outra, contribuíram para o enriquecimento do trabalho.

A todos os amigos e familiares, pelo apoio compreensão e carinho dedicados a mim.

“Não confunda jamais conhecimento com sabedoria.
Um o ajuda a ganhar a vida; o outro a construir uma vida”.

Sandra Carey

RESUMO

Os fitoterápicos são medicamentos obtidos empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais. O guaraná (*Paullinia cupana* Kunth.) é utilizado como revigorante e estimulante devido à presença, em suas sementes, de metilxantinas, principalmente cafeína e em menor quantidade teofilina e teobromina, além de taninos condensados. O teste de dissolução é um dos ensaios empregados na avaliação da qualidade destes medicamentos e por meio deste pode-se avaliar a liberação do princípio ativo a partir de uma forma farmacêutica sólida em um meio que simula o local de sua absorção. Este trabalho visou avaliar o comportamento de dissolução de cápsulas e comprimidos contendo guaraná. Neste estudo foram investigados inicialmente, métodos espectrofotométricos e cromatográficos para a quantificação de metilxantinas e taninos nas formas farmacêuticas e no meio de dissolução. Os resultados obtidos por espectrofotometria demonstraram ausência de especificidade deste método nas condições experimentais empregadas para quantificação de metilxantinas. Na análise dos taninos, o procedimento é inviável para uma rotina laboratorial por ser demorado e trabalhoso. O método por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência permitiu a quantificação dos marcadores simultaneamente, com precisão, exatidão, seletividade e robustez. O ensaio de dissolução utilizando pá como aparato, $37^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$, velocidade de 75 rpm em 900 mL de meio HCl 0,1 M pH 1,2 forneceu os melhores resultados, foi validado e utilizado na avaliação do comportamento de dissolução de cápsulas e comprimidos a base de guaraná. Foi verificado que todos os marcadores quantificados pelo método encontraram-se dissolvidos entre 75% e 80%, no tempo de 10 minutos. Uma das cápsulas analisadas não dissolveu em nenhuma das condições empregadas. Para o comprimido também foi observada uma não conformidade, a não identificação de catequina e epicatequina no produto acabado, fator preocupante, visto que os taninos condensados são marcadores que devem estar presentes no pó de guaraná. Considerando o crescente uso dos fitoterápicos fica clara a necessidade de definição de parâmetros de qualidade que assegurem a sua ação terapêutica e nesse sentido o estudo de dissolução constitui uma ferramenta essencial na garantia de qualidade dos fitoterápicos.

PALAVRAS-CHAVE: controle de qualidade, teofilina, cafeína, catequina, epicatequina, dissolução.

ABSTRACT

The Herbal medicines are obtained by using only raw vegetable active. Guarana (*Paullinia cupana* Kunth.) is used as an invigorating and challenging due to the presence in the seeds of methylxanthines, especially caffeine and theobromine and theophylline lesser amount, and tannins. The test is an dissolution of the tests used in assessing the quality of these medicines and through this you can evaluated the release of the active principle from a solid form in an environment that simulates the location of its absorption. This study aimed to evaluate the behavior of dissolution of capsules and tablets containing guarana. This study investigated initially, spectrophotometric and chromatographic methods for quantification of tannins and methylxanthines in pharmaceutical forms and the means of dissolution. The results obtained by spectrophotometry showed lack of specificity of this method under our experimental conditions for quantification of methylxanthines. In the analysis of tannins, the procedure is not feasible for a routine laboratory to be long and laborious. The method by High Performance Liquid Chromatography allowed the quantification of the five markers simultaneously, with precision, accuracy, selectivity and robustness. The dissolution test using apparatus as man, $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, speed of 75 rpm in 900 mL of 0.1 M HCl medium pH 1,2 provided the best results was validated and used in assessing the behaviour of dissolution of the capsules and tablets based on guarana. It was found that all markers were quantified by the method are dissolved between 75% and 80% in time of 10 minutes. An analysis of the capsules did not break in any of the conditions employed. For the tablet was also observed in non-compliance, non-identification of catechin and epicatechin in the finished product, worrying factor, as the phenolic compounds are markers that should be present in the guarana powder. Considering the increasing use of plants is a clear need for definition of quality standards to ensure its therapeutic action and accordingly the study of dissolution is an essential tool in ensuring the quality of plants.

KEY WORDS: quality control, theophylline, caffeine, catechin, epicatechin, dissolution.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Frutos e semente do guaraná	24
Figura 2.	Estrutura química da Catequina e Epicatequina	25
Figura 3.	Estrutura química das metilxantinas	26
Figura 4.	Formas tautoméricas das metilxantinas	27
Figura 5.	Núcleo fundamental de um flavonóide (a). Unidade flavan-3-ol (b). Procianidina (c).	31
Figura 6.	Estrutura química: Epicatequina-(4 β $\rightarrow$ 8)-epicatequina (4) , Catequina-(4 α $\rightarrow$ 8)-catequina (5) e Catequina-(4 α $\rightarrow$ 8)-epicatequina (6)	31
Figura 7.	Curva de calibração de taninos obtida por espectrofotometria em 691 nm utilizando concentrações de 0,01 a 0,05 mg/mL	62
Figura 8.	Curva de calibração de cafeína obtida por espectrofotometria em 271 nm utilizando concentrações de 0,005 a 0,025 mg/mL	66
Figura 9.	Espectros de absorção no UV da teofilina (verde), cafeína (vermelho), teobromina (marrom), catequina (cinza) e epicatequina (lilás)	68
Figura 10.	Cromatograma da solução padrão de cafeína, catequina e epicatequina. Condições cromatográficas: fase móvel composta por água pH 3,5 e acetonitrila (85:15) em eluição isocrática, fluxo de 1 mL/min, coluna Varian® C18 250 x 4,6 mm, 5 μ m, e detector UV a 274 nm.	70
Figura 11.	Cromatograma da solução padrão de teobromina, teofilina, cafeína, catequina e epicatequina. Condições cromatográficas: fase móvel composta por água, acetonitrila, metanol, acetato de etila e ácido acético (89:6:1:3:1), em eluição isocrática, fluxo de 1 mL/min, coluna Varian® C18 250 x 4,6 mm, 5 μ m, e detector UV a 274 nm.	71

- Figura 12. Cromatograma da amostra de cápsulas de guaraná em pó 550 mg. Condições cromatográficas: fase móvel composta por água, acetonitrila, metanol, acetato de etila e ácido acético (89:6:1:3:1), em eluição isocrática, fluxo de 1 mL/min, coluna Varian® C18 250 x 4,6 mm, 5 µm, e detector UV a 274 nm. 71
- Figura 13. Cromatograma da solução padrão de teobromina, teofilina, cafeína, catequina e epicatequina (preto), cromatograma da amostra de guaraná (vermelho) e cromatograma da solução de diluição – HCl, branco (verde). Condições cromatográficas: fase móvel composta por água, acetonitrila, metanol, acetato de etila e ácido acético (89:6:1:3:1), em eluição isocrática, fluxo de 1 mL/min, coluna Varian® C18 250 x 4,6 mm, 5 µm, e detector UV a 274 nm. 72
- Figura 14. Curva de calibração da teobromina obtida por CLAE utilizando concentrações de 0,05 a 0,25 µg/mL. 73
- Figura 15. Curva de calibração da teofilina obtida por CLAE utilizando concentrações de 0,05 a 0,25 µg/mL. 74
- Figura 16. Curva de calibração da Cafeína obtida por CLAE utilizando concentrações de 2,64 µg/mL a 13,20 µg/mL. 74
- Figura 17. Curva de calibração da Catequina obtida por CLAE utilizando concentrações de 1,2 µg/mL a 5,6 µg/mL. 75
- Figura 18. Curva de calibração da Epicatequina obtida por CLAE utilizando concentrações de 1,2 µg/mL a 5,6 µg/mL. 76
- Figura 19. Cromatograma da amostra de guaraná comprimidos. Condições cromatográficas: fase móvel composta por água, acetonitrila, metanol, acetato de etila e ácido acético (89:6:1:3:1), em eluição isocrática, fluxo de 1 mL/min, coluna Varian® C18 250 x 4,6 mm, 5 µm, e detector UV a 274 nm. 94

- Figura 20. Perfis de dissolução de cápsulas contendo pó de guaraná 550 mg, após 30 minutos de teste, utilizando as condições preliminares do teste. Cesta 1: Aparato cesta, 100 rpm, HCl 900 mL; Cesta 2: aparato cesta, 100 rpm, HCl 500 mL; Pá 1: aparato pá, 75 rpm, HCl 500 mL; Pá 2: aparato pá, 75 rpm, HCl 900 mL; Pá 3: aparato pá, 50 rpm, HCl 900 mL; Pá 4: aparato pá, 100 rpm HCl 500 mL; Pá 5: aparato pá, 100 rpm, HCl 900 mL; Pá 6: aparato pá, 75 rpm Tampão 900 mL. 97
- Figura 21. Comportamento de dissolução da cápsula A, contendo 550 mg de pó de guaraná, avaliada para quatro marcadores: teofilina (azul), cafeína (vermelho), catequina (verde) e epicatequina (roxo). 101
- Figura 22. Comportamento de dissolução da cápsula B, contendo 550 mg de pó de guaraná, avaliada para quatro marcadores: teofilina (azul), cafeína (vermelho), catequina (verde) e epicatequina (roxo). 102
- Figura 23. Comportamento de dissolução do comprimido A, contendo 250 mg de pó de guaraná, avaliada para dois marcadores: teofilina (azul) e cafeína (vermelho). 103

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.	Condições cromatográficas empregadas na escolha do método de separação, identificação e quantificação das metilxantinas, catequina e epicatequina por CLAE	50
Quadro 2.	Especificações dos parâmetros avaliados para teste de dissolução das amostras de cápsulas e comprimidos contendo pó de guaraná.	57
Quadro 3.	Parâmetros utilizados para avaliar o comportamento de dissolução de cápsulas e comprimidos a base de <i>Paullinia cupana</i> Kunth.	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Peso médio, desvio padrão e desvio padrão relativo de cápsulas e comprimidos de guaraná em pó (<i>Paullinia cupana</i>)	63
Tabela 2.	Teor de Taninos Totais em cápsulas de guaraná	64
Tabela 3.	Teor de metilxantinas em cápsulas de guaraná	66
Tabela 4.	Resultados da repetibilidade do método por CLAE para quantificação de Teobromina, em cápsulas contendo guaraná.	76
Tabela 5.	Resultados da repetibilidade do método por CLAE para quantificação de Teofilina em cápsulas contendo guaraná.	77
Tabela 6.	Resultados da repetibilidade do método por CLAE para quantificação de Cafeína em cápsulas contendo guaraná.	77
Tabela 7.	Resultados da repetibilidade do método por CLAE para quantificação de Catequina em cápsulas contendo guaraná.	78
Tabela 8.	Resultados da repetibilidade do método por CLAE para quantificação de Epicatequina em cápsulas contendo guaraná.	78
Tabela 9.	Resultados da precisão intermediária do método por CLAE para quantificação de Teobromina em cápsulas contendo guaraná.	79
Tabela 10.	Resultados da precisão intermediária do método por CLAE para quantificação de Teofilina em cápsulas contendo guaraná.	79
Tabela 11.	Resultados da precisão intermediária do método por CLAE para quantificação de Cafeína em cápsulas contendo guaraná.	80

Tabela 12.	Resultados da precisão intermediária do método por CLAE para quantificação de Catequina em cápsulas contendo guaraná.	80
Tabela 13.	Resultados da precisão intermediária do método por CLAE para quantificação de Epicatequina em cápsulas contendo guaraná.	81
Tabela 14.	Resultados da Exatidão 50%, 100% e 150% do método por CLAE para quantificação de Teofilina em cápsulas contendo guaraná.	82
Tabela 15.	Resultados da Exatidão 50%, 100% e 150% do método por CLAE para quantificação de Cafeína em cápsulas contendo guaraná	83
Tabela 16.	Resultados da Exatidão 50%, 100% e 150% do método por CLAE para quantificação de Catequina em cápsulas contendo guaraná.	84
Tabela 17.	Resultados da Exatidão 50%, 100% e 150% do método por CLAE para quantificação de Epicatequina em cápsulas contendo guaraná.	85
Tabela 18.	Resultados da Exatidão 50%, 100% e 150% do método por CLAE para quantificação de Teobromina em cápsulas contendo guaraná.	86
Tabela 19.	Resultados da robustez do método por CLAE para quantificação de Teofilina em cápsulas contendo guaraná, variando o comprimento de onda de leitura.	87
Tabela 20.	Resultados da robustez do método por CLAE para quantificação de Teofilina em cápsulas contendo guaraná, variando o fluxo da fase móvel.	87
Tabela 21.	Resultados da robustez do método, por CLAE para quantificação de Cafeína em cápsulas contendo guaraná, variando o comprimento de onda de leitura.	88
Tabela 22.	Resultados da robustez do método, por CLAE para quantificação de Cafeína em cápsulas contendo guaraná, variando o fluxo da fase móvel.	88

Tabela 23.	Resultados da robustez do método, por CLAE para quantificação de Catequina em cápsulas contendo guaraná, variando o comprimento de onda de leitura.	89
Tabela 24.	Resultados da robustez do método, por CLAE, para quantificação de Catequina em cápsulas contendo guaraná, variando o fluxo da fase móvel.	89
Tabela 25.	Resultados da robustez do método, por CLAE para quantificação de Epicatequina em cápsulas contendo guaraná, variando o comprimento de onda de leitura.	90
Tabela 26.	Resultados da robustez do método, por CLAE para quantificação de Epicatequina em cápsulas contendo guaraná, variando o fluxo da fase móvel.	90
Tabela 27.	Teor de Teofilina, cafeína, catequina e epicatequina quantificadas por CLAE na cápsula A.	91
Tabela 28.	Teor de Teofilina, cafeína, catequina e epicatequina quantificadas por CLAE na cápsula B.	92
Tabela 29.	Teor de Teofilina, cafeína, catequina e epicatequina quantificadas por CLAE no comprimido A.	92
Tabela 30.	Teor de Teofilina, cafeína, catequina e epicatequina quantificadas por CLAE na cápsula A e B e no comprimido A.	93
Tabela 31.	Resultados da repetibilidade do método de dissolução de cápsulas contendo guaraná para o marcador, teofilina.	99
Tabela 32.	Resultados da repetibilidade do método de dissolução de cápsulas contendo guaraná para o marcador, cafeína.	99
Tabela 33.	Resultados da repetibilidade do método de dissolução de cápsulas contendo guaraná para o marcador catequina.	100
Tabela 34.	Resultados da repetibilidade do método de dissolução de cápsulas contendo guaraná para o marcador epicatequina.	100

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DP	Desvio Padrão
DPR	Desvio Padrão Relativo
EMA	European Medicines Evaluation Agency
FD	Fator de diluição
FDA	Food and Drug Administration
ICH	International Conference on Harmonisation
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
min	Minutos
MX	Metilxantinas
OMS	Organização Mundial de Saúde
pH	Potencial hidrogeniônico
pKa	Logaritmo da constante de dissociação ácido-base
PNA	Polifenóis não adsorvidos pelo pó-de-pele
PT	Polifenóis totais
r	Coeficiente de correlação
rpm	Rotações por minuto
TT	Taninos Totais
USP	United States Pharmacopeia
UV	Ultravioleta
λ	Comprimento de onda

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE QUADROS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1. INTRODUÇÃO	20
1.1 <i>Paullinia cupana</i> var. <i>sorbilis</i> Kunth.	24
1.1.1 Metilxantinas	26
1.1.2 Taninos	29
1.2 CONTROLE DE QUALIDADE DE FITOTERÁPICOS	33
2. OBJETIVOS	42
3. MATERIAL E MÉTODOS	43
3.1 REAGENTES, SOLVENTE E OUTROS MATERIAIS	43
3.2 EQUIPAMENTOS	43
3.3 AMOSTRAS	44
3.4 QUANTIFICAÇÃO DE METILXANTINAS E TANINOS POR MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO	44
3.4.1 Preparo das soluções reagentes	44
3.4.1.1 Solução reagente de Carbonato de Sódio	44
3.4.1.2 Solução reagente de Ácido Fosfotúngstico	44
3.4.1.3 Solução reagente de Ácido Sulfúrico a 2,5% (v/v)	45
3.4.2 Análise do peso médio das cápsulas e dos comprimidos de Guaraná	45
3.4.3 Análise do teor de taninos no prosuto acabado	45
3.4.3.1 Preparo da Solução mãe	45
3.4.3.2 Doseamento de Polifenóis Totais	46
3.4.3.3 Doseamento de Polifenóis não adsorvido pelo pó-de-pele	46
3.4.3.4 Preparo da solução de referência para construção da curva de calibração	46

3.4.3.5 Cálculo do teor de taninos	47
3.4.4 Análise do teor de taninos no meio de dissolução	47
3.4.4.1 Doseamento de Polifenóis Totais	47
3.4.4.2 Doseamento de Polifenóis não adsorvidos pelo pó-de-pele	48
3.4.4.3 Cálculo do teor de taninos totais no meio de dissolução	48
3.4.5 Análise do teor de metilxantinas no produto acabado	48
3.4.5.1 Preparo da solução para construção da curva de calibração	48
3.4.5.2 Cálculo do teor de metilxantinas	49
3.4.6 Análise do teor de metilxantinas no meio de dissolução	50
3.5 QUANTIFICAÇÃO DE TEOBROMINA, TEOFILINA, CAFEÍNA, CATEQUINA E EPICATEQUINA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA	50
3.5.1 Determinação dos espectros de absorção no UV	50
3.5.2 Cromatografia Líquida de alta Eficiência	50
3.5.2.1 Preparo da solução água pH 3,5, para Fase Móvel	51
3.5.3 Preparo da solução amostra para quantificação simultânea de teobromina, teofilina, cafeína, catequina e epicatequina pelo método cromatográfico proposto	51
3.5.4 Validação da metodologia de quantificação de teobromina, teofilina, cafeína, catequina e epicatequina por CLAE	51
3.5.4.1 Seletividade	52
3.5.4.1.1 Preparo da amostra	52
3.5.4.1.2 Preparo da solução padrão	52
3.5.4.2 Linearidade	53
3.5.4.2.1 Preparo da solução padrão de teofilina	53
3.5.4.2.2 Preparo da solução padrão de teobromina	53
3.5.4.2.3 Preparo da solução padrão de cafeína	54

3.5.4.2.4 Preparo da solução padrão de catequina	54
3.5.4.2.5 Preparo da solução padrão de epicatequina	54
3.5.4.3 Repetibilidade	54
3.5.4.4 Precisão intermediária	55
3.5.4.5 Exatidão	55
3.5.4.6 Robustez	55
3.6 ENSAIO DE DISSOLUÇÃO	56
3.6.1 Determinação dos parâmetros para procedimento dos ensaios de dissolução das cápsulas	56
3.6.2 Método de preparo dos meios de dissolução	58
3.6.2.1 Solução tampão fosfato monopotássico 0,2 m pH 6,8	58
3.6.2.2 Solução de hidróxido de sódio 0,2 M	58
3.6.2.3 Solução HCl 0,1 M	59
3.6.3 Validação do método de dissolução utilizado	59
3.6.4 Ensaio de dissolução de cápsulas e comprimidos a base de <i>Paullinia cupana</i>	59
3.6.4.1 Ensaio de dissolução usando método espectrofotométrico para quantificação de metilxantinas e taninos em cápsula de 550 mg	59
3.6.4.2 Ensaio de dissolução para cápsula e comprimidos a base de <i>Paullinia cupana</i> var. <i>sorbilis</i> , utilizando CLAE como método de quantificação	60
3.6.5 Tratamento dos resultados	61
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
4.1 QUANTIFICAÇÃO DE METILXANTINAS E TANINOS POR MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO	62
4.1.1 Análise do teor de taninos em cápsulas de guaraná	62
4.1.2 Análise do teor de taninos totais liberados das cápsulas de Guaraná no meio de dissolução	64
4.1.3 Análise do teor de metilxantinas em cápsulas de guaraná	65

4.1.4 Análise do teor de metilxantinas liberados das cápsulas de guaraná no meio de dissolução	67
4.2 QUANTIFICAÇÃO DE TEOBROMINA, TEOFILINA, CAFEÍNA, CATEQUINA E EPICATEQUINA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA	67
4.2.1 Método proposto	67
4.2.2 Validação do método	72
<i>4.2.2.1 Seletividade</i>	72
<i>4.2.2.2 Linearidade e Intervalo</i>	72
4.2.2.2.1 Teobromina	73
4.2.2.2.2 Teofilina	73
4.2.2.2.3 Cafeína	74
4.2.2.2.4 Catequina	75
4.2.2.2.5 Epicatequina	75
4.2.2.3 Precisão	76
4.2.2.4 Exatidão	81
4.2.2.5 Robustez	86
4.2.3 Análise do teor de teofilina, cafeína, catequina e epicatequina em cápsulas e comprimidos de guaraná em pó por CLAE	91
4.3 ENSAIO DE DISSOLUÇÃO	95
4.3.1 Determinação dos parâmetros para procedimento dos ensaios de dissolução	95
4.3.2 Validação do método de dissolução utilizado	98
4.3.3 Ensaio de dissolução de cápsulas e comprimidos a base de <i>Paullinia cupana</i>	100
5. CONCLUSÕES	104
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105

1 INTRODUÇÃO

Desde os tempos mais remotos é conhecida a utilização de plantas na cura de diversos tipos de patologias. O homem pela própria necessidade e a carência de outras fontes, sempre buscou na natureza a solução para seus males. Foi através da observação e da experimentação pelos povos primitivos que as propriedades terapêuticas de determinadas plantas foram sendo descoberta e propagadas de geração em geração, fazendo parte da cultura popular (CALIXTO, 2000; TUROLLA, NASCIMENTO, 2006).

Atualmente, as plantas representam uma alternativa entre as diversas fontes de insumos necessários à existência do homem, tendo como principal vantagem o fato de ser uma fonte renovável e, em grande parte, controlada pelo ser humano, além de ter um custo mais acessível à população e aos serviços públicos de saúde se comparado aos medicamentos obtidos por síntese química (SIMOES *et al.*, 2004; TOLEDO *et al.*, 2003).

Por alguns anos, observou-se um desinteresse pelas pesquisas e produção de medicamentos a base de plantas medicinais, devido ao crescimento da produção de fármacos via síntese química, o crescimento do poder econômico das indústrias farmacêuticas, a ausência de comprovações científicas de eficácia das substâncias de origem vegetal, as dificuldades de controle químico, físico-químico, farmacológico e toxicológico dos produtos à base de plantas até então utilizados. No entanto, nas ultimas décadas, observou-se o ressurgimento e a crescente utilização das plantas medicinais, em todo mundo, tanto pela demonstração de eficácia e segurança de tais produtos, tanto pelo desenvolvimento e introdução de novas técnicas analíticas na separação e identificação dos compostos químicos. Este crescimento vem sendo observado tanto nos países desenvolvidos, usados como uma alternativa mais saudável, ou menos danosa, de tratamento, quanto nos países em desenvolvimento, como resultante do não acesso aos medicamentos farmoquímicos (TUROLLA, NASCIMENTO, 2006; AMOROZO, 1996).

As espécies vegetais são fontes de moléculas biologicamente ativas e complexas que muitas vezes constituem modelos para síntese de um grande número de fármacos. No entanto o que difere os produtos derivados de espécies vegetais dos fármacos sintéticos é a diversidade molecular, maior nas espécies

vegetais, e a atividade biológica, pois uma mesma planta pode apresentar diversas atividades, com mecanismo de ação conhecido ou não (MULLER, 2006).

Apesar da diversidade de efeitos terapêuticos proporcionados pelos fitoterápicos, no Brasil, a maioria dos médicos não tem o hábito de prescrevê-los, por não acreditar nos seus benefícios em prol da cura do paciente. Isso pode ser explicado pelo número insuficiente de estudos comprovando a eficácia terapêutica destas plantas e os baixos investimentos em pesquisa neste setor (BARATA, 2005).

A OMS (Organização Mundial de Saúde) reconhece que grande parte da população dos países em desenvolvimento utiliza plantas, ou preparações destas, nos cuidados com a saúde. Isso pode ser explicado tanto pelo fácil acesso, devido à possibilidade de cultivo pelo consumidor ou, ainda, como pela comercialização da planta em mercados livres a custos inferiores aos medicamentos industrializados. O apelo ao “produto de origem natural” é outro motivo relevante para o crescente uso das plantas medicinais, motivo que não pode ser considerado verdadeiro, visto que podem ser tidos como naturais mas não necessariamente inócuos (BRASIL, 2006; GIL; FISHER, 2007; SIMÕES *et al.*, 2004).

As plantas medicinais ao serem processadas para obtenção de um medicamento constituem um fitoterápico. Os fitoterápicos, portanto são medicamentos obtidos empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais. São caracterizados pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. A sua eficácia e segurança é validada através de levantamentos etnofarmacológicos de utilização, documentações tecnocientíficas em publicações ou ensaios clínicos fase 3. Não se considera medicamento fitoterápico aquele que, na sua composição inclua substâncias ativas isoladas, de qualquer origem, nem as associações destas com extratos vegetais (BRASIL, 2004a).

A Organização Mundial de Saúde, define fitoterápicos como medicamentos que contêm plantas ou partes de plantas como compostos ativos e podendo estes conter excipientes, isto é, solventes, diluentes ou conservantes. Produtos a base de plantas combinados, constituintes isolados não são considerados fitoterápicos. A European Medicines Evaluation Agency (EMEA, 2003) define fitoterápicos como produtos medicinais que contêm plantas ou partes de plantas com fim medicinal ou farmacêutico, ou preparações de plantas (BUSSE, 2000).

Ao contrário dos fármacos sintéticos, os fitoterápicos contêm uma mistura complexa de diferentes substâncias com atividades farmacológicas diferentes. Na maioria dos casos o composto ativo responsável por determinado efeito farmacológico é desconhecido (LOEW; KASZKIN, 2002).

As pesquisas em torno de um produto de origem natural começam quando se identificam informações do seu uso entre as pessoas. Elas têm a finalidade de otimizar ou refinar o seu uso a fim de desenvolver preparados terapêuticos de baixo custo ou isolar substâncias ativas passíveis de síntese para indústria farmacêutica. Mas apesar da importância dos medicamentos fitoterápicos, ainda assim, poucos estudos são realizados a fim de comprovar sua eficácia e segurança, sendo que muitas plantas ainda são utilizadas com base somente no seu uso popular (TUROLLA; NASCIMENTO 2006; AMOROZO, 1996).

O Brasil, apesar da diversificada flora, sendo o detentor de um terço da flora mundial, e também possuidor de um grande número de grupos de pesquisa, não ocupa uma posição de destaque no mercado mundial de fitoterápicos, ficando inclusive atrás de países menos desenvolvidos tecnologicamente. Aos poucos este cenário vem-se modificando visto que em termos econômicos, os fitoterápicos apresentam-se como um nicho de mercado e uma possibilidade para diversificação da indústria farmacêutica nacional, sendo esta área considerada como prioritária para investimentos dentro das iniciativas públicas e privadas (YUNES; PEDROSA; FILHO, 2001; BRASIL, 2006; BRASIL, 2002).

O mercado mundial de fitoterápicos gira em torno de aproximadamente 22 bilhões de dólares, sendo que o mercado europeu e americano alcançou, em 2000, valores de 8,5 e 6,6 bilhões de dólares, respectivamente (YUNES; PEDROSA; FILHO, 2001; GIL; FISCHER, 2007). Desta forma, atraem investimentos no desenvolvimento desses produtos por parte das grandes indústrias farmacêuticas. Observa-se, então, a crescente produção de drogas vegetais, sendo comercializadas *in natura*, na forma de extratos ou de especialidades farmacêuticas. Estas apresentam variadas formas de apresentação, como: pós, granulados, comprimidos, cápsulas, xaropes, entre outras (GIL, FISHER, 2007).

O custo de desenvolvimento de um medicamento de origem sintética gira em torno de US\$ 350 a 800 milhões e a duração de 10 anos de pesquisa, já o medicamento fitoterápico requer menos recurso e também menor tempo de pesquisa, embora haja a necessidade de estudos científicos, com os mesmos

critérios utilizados para o desenvolvimento dos medicamentos sintéticos, nos aspectos relativos ao controle de qualidade, segurança de uso e eficácia clínica (SIANI, 2003).

Com relação à regulamentação sobre a produção e uso de fitoterápicos, existe uma grande diferença entre os países que fazem uso destes. Nos Estados Unidos, por exemplo, os fitoterápicos podem ser introduzidos como suplementos alimentares com poucos dados existentes em se tratando de sua qualidade. Por outro lado, nos países da Europa exige-se análise da qualidade e da segurança, além de dados terapêuticos antes da comercialização destes produtos. Alemanha, França, Suécia, Dinamarca e Suíça estabeleceram regulamentos específicos de seus países para avaliação de fitoterápicos. Outros países como Reino Unido, Países Baixos e Portugal utilizaram a mesma regulamentação existente para os medicamentos convencionais (BUSSE, 2000).

Desde 1978, a Organização Mundial de Saúde vem discutindo a importância dos fitoterápicos e sua inserção na política nacional de saúde. No intuito de estabelecer diretrizes para inserção de plantas medicinais e fitoterápicos no sistema público de saúde foi criada em 2006 a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde (SUS), e a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Ambas as políticas apresentam em suas diretrizes o incentivo à pesquisa e ao desenvolvimento com relação ao uso de plantas medicinais e fitoterápicos que possam ser disponibilizados com qualidade, segurança e eficácia à população, priorizando a biodiversidade do país (BRASIL, 2006). Em meados de 2008 foi publicada pelo Departamento de Assistência Farmacêutica do Ministério da Saúde a RENISUS (Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS), que descreve 71 espécies vegetais para uso no SUS e que constitui outro marco para a oficialização do emprego da fitoterapia no Brasil (BRASIL, 2008)

A conscientização da necessidade da existência de legislação específica para os fitoterápicos foi lentamente conquistada. Apenas em 1994, a Norma Técnica referente ao registro de fitoterápicos (Portaria nº 123, 19 de outubro) foi aprovada pela, então, Secretaria de Vigilância Sanitária. Um ano depois a portaria nº 6, de 31 de janeiro de 1995, institui e normatizou o registro de produtos fitoterápicos junto ao sistema de vigilância sanitária, emitido já pela atual ANVISA. Em fevereiro de 2000, foi aprovada uma nova norma mais consistente, com a mesma finalidade, a RDC nº

17, revogada em 2004 pela RDC Nº 48, que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil (BRASIL, 2004a). Em 2004, foi publicada a Resolução – RE Nº 89 em que consta a Lista de Registro Simplificado de Fitoterápicos (BRASIL, 2004b). Nesta lista constam as plantas medicinais que mais possuem registro na ANVISA na forma de seus derivados para obtenção de fitoterápicos como: *Ginkgo biloba*, *Senna alexandrina*, *Valeriana officinalis*, *Paullinia cupana*. Para os 34 medicamentos que integram esta lista, nas condições ali definidas, não há necessidade de validar critérios de segurança e eficácia terapêutica, pelo fato dos mesmos serem amplamente reconhecidas pela sociedade científica.

1.1 *Paullinia cupana*. Kunth.

Paullinia cupana Kunth. var. *sorbilis*, o guaraná (Figura 1) é uma planta tipicamente brasileira, sendo intensa e principalmente cultivada na Amazônia, na região de Maués, e suas sementes secas e levemente torradas são utilizadas, na medicina popular ocidental e pelos indígenas, como estimulante e revigorante. Pertencente à família Sapindaceae é originário da Amazônia brasileira, venezuelana e das Guianas (SIMÕES et al., 2004; MORAES et al., 2003).



Figura 1. Frutos e sementes de Guaraná

Fonte: www.ethnobotanicals.co.nz/Guaraná.jpg

O guaraná, além de ser muito utilizado no preparo de bebidas refrigerantes devido às suas propriedades estimulantes, suas propriedades lipolíticas e

vasodilatadoras o tornam adequado para o preparo de cosméticos indicados para o tratamento da celulite. É ainda indicado nos casos de esgotamento, depressão nervosa e no combate à enxaqueca, porém vários outros usos já foram relatados como afrodisíaco, antitérmico, analgésico e antidiarréico. (MORAES *et al.*, 2003).

As sementes de guaraná se caracterizam pela presença de metilxantinas, principalmente cafeína e menor quantidade teofilina e teobromina, além de taninos. As sementes de guaraná apresentam, ainda, um pigmento vermelho natural que confere coloração ao extrato de guaraná, usado na fabricação de refrigerantes (ANTONELLI-USHIROBIRA, *et al.*, 2004).

Os taninos são as substâncias fenólicas, podendo ser chamadas também de derivados da catequina (Figura 2), ou flavan-3-ol, ou taninos condensados, saponinas e derivados das metilxantinas (cafeína, teofilina e teobromina) (Figura 3).

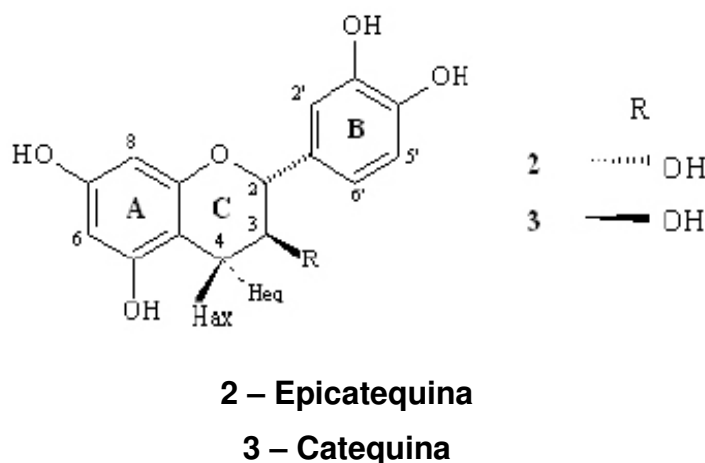
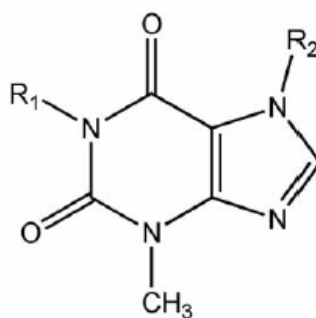


Figura 2. Estrutura química da Catequina e Epicatequina Fonte: ANTONELLI-USHIROBIRA *et al.*, 2007.



R₁ = CH₃, R₂ = CH₃: Cafeína

R₁ = CH₃, R₂ = H : Teofilina

R₁ = H, R₂ = CH₃ : Teobromina

Figura 3. Estrutura química das metilxantinas do guaraná: cafeína, teofilina e teobromina. Fonte: ANTONELLI-USHIROBIRA et al., 2007.

Os teores de cafeína variam de 2,5 a 5,0 % nas sementes e podem chegar a 7,0 % na pasta e o teor de taninos nas sementes de guaraná podem variar de 4 a 7%, sendo este teor influenciado pelo método de secagem e armazenamento das sementes e condições climáticas do local em que a planta foi cultivada (SIMÕES *et al.*, 2004; MORAES *et al.*, 2003). Os teores de cafeína no chá-da-índia por exemplo, aumentam com o crescimento do vegetal e a utilização de fertilizantes nitrogenados (SUZUKI *et al.*, 1992).

1.1.1 Metilxantinas

São compostos por vezes classificados como alcalóides verdadeiros (alcalóides purínicos), em razão de sua marcante atividade biológica, distribuição restrita e presença estrutural de nitrogênio heterocíclico. Entretanto, em razão de sua origem biogenética, proveniente de bases púricas e não de aminoácidos, como também de seu caráter anfotérico, as metilxantinas são mais propriamente classificadas como pseudoalcalóides. Ocorrem em famílias não filogeneticamente relacionadas, com distribuição restrita principalmente a regiões tropicais e subtropicais (SIMÕES *et al.*, 2004; MORAES *et al.*, 2003).

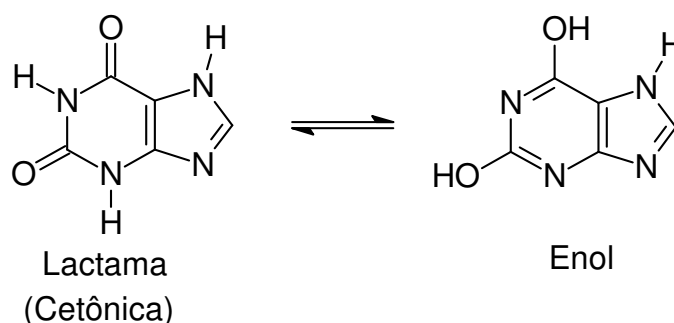


Figura 4. Formas tautoméricas das metilxantinas. Fonte: SIMÕES et al., 2004

As metilxantinas podem ocorrer em formas tautoméricas (enol e cetona), apresentando caráter anfótero e podendo, portanto, se comportar como ácidos ou bases fracas, exceto a cafeína que é trimetilada e assim não pode formar enóis e apresenta um caráter básico mais pronunciado (Figura 4) (SIMÕES et al., 2004).

As metilxantinas são os principais constituintes químicos do guaraná. A quantidade de metilxantinas presentes no guaraná é expressa em cafeína numa porcentagem de 2,1 a 6,0% na amostra seca, concentração bem superior à teobromina e a teofilina que se encontram numa concentração inferior a 0,2% (HEARD et al., 2006).

Metilxantinas são constituintes químicos importantes de várias bebidas alimentícias ou estimulantes como o café, chá verde, guaraná, cola, mate e cacau consumidas em todo mundo (SIMÕES et al., 2004).

Das três metilxantinas, a cafeína (1,3,7-trimetilxantina) é a mais comum (ALVES, BRAGAGNOLO, 2002). Esta é encontrada em grande quantidade nas sementes de café (*Coffea sp.*) e nas folhas de chá verde (*Camellia sinensis*). Também pode ser achado em outros produtos vegetais, particularmente no cacau (*Theobroma cocoa*), no guaraná (*Paullinia cupana*) e na erva-mate (*Ilex paraguayensis*) (DE MARIA e MOREIRA, 2007).

As metilxantinas agem sobre os sistemas nervoso central, cardiovascular, renal e digestivo; sobre o metabolismo dos carboidratos e lipídeos, entre outros. Em função da potência, as diferentes metilxantinas são empregadas com diferentes indicações terapêuticas. Devido as suas propriedades elas têm sido utilizadas em diversas formulações farmacêuticas como analgésicos, diuréticos e broncodilatador (SIMÕES et al., 2004).

Os efeitos fisiológicos da cafeína (1,3,7-trimetilxantina) na saúde humana incluem estimulação do sistema nervoso central, dos músculos cardíacos, do sistema respiratório e da secreção de ácido gástrico. Também é considerada como um diurético fraco e relaxante muscular. A teobromina (3,7-dimetilxantina), encontrada, sobretudo, em produtos de cacau, tem ação diurética, enquanto a teofilina (1,3-dimetilxantina), encontrada em algumas variedades de chá, tem predominantemente efeito broncodilatador (ALVES e BRAGAGNOLO, 2002; DE MARIA e MOREIRA, 2007).

A cafeína é considerada a metilxantina com atividade biológica mais consumida em todo o mundo. Em contrapartida, o consumo de cafeína pode afetar negativamente o controle motor e a qualidade do sono, bem como causar irritabilidade em indivíduos com quadro de ansiedade. O efeito da ingestão da cafeína sobre o sistema cardiovascular ainda é motivo de grande controvérsia. Seu consumo regular parece elevar a pressão arterial de forma persistente e, desta forma, indivíduos com hipertensão, doença coronariana e arritmia cardíaca deveriam ser encorajados a reduzir seus níveis de ingestão de cafeína (DE MARIA e MOREIRA, 2007).

O mecanismo de ação das metilxantinas envolve a inibição competitiva da atividade da fosfodiesterase, o que provoca subsequente aumento da concentração ou acúmulo do monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), com consequente liberação de adrenalina endógena. Isso ocasiona relaxamento imediato dos músculos lisos dos brônquios e dos vasos sanguíneos pulmonares, estimulação do sistema nervoso central, indução da diurese, aumento da secreção de ácidos gástricos, inibição das contrações uterinas e fraco efeito cronotrópico positivo e inotrópico sobre o coração. Promove também a mobilização do cálcio intracelular e, principalmente, o bloqueio de receptores adenosina, especialmente A1 e A2 (ROBBERS et al., 1997; PENILDON, 2002).

As propriedades estimulantes da cafeína parecem também ser mediadas pelo sistema dopaminérgico. Porém, de uma maneira diversa de outros estimulantes, como cocaína e anfetamina, que agem ativando receptores D1, a cafeína aumenta a transmissão dopaminérgica via receptores D2 e D2A (DE MARIA e MOREIRA, 2007).

A ação da teofilina, um broncodilatador utilizado no tratamento da asma, se deve a dois mecanismos distintos: relaxamento da musculatura brônquica, mediado

pela inibição da enzima fosfodiesterase III e IV, e supressão do espasmo brônquico, através de um mecanismo ainda não definido. A teofilina também aumenta a força de contração do diafragma, possivelmente devido a uma elevação do influxo de íons cálcio através de um canal iônico acoplado ao receptor adenosina (PENILDON, 2002).

As metilxantinas apresentam boa absorção oral. A cafeína é rápida e completamente absorvida no trato gastrointestinal e os picos plasmáticos são obtidos entre 15 e 45 minutos. O metabolismo das metilxantinas é hepático e a excreção é urinária (SIMÕES et al., 2004; PENILDON, 2002).

Os efeitos colaterais mais comuns no uso destes compostos incluem distúrbios gastrointestinais (acidez gástrica, anorexia, náuseas e vômitos), cefaléia, cansaço, excitação, taquicardia, diurese, agitação e tremor (ARAGÃO et al., 2005; PENILDON, 2002).

1.1.2 Taninos

Além das metilxantinas, os taninos são também encontrados no guaraná sendo estes responsáveis por algumas características da planta (como sabor adstringente) e efeitos farmacológicos. Ainda são poucos os estudos demonstrando atividade farmacológica dos taninos do guaraná no homem, mas sabe-se que são compostos amplamente encontrados em plantas com chá-verde, espinheira santa, barbatimão e outros (SIMÕES et al., 2004).

Os taninos são metabólitos secundários de natureza polifenólica solúveis em água com massa molecular entre 500 e 3000 Daltons que apresentam habilidade de formar complexos insolúveis em água com alcalóides, gelatina e outras proteínas. Tais compostos possuem importância pois são responsáveis pela adstringência de muitos frutos e produtos vegetais (SIMOES et al., 2004).

Tradicionalmente os taninos são classificados segundo sua estrutura química em dois grupos: taninos hidrolisáveis e taninos condensados. Os taninos hidrolisáveis são caracterizados por um poliol central, geralmente β -D-Glucose, cujas funções hidroxilas são esterificadas com ácido gálico. Os taninos condensados são oligômeros e polímeros formados pela policondensação de duas ou mais unidades flavan-3-ol e flavan-3,4-diol. Esta classe de taninos também é denominada como

proantocianidinas, devido ao fato de os taninos condensados produzirem pigmentos avermelhados da classe das antocianidinas (SIMOES et al., 2004; HAGERMAM, 2001).

A ligação entre os monômeros normalmente ocorre entre os carbonos 4 de uma estrutura e 8 da outra. Variações podem ocorrer por diferentes números de monômeros ligados, pela posição de ocorrência das ligações, pelo padrão de oxigenação nos anéis A e B da unidade flavan-3-ol e pela estereoquímica dos substituintes do anel C. Na Figura 4, demonstra a estrutura de um flavonóide, de uma unidade flavan-3-ol e um tanino condensado ou procianidina (FERREIRA; SLADE, 2002).

Taninos condensados e hidrolisáveis se distribuem no reino vegetal seguindo padrões significativamente diferentes. Os taninos condensados em geral estão amplamente distribuídas em plantas lenhosas, já os taninos hidrolisáveis ocorrem em dicotiledôneas herbáceas e lenhosas (SIMOES et al., 2004).

Os taninos condensados perfazem, aproximadamente, a metade da matéria seca da casca de muitas árvores. Eles constituem a segunda fonte de polifenóis do reino vegetal, perdendo apenas para a lignina. Além de serem potentes antioxidantes, possuem larga aplicação na complexação com proteínas, sendo por isto muito empregados na indústria de couros (QUEIROZ et al., 2002).

As unidades de flavan-3-ol encontradas no guaraná são as catequinas e a epicatequinas.

Plantas ricas em taninos são empregadas na medicina tradicional no tratamento de diversas moléstias, tais como diarreia, hipertensão arterial, reumatismo, hemorragias, feridas, queimaduras, problemas estomacais (azia, náusea, gastrite e ulcera), problemas renais e do sistema urinário e processos inflamatórios em geral (SIMOES et al., 2004).

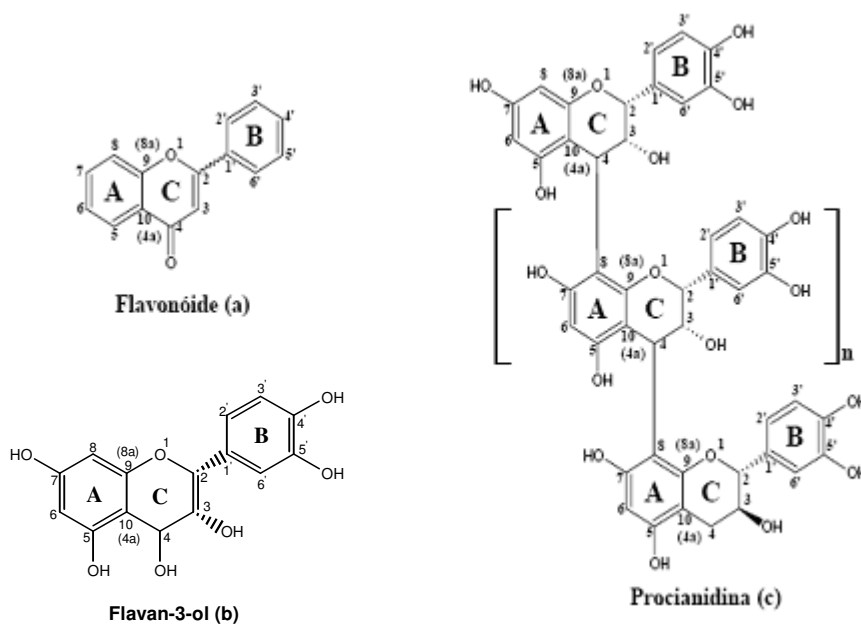


Figura 5. Fórmulas estruturais: a) Núcleo fundamental de um flavonóide; b) unidade flavan-3-ol; c) procianidina (tanino condensado). Fonte: FERREIRA; SLADE, 2002 adaptado.

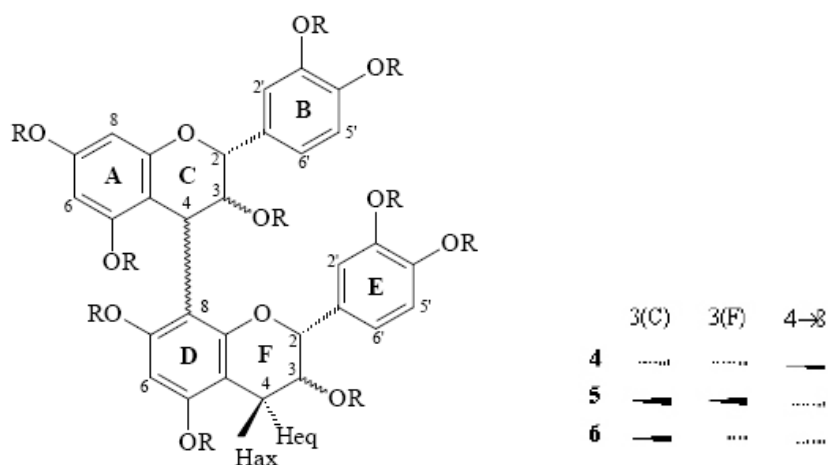


Figura 6. Epicatequina-(4β→8)-epicatequina (4), Catequina-(4α→8)-catequina (5) e Catequina-(4α→8)-epicatequina (6) Fonte: ANTONELLI-USHIROBIRA et al., 2007.

No pó de guaraná podem ser identificados os compostos fenólicos catequina e epicatequina (Figura 2) também as procianidinas B2 (4), procinidina B3 (5) e procianidina B4 (6) (Figura 5), que são dímeros compostos por unidades flavan-3-ol (ANTONELLI-USHIROBIRA et al., 2007).

As substâncias fenólicas presentes no guaraná conferem a esta um sabor adstringente, e alguns estudos demonstram sua atividade antioxidante, antiviral, bactericida, molusquicida e de inibição enzimática (SIMOES et al., 2004).

Testes *in vitro* mostram que taninos inibem praticamente todas as enzimas extracelulares, como a glicosiltransferase, uma enzima produzida na cavidade bucal por bactérias, como *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* e que é responsável pela formação de placas dentárias (YAMAGUTI-SASAKI et al., 2007).

Varias doenças degenerativas como câncer, esclerose múltipla, aterosclerose e o próprio processo de envelhecimento, estão associados a altas concentrações intracelulares de espécies oxigenadas reativas ou de radicais livres. Estudos recentes mostram que vários taninos atuam como captadores de radicais livres, os quais interceptam o oxigênio ativo formando radicais estáveis, como por exemplo, nas seguintes situações: o bloqueio de peroxidação de lipídeos em mitocôndrias hepáticas, o bloqueio da lipooxigenase em leucócitos, o bloqueio da xantinaoxidase. Desta forma os taninos teriam uma possível importância na prevenção e tratamento de doenças causadas pela peroxidação de lipídeos. Mattei et al. 1998, demonstraram, *in vitro*, o efeito antioxidante de extratos de guaraná na concentração de 1,2 µg/mL na inibição do processo de peroxidação lipídica (SIMOES et al., 2004).

Estudos *in vitro* encontram-se bem avançados, mostrando possíveis mecanismos de ação contra o câncer, em todas as etapas do desenvolvimento da doença: iniciação, promoção e propagação. Vários destes trabalhos utilizaram extratos de chás, mas atribuíram o efeito protetor às catequinas. Utilizando catequinas isoladas de extratos do chá verde, HO et al. (1992) apud MATSUBARA, RODRIGUES-AMAYO (2006) mostraram, em seu estudo, a atividade antioxidante de epigallocatequina galato e NISHIDA et al. (1994) apud MATSUBARA, RODRIGUES-AMAYO (2006) a inibição do crescimento e secreção de α -fetoproteína por hepatomas humanos também sob ação de epigallocatequina galato. A epicatequina aumentou a atividade da NADPH citocromo c redutase de células cancerosas de mama. Em ratos, os estudos com epigallocatequina galato são predominantes, possivelmente pelo seu teor maior dentre as catequinas no chá verde. Este composto impediu o crescimento de tumores de fígado e intestino (MATSUBARA; RODRIGUES-AMAYO, 2006).

1.2 CONTROLE DE QUALIDADE DE FITOTERÁPICOS

Para que um fitoterápico seja considerado seguro e eficaz ele deve ser avaliado quanto a suas qualidades físico-químicas e microbiológicas, como etapa preliminar para alcançar um padrão de qualidade necessário a um medicamento (BARA et al., 2006). O controle de qualidade de fitoterápicos ainda não tem critérios muito bem estabelecidos, mas já vem se observando interesse do poder público em estabelecer critérios de uso e em assegurar a qualidade dos produtos que vem sendo utilizados pela população (CARVALHO et al., 2007).

Qualidade é o conjunto de critérios que caracterizam a matéria-prima para o uso ao qual se destina. Com o estabelecimento de parâmetros de qualidade para a matéria-prima, a qualidade do produto final estará, em grande parte, assegurada. Portanto, a qualidade da matéria-prima vegetal é a determinante inicial da qualidade do fitoterápico, mas não garante por si só a qualidade final do produto (GIL, FISHER, 2007).

A garantia de qualidade do material vegetal a ser processado é fundamental na preparação de fitoterápicos, devendo considerar-se aspectos de pureza, botânicos, químicos e farmacológicos. Por esse motivo, além do teor de substâncias ativa e intensidade das atividades farmacológica e toxicológica, outros aspectos de qualidade a serem avaliados são a carga microbiana, contaminação química por metais, pesticidas e outros defensivos agrícolas, e presença de matéria estranha, como terra, areia, partes vegetais, e insetos ou de produtos oriundos destes (TOLEDO et al., 2003).

A qualidade das matérias-primas de origem vegetal sofre influência de vários fatores que vão desde seu plantio até a obtenção final do produto. Nesse sentido deve-se levar em consideração o meio ambiente, no momento do plantio, que podem causar diferenças quali e quantitativas na composição do produto vegetal, influenciando indiretamente no efeito farmacológico obtido (GIL, FISHER, 2007).

Além da garantia de qualidade da matéria-prima vegetal, deve-se garantir também a qualidade do produto final que chega às mãos do consumidor, visto que podem ocorrer variações no método de obtenção dos extratos, na formulação e na forma farmacêutica final do produto, e estes aspectos determinam em parte a eficácia e a segurança do fitoterápico (SIMOES et al., 2004).

A transformação de uma planta em medicamento deve ser feita de maneira que se preservem as características químicas e farmacológicas do vegetal, garantindo a sua ação biológica, a segurança de utilização e a valorização de seu potencial terapêutico (SIMOES et al., 2004).

O passo inicial para a garantia de qualidade de um fitoterápico, e a quantificação dos marcadores, com potencial efeito farmacológico, no material vegetal. No caso do Guaraná, numerosos métodos, tais como espectrofotometria, titulometria e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) são usadas para a determinação de seus marcadores (metilxantinas e taninos). A vantagem da CLAE na análise destes compostos inclui eficiência, especificidade e rapidez. Além disso, a técnica de CLAE permite a quantificação de cada composto separadamente, numa única corrida cromatográfica (ALVES e BRAGAGNOLO, 2002).

A Farmacopéia Brasileira IV edição de 2003 preconiza a análise do guaraná por espectrofotometria. Sendo o comprimento de onda de 271 nm usado para a quantificação de metilxantinas expressas em cafeína, e 691 nm, o comprimento de onda usado para quantificação dos taninos em amostras da droga pulverizada.

O método espectrofotométrico de absorção na região do UV, para análise de metilxantinas, além de apresentar exatidão e precisão satisfatória é um método barato e simples, porém é incapaz de distinguir as três metilxantinas (Cafeína, Teobromina e Teofilina) e os resultados ainda podem ser superestimados pela presença de interferentes, particularmente compostos fenólicos, que absorvem no comprimento de onda de 272 nm (DE MARIA e MOREIRA, 2007).

A Farmacopéia Americana (USP 30, 2007) preconiza cromatografia líquida de alta eficiência CLAE para a análise de teor da cafeína sintética em comprimento de onda de 275 nm usando uma coluna empacotada de 4,6 μm x 15 cm.

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é um método físico-químico de separação, identificação e quantificação. A separação resulta de um equilíbrio de distribuição do soluto entre duas fases: uma fase fixa sólida (chamada de estacionária) empacotada no interior de uma coluna e uma fase móvel que atravessa a fase fixa contida na coluna (LEITE, 2002).

As fases estacionárias mais empregadas na CLAE são as fases quimicamente ligadas que constituem de um líquido ligado por ligações covalentes a um suporte cromatográfico, geralmente a sílica. Na maioria dessas fases estacionárias, os grupos disponíveis para interação com os componentes da

amostra são cadeias longas de alquila, que funcionam como um líquido apolar, e regiões da superfície sólida da sílica. Sendo assim, o mecanismo de separação nessas fases é uma mistura de partição e adsorção. Esses mecanismos de separação são baseados principalmente em atrações dipolares (Van der Waals) ou coulômbicas, incluindo a formação de pontes de hidrogênio (COLLINS et al, 2006).

Os grupos funcionais da fase estacionária podem ter natureza polar, daí são chamados de fase normal, ou os grupos funcionais podem ter natureza apolar, que representam as fases reversas. Portanto em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em fase reversa (CLAE-FR), a fase estacionária é apolar e a fase móvel é polar.

As fases móveis utilizadas em CLAE devem possuir alto grau de pureza, devem dissolver o soluto sem decompor seus componentes, não devem decompor ou dissolver a fase estacionária e serem compatíveis com o detector utilizado (COLLINS et al, 2006).

O detector mais utilizado em CLAE é o detector por absorbância no UV-Vis, que é um detector não-destrutivo e que responde à concentração da amostra (COLLINS et al, 2006).

Uma separação bem sucedida requer um equilíbrio adequado de forças intermoleculares entre os três participantes ativos do processo de separação: soluto, fases móvel e estacionária. Em cromatografia por partição, a polaridade da fase estacionária é combinada aproximadamente com a do analito. A fase móvel, de polaridade consideravelmente diferente, é usada para eluição. Feitas as escolhas, a obtenção de uma separação satisfatória pode ser alcançada através de uma série de experimentos de tentativa-e-erro ou através da utilização de programas computacionais, como o método simplex (GUILLAUME e GUINCHARD, 1995).

Carlson et al. (1998) , desenvolveram metodologia de quantificação por CLAE para determinação de metilxantinas e catequinas em preparações contendo Guaraná. Os marcadores identificados no Guaraná pelo método foram teobromina, teofilina, cafeína, catequina e epicatequina. Heard et al (2006) estudaram a determinação das três metilxantinas em adesivos transdérmicos através das análises por CLAE. Como estes vários outros métodos têm sido propostos para determinação das metilxantinas e taninos em alimentos, produtos farmacêuticos e fluidos biológicos, mas os métodos encontrados não permitem uma boa separação e quantificação das diferentes metilxantinas e dos taninos presentes em uma mesma

amostra (ARAGÃO *et al.*, 2005). A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - Fase Reversa (RP-CLAE) tem sido a técnica mais comumente usada para determinação e quantificação destes marcadores simultaneamente (ARAGÃO *et al.*, 2005).

Além de parâmetros físico-químicos e microbiológicos que são avaliados nos laboratórios de controle de qualidade de fitoterápicos é necessário uma avaliação da forma farmacêutica visto que, algumas condições e processos de fabricação podem limitar a liberação e conseqüentemente a absorção do princípio ativo, principalmente as formas farmacêuticas de uso oral, como cápsulas e comprimidos (ANSEL *et al.*, 2000). Caso o conteúdo não seja liberado da cápsula ou do comprimido, não é possível que haja a dissolução nos fluidos corpóreos e nem absorção dos princípios ativos, de modo que a atividade farmacológica do produto fica comprometida. Assim, testes de desintegração *in vitro* e testes de dissolução, entre outros, são imprescindíveis para demonstrar se a formulação encontra-se adequada á finalidade a qual se destina (SITTICHAH *et al.*, 2007).

A desintegração e a dissolução são testes que podem avaliar o comportamento de fitoterápicos cujas formas farmacêuticas são orais e sólidas. No entanto, os testes de desintegração não asseguram a dissolução do princípio ativo, do modo como o teste específico de dissolução o faz (SITTICHAH *et al.*, 2007).

Para a avaliação da liberação de um fármaco a partir de uma cápsula ou comprimido, no local de sua absorção, principalmente no trato gastrointestinal, utiliza-se o teste de dissolução. O teste de dissolução determina a porcentagem da quantidade de princípio ativo, declarado no rótulo do produto, liberado no meio de dissolução, dentro de um período de tempo especificado, quando o mesmo é submetido á aparelhagem específica (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988).

A absorção de qualquer fármaco, a partir de formas farmacêuticas sólidas administradas por via oral, depende de sua liberação e dissolução no meio fisiológico e de sua permeabilidade às membranas biológicas do trato gastrintestinal. Devido a esta importância a avaliação do comportamento de dissolução *in vitro* é relevante para prever o desempenho do medicamento *in vivo* (QURESHI *et al.*, 2003; ANSEL *et al.*, 2000).

Em relação à forma farmacêutica o processo de dissolução pode ser influenciado por alguns fatores como, umidade, tamanho das partículas, força de compressão no caso de comprimidos, e interação com excipientes (MARCOLONGO, 2003)

As Farmacopéias descrevem testes de dissolução que determina as características de liberação de um fármaco presente em uma forma farmacêutica sólida. Como a absorção e a biodisponibilidade do fármaco dependem muito de ele estar no estado dissolvido, as características simples de dissolução são uma propriedade importante de um produto farmacêutico satisfatório (ANSEL et al., 2000).

Devido a sua importância, os testes de dissolução são rotineiramente empregados no controle de qualidade de drogas sintéticas, sendo que o uso deste na avaliação de produtos de origem natural ainda não vem sendo muito utilizado (TAGLIOLI et al., 2001) o que é preocupante, uma vez que estudos demonstram resultados de testes de dissolução de fitoterápicos variando entre valores considerados adequados e valores que consideram a amostra analisada como não conforme (BEMPONG; HOUGHTON, 1992; TAGLIOLI et al., 2001; KRESSMANN et al., 2002; WESTERHOFF et al., 2002; SITTICHAJ et al., 2007). Em muitos casos a caracterização biofarmacêutica *in vivo/in vitro* de um fitoterápico é difícil devido a sua composição complexa, do alto metabolismo sofrido pelos constituintes na própria planta e os diferentes, e difíceis métodos de extração envolvidos (EMA, 2003).

As diferentes formulações de um mesmo fitoterápico, podem não representar a mesma equivalência terapêutica, devido a diferenças na característica de dissolução (EMA, 2003). A liberação imediata e a solubilidade de todo extrato, do ativo marcador ou do constituinte com atividade terapêutica conhecida, pode ser considerado uma importante característica na comparação biofarmacêutica de dois produtos (TAGLIOLI et al., 2001).

A Agência Europeia de avaliação de produtos medicinais (EMA, 2003), publicou em 2003, um relatório onde faz considerações sobre caracterização biofarmacêutica de produtos naturais de origem vegetal, destacando a utilização do teste de dissolução como requisito para avaliar a biodisponibilidade desses produtos.

As monografias Europeias classificam os fitoterápicos em categorias, de acordo com o princípio ativo. Medicamentos de origem vegetal da categoria A, são aqueles cujo princípio ativo responsável pela ação farmacológica é conhecido. Categoria B são aqueles em que nem todos os princípios ativos foram caracterizados, mas que, o principal responsável pela ação terapêutica já foi identificado. Os que são classificados na categoria C têm como característica o fato

de não se conhecer o princípio ativo responsável pela ação terapêutica. Segundo o EMEA não são necessários testes de dissolução para os produtos de origem vegetal classificados nas categorias B e C (WESTERHOFF, et al., 2002).

Alguns trabalhos já foram realizados comparando perfil de dissolução de fitoterápicos, dentre eles tem-se o trabalho de Taglioli et al. (2001) que comparou o perfil de dissolução de diferentes formulações contendo, *Ginkgo biloba* L., *Passiflora* sp. e *Senna* sp na forma de extrato seco e extrato liofilizado. Os resultados demonstraram que o perfil de dissolução do *Senna* sp (utilizando senosídeos como marcador), foi de menos de 10% do extrato seco, em um período de 60 minutos, ao contrário do extrato de *Senna* sp liofilizado que apresentou cerca de 90% dissolvido após o mesmo período. O mesmo estudo feito com *Passiflora* sp demonstrou que o extrato bruto apresentou 50% de dissolução e o extrato liofilizado e outro extrato padronizado, cerca de 100% em um mesmo período de tempo. Para a *Ginkgo biloba* foi comparado o extrato liofilizado, extrato bruto e o granulado, sendo que todos eles apresentaram um bom perfil de dissolução, em média 90%, sendo que o extrato liofilizado apresentou maior percentagem de dissolução em um menor período de tempo, cerca de 15 minutos. Demonstrou-se neste trabalho as diferenças no perfil de dissolução conforme o processamento do extrato.

Westerhoff et al. (2002), compararam o comportamento de dissolução de cinco produtos que continham erva de São João (*Hypericum perforatum*), comercializados na cidade de Frankfurt. O teste foi realizado variando o meio de dissolução. Um meio simulando o fluido gastrointestinal sem pepsina, outro simulando as condições de estômago vazio e outro meio utilizado simulando as condições de estômago cheio, estes dois meios com um surfactante, o taurocolato e a lecitina que tinha a função de simular o suco biliar. No trabalho conclui-se que em situações onde o estômago se encontra mais cheio o perfil de dissolução é melhor, devido à presença dos tesoativos como taurocolato e lecitina, que estão em maior concentração neste meio. Os autores discutiram o aspecto relativo aos componentes ativos deste fitoterápico que exercem ação antidepressiva e incluem floroglucinas (hiperforina), naftodiantronas (hipericina) e flavonóides (rutina, hiperosídeo, isoquercetina e quercetina). Uma vez que estes compostos apresentam polaridade e solubilidade diferentes, estudos de dissolução para cada um das classes de princípios ativos devem ser realizados, ou seja, para conseguir investigar as floroglucinas que são lipofílicas, as naftodiantronas que possuem média polaridade e

para os flavonóides hidrofílicos. No trabalho verificou-se que o meio que simula o suco gástrico, nenhuma dissolução de hiperforina foi detectada, quando empregado o meio que simula o estômago vazio, a dissolução foi cerca de 5% e no meio que simula o estomago cheio, contendo sais biliares taurocolato e lecitina, a dissolução foi de cerca de 90%. Para a hipericina, nenhuma liberação ocorreu no meio que simula suco gástrico e 55% de liberação foi detectado após duas horas de dissolução no meio que simula estômago vazio. Finalmente para os flavonóides, a dissolução, variou entre 50 e 100%, conforme o processamento do extrato (Jarsin 300 ou Texx 300, respectivamente).

Sittichai et al., 2007, realizaram um estudo de dissolução com cápsulas de açafrão (*Curcuma longa* L.). Utilizando cesto, como aparato, velocidade de rotação de 100 rpm e como meio de dissolução, solução de HCl contendo diferentes concentrações de lauril sulfato de sódio. Observou-se que em meio com apenas HCl houve apenas 1% de liberação de curcuminóides, no tempo de 60 minutos, com a adição de 0,8% de tensoativo ao meio o percentual dissolvido passou para 75% em 60 minutos.

O comportamento de dissolução pode ser considerado um importante teste de comparação da biodisponibilidade de fitoterápicos que contêm o mesmo princípio ativo, pois mesmo que a qualidade farmacêutica e biofarmacêutica esteja de acordo com os parâmetros especificados, elas não são suficientes para confirmar sua bioequivalência (LOEW, KASZKIN, 2002).

Usando cápsulas e comprimidos com extrato de *Ginkgo biloba*, Kressmann et al. (2002), compararam o comportamento de dissolução destas especialidades. Utilizando duas marcas de produtos ele verificou que o produto, considerado de referência apresentou uma proporção de 99% dissolvido no meio a pH 1 e pH 4,5, em 15 minutos, enquanto, o outro produto, considerado similar apresentou-se menos de 33% dissolvido nos meios, após 1 hora.

Estudo realizado por Bempong et al (1992), avaliou o comportamento de dissolução de cápsulas de Guaraná em pó, comparado com cápsulas de cafeína com lactose, com um teor de cafeína equivalente ao teor de cafeína das cápsulas de guaraná em pó, cerca de 17,9 mg. Utilizando pá como aparato, velocidade de rotação de 100 rpm, quantificação por CLAE e 5 cápsulas de guaraná em pó por cuba ele constatou que houve uma liberação de cerca de 92% de cafeína em 90 minutos de ensaio com meio em pH 2 e 83% de liberação em pH 6,8. Neste estudo

foi comparado o teor de cafeína liberada das cápsulas de guaraná, com a cafeína liberada das cápsulas sintéticas de cafeína e conclui que as outras substâncias presentes no guaraná, não interferem na liberação da cafeína presente na mesma.

Além de ensaios de dissolução e controle físico químico, outra atribuição de um laboratório de controle de qualidade de medicamentos é a validação de métodos analíticos (PINTO; KANECO; OHARA, 2003; LACHMANN; HANNA; LIN, 2001). Para demonstrar que um método desenvolvido é apropriado tanto na determinação do marcador no fitoterápico, quanto para determinação do perfil de dissolução ele deve sofrer uma avaliação denominada validação. A validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, deve apresentar seletividade, linearidade, intervalo, precisão, sensibilidade, limite de quantificação e exatidão adequados à análise (BRASIL, 2003).

A validação é um conjunto de procedimentos que visa estabelecer que a metodologia analítica é capaz de gerar resultados confiáveis. Os procedimentos para validação estão descritos em resoluções e guias. As resoluções são documentos com poder de lei; os guias são documentos que sugerem uma linha de trabalho a ser seguida e são, portanto abertos para interpretação (RIBANI et al., 2004).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), através da Resolução – RE Nº 899, de 29 de maio de 2003, regulamenta o guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Para que um medicamento seja registrado junto a ANVISA, o método de análise deve ser validado pelo fabricante, obedecendo os parâmetros propostos pelo guia, que apesar de ser chamado de guia e uma resolução que tem poder de lei (BRASIL, 2003).

Além da ANVISA, outros institutos, estabelecem parâmetros de validação, podendo ser também consultados em um processo de validação, entre estes estão, o Food and Drug Administration (FDA), O Instituto Nacional de Metrologia (INMETRO), o International Conference on Harmonisation (ICH) e a Farmacopéia dos Estados unidos (USP).

Segundo a USP, a validação de métodos é o processo que estabelece, através de estudos laboratoriais, que as características de desempenho do método atendem aos requisitos para aplicação pretendida do método analítico (USP, 2006). Sendo assim a validação deve ser aplicada em procedimentos analíticos que façam

uso de técnicas cromatográficas com a CLAE, métodos não-cromatográficos, como espectrofotometria e titulometria e testes imunológicos e microbiológicos (BRASIL, 2003).

Os testes utilizados para validação são classificados em quatro categorias (I, II, III e IV) de acordo com sua finalidade. Para cada categoria são estabelecidos os parâmetros de validação que devem ser avaliados. Os testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas pertencem a categoria I em que são exigidos os parâmetros de seletividade, linearidade, precisão e repetibilidade, exatidão e robustez. Já os testes de dissolução, considerados testes de performance, se enquadram na categoria III, sendo necessário para validação os parâmetros de precisão (repetibilidade) (BRASIL, 2003).

Atualmente o desenvolvimento de métodos para quantificação de princípios ativos de fitoterápicos tem sido acompanhado do processo de validação, visto que para algumas matérias-primas vegetais, não há uma metodologia analítica disponível em farmacopéias, ou a necessidade de disponibilizar uma metodologia alternativa para análise (OLIVEIRA et al., 2006; LIMA et al., 2006).

Considerando o crescente consumo de fitoterápicos, e principalmente do Guaraná, uma planta tipicamente brasileira, vê-se a necessidade de estudos que garantam a qualidade do produto, desde a matéria-prima ao produto acabado. Neste sentido estudos das condições ideais de dissolução, e desenvolvimento e validação de método alternativo para quantificação de marcadores, que sejam, mais rápidos, fáceis e precisos, tornam-se cada vez mais importantes.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a qualidade de formas farmacêuticas contendo guaraná em pó através da quantificação de seus marcadores por CLAE e realização de ensaios de dissolução.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar os marcadores presentes no guaraná por método espectrofotométrico e comparar os valores encontrados neste método com os valores encontrados no método por CLAE.
- Validar metodologia de quantificação de teofilina, cafeína, catequina e epicatequina, por CLAE.
- Adequar à técnica de dissolução descrita na USP 30 (velocidade de rotação, aparato utilizado - pá ou cesta, tempo para quantificação das amostras, meio de dissolução) para especialidades farmacêuticas contendo guaraná em pó.
- Validar a metodologia de dissolução de cápsulas de guaraná
- Aplicar a metodologia de dissolução validada em comprimidos que contenham guaraná em pó.
- Comparar o comportamento de dissolução de cápsulas e comprimidos contendo guaraná em pó.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 REAGENTES, SOLVENTES E OUTROS MATERIAIS

- Acetato de etila (UV/HPLC) – Vetec
- Acetonitrila (UV/HPLC) – J.T. Baker
- Ácido acético (UV/HPLC) – Vetec
- Ácido clorídrico 37% - F.Maia
- Cafeína anidra pó 99% - Sigma
- Catequina – Sigma
- Epicatequina 90% - Sigma
- Fosfato de potássio monobásico anidro p.a. – Synth
- Hidroxido de sódio p.a. – Biotec
- Metanol (UV/HPLC) – J.T.Baker
- Teobromina 99% - Sigma
- Teofilina anidra 99% - Sigma
- Coluna Chomospher 5 nm, Varian C18 250 x 4,6 mm

3.2 EQUIPAMENTOS

- Agitador mecânico
- Balança analítica AND HR-120
- Bomba a vácuo TECNAL TE 058
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência modelo ProStar marca VARIAN (palo Alto, Califórnia, USA) equipado com injetor manual, detector UV-Vis modelo 320 e sistema de bombas binário modelo 210.
- Dissolutor Vankel VK 7000
- Espectrofotômetro VARIAN CARY 50
- Lavadora ultra-sônica UNIQUE 1400
- pHmetro digital QUIMIS Q-400^a

3.3 AMOSTRAS

As amostras utilizadas foram cápsulas e comprimidos contendo guaraná (*P. cupana*) adquiridos no comércio local, encontrando-se em perfeito estado de conservação e dentro do prazo de validade. Foram conservadas protegidas da luz, calor e umidade durante o período em que os experimentos foram realizados.

Foram utilizadas cápsulas de gelatina dura contendo 550 mg de pó de guaraná, cápsulas de gelatina mole contendo 400 mg de extrato seco padronizado de guaraná e comprimidos de 350 mg contendo, segundo o fabricante, 250 mg de pó de guaraná. As cápsulas de gelatina dura de 550 mg, foram chamadas de cápsulas A e B, as cápsulas de gelatina mole de cápsula C e o comprimido de comprimido A.

3.4 QUANTIFICAÇÃO DE METILXANTINAS E TANINOS POR MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO

Foi utilizada metodologia descrita na Farmacopéia Brasileira IV Ed., 2003, para doseamento de metilxantinas e taninos em pó de guaraná (matéria prima). Esse método foi empregado no doseamento dos marcadores no produto acabado e no meio de dissolução.

3.4.1 Preparo das soluções reagentes

3.4.1.1 Solução reagente de Carbonato de Sódio

Foi pesado 14,06 g de Carbonato de sódio e este transferido quantitativamente para balão volumétrico de 100 mL e o volume completado com água.

3.4.1.2 Solução reagente de ácido fosfotúngstico

Em um balão de fundo redondo de 250 mL, foi adicionado 10 g de tungstato de sódio, 8 mL de ácido fosfórico e 75 mL de água. O conteúdo foi elevado à fervura e mantido sob refluxo, durante 3 horas. Após o resfriamento sob temperatura

ambiente o conteúdo foi transferido para balão volumétrico de 100 mL e o volume foi completado com água.

3.4.1.3 Solução de ácido sulfúrico a 2,5% (v/v)

Em balão volumétrico de 1000 mL, contendo aproximadamente 500 mL de água foram adicionados 25,91 mL de ácido sulfúrico PA, o volume foi completado com água.

3.4.2 Análise do peso médio das cápsulas e dos comprimidos de Guaraná

A análise do peso médio das cápsulas seguiu a metodologia descrita nos métodos gerais da Farmacopéia Brasileira 4ª edição, 1988.

Foram inicialmente pesadas 20 cápsulas de forma individual. Retirou-se o conteúdo das cápsulas, pesando-as novamente uma por uma. O peso médio foi determinado pela diferença dos valores individuais obtidos entre a cápsula cheia e a vazia. A variação permitida foi de +/- 7,5 % para as cápsulas.

Para a determinação do peso médio dos comprimidos foram pesados 20 comprimidos individualmente, sendo permitida uma variação de +/- 7,5% (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988).

3.4.3 Análise do teor de taninos no produto acabado

Nesta metodologia fez-se o doseamento de polifenóis totais, e polifenóis não adsorvidos pelo pó-de-pele e pela diferença, obteve-se o teor de taninos.

3.4.3.1 Preparo da solução mãe

Foi pesado o equivalente a 0,75 g do produto acabado das cápsulas A e B, este foi transferido para Erlenmeyer e adicionado 150 mL de água. Foi aquecido até fervura e mantido em banho-maria à temperatura de 80 °C a 90 °C por 30 minutos. Depois de resfriado em água corrente foi transferido para balão volumétrico de 250 mL e completado o volume com água. O sedimento foi decantado e filtrado através de papel de filtro. Os primeiros 50 mL do filtrado foram desprezados.

3.4.3.2 Doseamento de Polifenóis Totais

Foram transferidos 5 mL da solução mãe para balão volumétrico de 25 mL e o volume completado com água, 5 mL desta solução foram misturados com 2 mL de ácido fosfotúngstico SR e diluindo a 50 mL com carbonato de sódio SR. Posteriormente, as absorvâncias foram medidas em 691 nm, exatamente 3 minutos após a adição do último reagente, utilizando a solução da diluição como branco.

3.4.3.3 Doseamento de Polifenóis não adsorvidos pelo pó-de-pele

Foram adicionados 0,2 g de pó de pele a 20 mL da *solução mãe* e agitado mecanicamente por 60 minutos. A solução foi filtrada e 5 mL desta solução diluído para 25 mL com água. Foram misturados 5 mL desta solução, com 2 mL de ácido fosfotúngstico SR e diluindo a 50 mL com carbonato de sódio SR. As absorvâncias foram medidas em 691 nm, exatamente 3 minutos após a adição do último reagente, utilizando a solução da diluição como branco.

A absorvância medida no ensaio para polifenóis totais foi subtraída da absorvância medida no ensaio para polifenóis não adsorvidas pelo pó-de-pele, obtendo-se assim a absorvância referente aos taninos da amostra.

3.4.3.4 Preparo da solução de referência para a construção da curva de calibração

Para a determinação de taninos foi feita uma curva de calibração utilizando o pirogalol como substância de referência. Para isso pesou-se 50 mg de pirogalol, transferindo-se para um balão volumétrico de 100 mL e completando-se o volume com água. Obteve-se uma solução de pirogalol a 0,5 mg/mL. Com uma pipeta volumétrica foram transferidos os seguintes volumes para balão volumétrico de 50 mL: 1,0 mL; 2,0 mL; 3,0 mL; 4,0 mL e 5,0 mL a estes balões foram adicionados 2 mL de ácido fosfotúngstico SR e completado o volume com carbonato de sódio SR. As absorvâncias foram medidas a 691 nm, exatamente 3 minutos após a adição do último reagente e dentro de 15 minutos contados da dissolução do pirogalol. Utilizou-se a água como branco.

3.4.3.5 Cálculo do teor de taninos

O teor de taninos foi calculado após regressão linear dos dados obtidos na curva de calibração, seguido da aplicação da equação:

$$\% \text{ TT} = \frac{x \text{ (mg/mL)} \times Fd \times 100}{m \text{ (mg)}}$$

Em que:

% TT = porcentagem de taninos totais;

x = valor correspondente à concentração da amostra de acordo com a curva de calibração em mg/mL;

Fd = Fator de diluição da solução;

m = massa da amostra.

O fator de diluição (Fd) corresponde às diluições sucessivas que a amostra sofre até chegar à solução final analisada. As diluições, neste caso, são de 250 na primeira etapa (solução mãe) posteriormente, uma alíquota de 5 mL da solução mãe é diluída para 25 mL, o que equivale uma diluição de 5 e posteriormente, uma alíquota de 5 mL é diluída para 50 mL, o que equivale a uma diluição de 10. Dessa maneira o Fd no método de doseamento de taninos totais é 12500.

A análise do teor de taninos totais nos produtos acabados foi realizada em triplicata.

3.4.4 Análise do teor de taninos no meio de dissolução

3.4.4.1 Doseamento de Polifenóis Totais

Foram transferidos 2,5 mL da alíquota retirada do dissolutor para balão volumétrico de 25 mL, foi adicionado 1 mL de ácido fosfotúngstico SR e completado o volume com carbonato de sódio SR. Posteriormente, a absorvância foi medida em 691 nm, exatamente 3 minutos após a adição do último reagente, utilizando a solução da diluição como branco.

3.4.4.2 Doseamento de Polifenóis não adsorvidos pelo pó-de-pele

Em um Erlenmayer foi pesado 0,05 g de pó-de-pele, adicionado 5 mL da alíquota retirada do dissolutor e submetido a agitação mecânica por 60 minutos. Posteriormente a solução foi filtrada em papel de filtro, 2,5 mL desta solução foi transferido para balão volumétrico de 25 mL, foi adicionado 1 mL de ácido fosfotúngstico SR e completado o volume com carbonato de sódio SR. Posteriormente, a absorvância foi medida em 691 nm, exatamente 3 minutos após a adição do último reagente, utilizando a solução da diluição como branco.

3.4.4.3 Cálculo do teor de taninos totais no meio de dissolução

As absorvâncias medidas para polifenóis totais foram subtraídas das absorvâncias medidas para polifenóis não adsorvidas pelo pó-de-pele, obtendo-se assim a absorvância relativa aos taninos presentes na amostra.

O teor de taninos totais foi calculado do mesmo modo que no item, 3.4.3.5, sendo que o fator de diluição neste caso foi de 500, que é o volume do meio na cuba do dissolutor, e a massa utilizada é de 550 mg (massa da cápsula que foi feita o ensaio).

3.4.5 Análise do teor de metilxantinas no produto acabado

Foram pesados o equivalente a 250 mg de pó de guaraná e transferidos para balão volumétrico de 100 mL. As metilxantinas foram extraídas com quatro porções de 20 mL de ácido sulfúrico 2,5% (v/v), em seguida o volume do balão foi completado com ácido sulfúrico 2,5% (v/v). A amostra foi filtrada em papel filtro e uma alíquota de 10 mL deste filtrado foi transferida para outro balão volumétrico de 100 mL. Foi feita a leitura da absorvância em 271 nm, no espectrofotômetro CARY 50, VARIAN.

3.4.5.1 Preparo da solução para construção da curva de calibração.

Foram dissolvidos 50 mg de cafeína em balão volumétrico de 100 mL contendo ácido sulfúrico 2,5% (v/v), obtendo-se a solução estoque a 0,05%. Em

seguida, com uma pipeta volumétrica, foram transferidas alíquotas de 1 mL; 2 mL; 3 mL; 4 mL e 5 mL, separadamente para balões volumétricos de 100, obtendo soluções de 0,005 mg/mL, 0,01 mg/mL, 0,015 mg/mL, 0,020 mg/mL e 0,025 mg/mL, respectivamente. As absorvâncias das soluções foram medidas em 271nm, utilizando ácido sulfúrico 2,5% (v/v) como branco.

3.4.5.2 Cálculo do teor de metilxantinas

Após a leitura das absorvâncias das soluções de referência, foi construída uma curva de calibração e após regressão linear dos dados obtidos e a obtenção da equação da reta, utilizou-se a seguinte equação:

$$\% \text{ MX} = \frac{x \text{ (mg/mL)} \times Fd \times 100}{m \text{ (mg)}}$$

Em que:

% MX = porcentagem de metilxantinas;

X = valor correspondente à concentração da amostra de acordo com a curva de calibração em mg/mL;

Fd = Fator de diluição da solução;

m = massa da amostra.

O fator de diluição (Fd) corresponde às diluições sucessivas que a amostra sofre até chegar à solução final analisada. As diluições, neste caso, são de 100 na primeira etapa, posteriormente, uma alíquota de 10 mL da solução é diluída para 100 mL novamente. Dessa maneira o Fd no método de doseamento de metilxantinas é 1000.

A análise do teor de metilxantinas nos produtos acabados foi realizada em triplicata.

3.4.6 Análise do teor de metilxantinas no meio de dissolução

Foram retiradas alíquotas do dissolutor e realizada leitura direta em espectrofotômetro a 271 nm, utilizando HCl 0,1 M como branco. Os cálculos utilizados foram os mesmos descritos no item 3.4.5.2

3.5 QUANTIFICAÇÃO DE TEOBROMINIA, TEOFILINA, CAFEÍNA, CATEQUINA E EPICATEQUINA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.

3.5.1 Determinação dos espectros de absorção no UV

As soluções padrão de cafeína, teobromina, teofilina, catequina e epicatequina, para determinação dos espectros de absorção no UV-Vis foram preparadas utilizando HCl 0,1 M como solvente. As concentrações das soluções foram de 6 µg/mL.

3.5.2 Cromatografia líquida de alta eficiência

Foi empregada uma coluna cromatográfica C18 de 250 x 4,6 mm, 5 µm, modo de eluição isocrático e volume de injeção de 10 µL. O comprimento de onda empregado no método foi determinado pela avaliação dos espectros de absorção no UV dos marcadores.

Foram testadas duas fases móveis. O quadro 1 detalha as condições cromatográficas empregadas na escolha do método.

CONDIÇÕES	FASE MÓVEL	FLUXO
1	Água pH 3,5 : Acetonitrila (85:15)	1,0 mL/min
2	Água: ácido acético: acetato de etila: metanol: acetonitrila (80:1:3:1:6)	1,0 mL/min

Quadro 1 – Condições cromatográficas empregadas na escolha do método de separação, identificação e quantificação das metilxantinas, catequina e epicatequina por CLAE

A metodologia validada segue os seguintes parâmetros cromatográficos:

- a) Fase móvel: Água: ácido acético: acetato de etila: metanol: acetonitrila (80:1:3:1:6)
- b) Coluna cromatográfica: C18
- c) Fluxo 1,0 mL/min
- d) Temperatura ambiente
- e) Volume de injeção: 10 µL
- f) Detecção no UV a 254 nm.

3.5.2.1 Preparo da solução Água pH 3,5, para Fase móvel

Em Becker de 1000 mL foi adicionado 900 mL de água purificada e duas gotas ácido fosfórico. Após agitação, o pH foi ajustado com solução de hidróxido de sódio 1M. A solução foi homogeneizada, filtrada em membrana de PVDF de 0,45 µm de poro e desgaseificada em sonificador.

3.5.3 Preparo da solução amostra para quantificação simultânea de teobromina, teofilina, cafeína, catequina e epicatequina pelo método cromatográfico desenvolvido.

A amostra foi preparada da mesma forma que está descrito no item 3.4.5 para doseamento de metilxantinas de acordo com a metodologia da Farmacopéia Brasileira 4ª edição, 2003 utilizando como solvente de extração a solução de ácido clorídrico 0,1M ao invés do ácido sulfúrico 2,5% (v/v).

3.5.4 Validação da metodologia de quantificação de teobromina, teofilina, cafeína, catequina e epicatequina por CLAE

A validação analítica do método de quantificação de teobromina, teofilina, cafeína, catequina e epicatequina por CLAE em cápsulas de guaraná foi realizada de acordo com a RE Nº 899/2003 da ANVISA (BRASIL, 2003). Os parâmetros avaliados foram seletividade, linearidade e intervalo, precisão (repetibilidade e intermediária), exatidão e robustez.

3.5.4.1 Seletividade

Foi avaliada a partir da análise dos cromatogramas da amostra, dos padrões (teobromina, teofilina, cafeína, catequina e epicatequina) e do solvente utilizado (branco), HCl 0,1M.

3.5.4.1.1 Preparo da amostra

A amostra foi preparada da mesma forma que esta descrita no item 3.5.3

3.5.4.1.2 Preparo da solução padrão

Para o preparo da solução padrão foi pesado aproximadamente 15 mg de teobromina e teofilina. Transferidos para balões volumétricos distintos de 25 mL. Para solubilizar a teobromina foi adicionado 5 mL, com pipeta volumétrica, de hidróxido de amônio 6N, o balão foi levado ao sonificador por 10 minutos, em seguida o volume foi completado com HCl 0,1M. Para solubilizar a teofilina foi adicionado 5 mL, com pipeta volumétrica, de metanol, o balão foi levado ao sonificador por 10 minutos, em seguida o volume foi completado com HCl 0,1M. Alíquotas de 1 mL de cada solução foram transferidas para um único balão volumétrico de 100 mL e o volume completado com HCl 0,1 M, tem se então a solução estoque de teobromina e teofilina com concentração de 0,006 mg/mL.

Para a solução estoque de cafeína pesou-se aproximadamente 15 mg de cafeína, esta foi transferida para balão volumétrico de 50 mL e dissolvida com 10 mL de HCl 0,1M. Após 10 minutos em ultra-som o volume foi completado com HCl 0,1 M. A concentração da solução estoque de cafeína é de 0,3 mg/mL.

Para a solução estoque de catequina e epicatequina foi pesado aproximadamente 15 mg de cada padrão. Transferidos para balão volumétrico de 25 mL separadamente e dissolvidos com 10 mL de HCl 0,1 M. Após 10 minutos em ultra-som o volume foi completado com HCl 0,1 M. A concentração da solução estoque de catequina e epicatequina é de 0,6 mg/mL.

Alíquotas de 5 mL da solução estoque de teobromina e teofilina, 5 mL da solução estoque de cafeína, 1 mL da solução estoque de catequina e 1 mL da

solução estoque de epicatequina foram transferidas para um único balão volumétrico de 100 mL e o volume completado com HCl 0,1M.

As concentrações finais dos padrões foram de 0,3 µg/mL para teobromina e teofilina, 15 µg/mL para cafeína e 6 µg/mL para catequina e epicatequina.

3.5.4.2 Linearidade

A linearidade foi avaliada para cada marcador, através da construção da curva de calibração, relacionando a área média, obtida por meio de três curvas diferentes, contra a concentração de cada nível. Foram utilizadas seis concentrações diferentes.

A equação da reta foi obtida pelo método dos mínimos quadrados (BRASIL, 2003).

3.5.4.2.1 Preparo da solução padrão de teofilina

Foi pesado o equivalente a 12,5 mg de teofilina em balão volumétrico de 50 mL, foi adicionado 5 mL, com pipeta volumétrica, de metanol, o balão foi levado ao sonificador por 10 minutos, em seguida o volume foi completado com HCl 0,1M. 1 mL da solução foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL e o volume completado com HCl 0,1 M. Em seguida foram transferidas alíquotas de 1,0 mL; 2,0 mL; 3,0 mL; 4,0 mL e 5,0 mL para balão volumétrico de 50 mL, obtendo soluções a 0,05 µg/mL; 0,1 µg/mL; 0,15 µg/mL; 0,2 µg/mL e 0,25 µg/mL.

3.5.4.2.2 Preparo da solução padrão de teobromina

Foi pesado o equivalente a 12,5 mg de teobromina em balão volumétrico de 50 mL, foi adicionado 5 mL, com pipeta volumétrica, de hidróxido de amônio 6N, o balão foi levado ao sonificador por 10 minutos, em seguida o volume foi completado com HCl 0,1M. 1 mL da solução foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL e o volume completado com HCl 0,1 M. Em seguida foram transferidas alíquotas de 1,0 mL; 2,0 mL; 3,0 mL; 4,0 mL e 5,0 mL para balão volumétrico de 50 mL, obtendo soluções a 0,05 µg/mL; 0,1 µg/mL; 0,15 µg/mL; 0,2 µg/mL e 0,25 µg/mL.

3.5.4.2.3 Preparo da solução padrão de cafeína

Foi pesado o equivalente a 16,5 mg de cafeína em balão volumétrico de 250 mL, foi adicionado 10 mL de HCl 0,1M, o balão foi levado ao sonificador por 10 minutos, em seguida o volume foi completado com HCl 0,1M. Em seguida foram transferidas alíquotas de 1,0 mL; 2,0 mL; 3,0 mL; 4,0 mL e 5,0 mL para balão volumétrico de 25 mL, obtendo soluções a, 2,64 µg/mL; 5,28 µg/mL; 7,92 µg/mL; 10,56 µg/mL e 13,20 µg/mL.

3.5.4.2.4 Preparo da solução padrão de catequina

Foi pesado o equivalente a 15 mg de catequina em balão volumétrico de 25 mL, foi adicionado 10 mL de HCl 0,1M, o balão foi levado ao sonificador por 10 minutos, em seguida o volume foi completado com HCl 0,1M. 1 mL da solução foi transferido para um balão volumétrico de 50 mL e o volume completado com HCl 0,1 N. Em seguida foram transferidas alíquotas de 1,0 mL; 2,0 mL; 3,0 mL; 4,0 mL e 5,0 mL para balão volumétrico de 10 mL, obtendo soluções a, 1,2 µg/mL; 2,4 µg/mL; 3,6 µg/mL; 4,8 µg/mL e 5,6 µg/mL.

3.5.4.2.5 Preparo da solução padrão de epicatequina

Foi pesado o equivalente a 15 mg de epicatequina em balão volumétrico de 25 mL, foi adicionado 10 mL de HCl 0,1 M, o balão foi levado ao sonificador por 10 minutos, em seguida o volume foi completado com HCl 0,1M. 1 mL da solução foi transferida para um balão volumétrico de 50 mL e o volume completado com HCl 0,1 M. Em seguida foram transferidas alíquotas de 1,0 mL; 2,0 mL; 3,0 mL; 4,0 mL e 5,0 mL para balão volumétrico de 10 mL, obtendo soluções a, 1,2 µg/mL; 2,4 µg/mL; 3,6 µg/mL; 4,8 µg/mL e 5,6 µg/mL.

3.5.4.3 Repetibilidade

A repetibilidade foi determinada pela análise de seis amostras individuais (sextuplicata) a 100%, ou seja, pesando-se a massa de pó de guaraná descrita no

método. Os resultados foram expressos através do desvio padrão relativo entre as amostras (DPR%), calculado segundo a fórmula:

$$\text{DPR}(\%) = \frac{\text{DP}}{\text{CMB}} \times 100$$

Em que:

DPR(%) = Desvio padrão relativo entre as amostras expresso em percentagem;

DP = Desvio padrão;

CMB = Concentração média determinada

3.5.4.4 Precisão Intermediária

A precisão intermediária foi determinada em dois dias e por dois analistas diferentes, em triplicata, na concentração de 100%. Os resultados foram expressos através do desvio padrão relativo entre as amostras (DPR%).

3.5.4.5 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada a partir da análise em triplicata de amostras nas concentrações de 50%, 100% e 150% da concentração teórica analisada e verificada através do ensaio de recuperação, ou seja, a verificação das diferenças encontradas entre as medias destes valores e a do valor teórico encontrado.

3.5.4.6 Robustez

A robustez do método foi avaliada em triplicata por meio das seguintes variáveis: Comprimento de onda da leitura para a qual foram utilizados 252 nm, 254 nm e 256 nm e fluxo da fase móvel para a qual foram utilizados 0,8 mL/min, 1,0 mL/min e 1,2 mL/min. A robustez foi expressa através do desvio padrão relativo entre as amostras (DPR%).

3.6 ENSAIO DE DISSOLUÇÃO

3.6.1 Determinação dos parâmetros para procedimento dos ensaios de dissolução.

A metodologia analítica utilizada para avaliação da dissolução seguiu as recomendações da Farmacopéia Americana (USP 30, 2007), que descreve a metodologia geral para teste de dissolução de cápsulas e comprimidos. Em um primeiro momento, foram realizados ensaios preliminares variando-se os parâmetros para posterior escolha daqueles cujos resultados fossem mais adequados.

O aparelho utilizado foi montado e calibrado de acordo com as descrições do fabricante. Foi adicionado volume variado (900 e 500 mL) do meio de dissolução, convenientemente desaerado, ao recipiente da aparelhagem de dissolução. A temperatura do meio foi mantida a $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, retirando-se o termômetro antes de se iniciar a agitação.

Foram testados como meios de dissolução HCl 0,1 M pH 1,2; Tampão fosfato monopotássico pH 6,8 e água destilada.

Como dispositivo de agitação foram utilizados cestas (aparato 1) e pás (aparato 2). As amostras foram colocadas no recipiente de dissolução contendo o meio. Para que as cápsulas se depositassem no fundo do recipiente, no caso da utilização de pás, elas foram envolvidas em um pequeno pedaço de arame em espiral, de material inerte, com poucas voltas, tendo cuidado especial para que ficassem folgadas e que não fossem danificadas durante a operação. Foram retiradas cuidadosamente, quando presentes, as bolhas de ar formadas na superfície da amostra, ao entrarem em contato com o meio de dissolução. Não sendo possível retirar as bolhas nos primeiros minutos do teste, os resultados seriam desprezados, caso diferissem significativamente da média dos demais resultados realizando novo teste.

Imediatamente, após o cumprimento de todos os requisitos, a agitação foi iniciada, na velocidade de 50, 75 ou 100 rpm. No tempo zero e em intervalos de 5 minutos foram retirados da zona média, entre a superfície do meio de dissolução e a parte superior dos aparatos, amostras para análise, até que se completassem 30 minutos de ensaio. Quando utilizado 50 e 75 rpm ao final do último tempo, a rotação

foi aumentada para 100 rpm durante 1 min, quando utilizado 100 rpm ao final do último tempo, a rotação foi aumentada para 150 rpm durante 1 min.

Os parâmetros avaliados para dissolução estão apresentados no Quadro 2. Após análise dos resultados variando-se os parâmetros, foram escolhidos aqueles que forneceram os dados mais consistentes a respeito da dissolução de cápsulas.

Temperatura	37 °C ± 0,5 °C
Sistema de agitação	a) Aparato 1 (cesto) b) Aparato 2 (pá)
Velocidade	a) 50 rpm b) 75 rpm c) 100 rpm
Meios de dissolução	a) Tampão fosfato monopotássico pH 6,8 b) HCl 0,1 M pH 1,2 c) Água
Volume do meio	a) 500 mL b) 900 mL
Aliquota amostrada	3 mL
Tempo de amostragem	0, 5, 10 e 30 minutos
Método de quantificação e de detecção	Cromatografia Líquida de Alta eficiência em detector de UV a 274 nm

Quadro 2. Especificações dos parâmetros avaliados para teste de dissolução das amostras de cápsulas e comprimidos contendo pó de guaraná.

Ao final de cada tempo, foram retirados 3 mL de alíquotas do meio de dissolução e colocados em um béquer previamente identificado e montado com papel de filtro com as seguintes especificações: 80g/m² de gramatura, 205 µm de espessura, possuindo a maioria dos poros 14 µm. Filtrada a alíquota, a análise foi feita mediante o doseamento de metilxantinas e taninos totais conforme os itens 3.4.3 e 3.4.5 e doseamento de teobromina, teofilina, cafeína, catequina e epicatequina através da injeção direta no cromatografo.

3.6.2 Método de preparo dos meios de dissolução (USP 30, 2007)

3.6.2.1 Solução tampão fosfato monopotássico 0,2 M pH 6,8

Na preparação de 200 mL do tampão de fosfato monopotássico foram pesados 27,22 g de fosfato de potássio monobásico em um balão volumétrico de 1000 mL, completando-se o volume com água destilada e levando-se ao banho de ultrassom até completa dissolução. Dessa solução foram transferidos 50 mL para um balão volumétrico de 200 mL, em que foram adicionados 22,4 mL de solução de NaOH 0,2 M e completado o volume com água destilada. O pH foi medido mantendo-se em 6,8. Quando necessário, corrigiu-se o pH utilizando-se solução de NaOH 0,2 M.

3.6.2.2 Solução de hidróxido de sódio 0,2 M

A fim de se preparar a solução de hidróxido de sódio utilizada para correção da solução anterior, foram pesados 8 g de hidróxido de sódio (NaOH) e transferidos para um balão volumétrico de 1000 mL, adicionando-se aproximadamente 500 mL de água destilada. O balão foi levado ao banho ultrassom até que ocorresse total dissolução do hidróxido de sódio. Completou-se o volume com água destilada e a solução foi homogeneizada.

3.6.2.3 Solução HCl 0,1 M

Na preparação desta solução, 8,5 mL de ácido clorídrico p.a. foram transferidos para um balão de 1000 mL, completando o volume com água destilada, seguido de homogeneização. O pH foi medido mantendo-se em 1,2.

3.6.3 Validação do método de dissolução utilizado (BRASIL, 2003)

O teste de dissolução é classificado, segundo sua finalidade, em teste de categoria III, sendo portanto necessário para sua validação avaliação do parâmetro de precisão por meio da repetibilidade.

A precisão avaliada no nível repetibilidade foi determinada pela análise de seis amostras individuais (sextuplicata) coletadas do dissolutor no tempo de 30 minutos. A repetibilidade foi expressa através do desvio padrão relativo entre as amostras (DPR%) descrito no item 3.5.4.3.

3.6.4 Ensaio de dissolução de cápsulas e comprimidos a base de *Paullinia cupana* var. *sorbilis*

3.6.4.1 Ensaio de dissolução usando método espectrofotométrico para quantificação de metilxantinas e taninos em cápsulas de 550 mg

Foi realizado um ensaio de dissolução preliminar, para quantificação de metilxantinas e taninos por método espectrofotométrico, neste estudo foi utilizada a cápsula A como amostra.

As condições do teste foram às seguintes: aparato pá, meio HCl 0,1 N, volume 500 mL e 900 mL, velocidade de rotação 100 rpm, alíquota amostrada 10 mL, com reposição do volume com HCl 0,1 N e tempos de coleta de 0, 5, 10, 15 e 30 minutos.

A quantificação de taninos e metilxantinas foi feita segundo as descrições dos item 3.4.4 e 3.4.6, respectivamente.

3.6.4.2 Ensaio de dissolução para cápsulas e comprimidos a base de *Paullinia cupana* var. *sorbilis*, utilizando CLAE como método de quantificação

Para a análise do comportamento de dissolução de cápsulas e comprimidos, foi realizado o ensaio de dissolução seguindo todas as recomendações da Farmacopéia Americana (USP 30, 2007) e utilizando os parâmetros definidos após os estudos preliminares.

O aparelho foi montado e calibrado de acordo com as descrições do fabricante. Foi adicionado o volume medido (900 mL) do meio de dissolução (HCl 0,1 M), convenientemente desaerado, ao recipiente da aparelhagem de dissolução. A temperatura do meio foi mantida a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, retirando o termômetro antes de se iniciar a agitação.

Devido a utilização de pás como dispositivos de agitação, ao utilizarmos as cápsulas as mesmas foram colocadas no recipiente de dissolução envoltas em um espiral de aço inoxidável, com voltas frouxas o suficiente para afundar a cápsula, mas não atrapalhar a dissolução da mesma. Ao utilizarmos os comprimidos não foi necessário o uso do afundador. Em ambos os casos, foram retirados cuidadosamente, quando presentes, as bolhas de ar formadas na superfície das amostras, ao entrarem em contato com o meio de dissolução. Não sendo possível retirar as bolhas nos primeiros minutos do teste, os resultados foram desprezados, se este diferir significativamente da média dos demais resultados realizando novo teste.

Imediatamente após o cumprimento de todos os requisitos à agitação foi iniciada, na velocidade de 75 rpm. Nos tempos 0, 5, 10 e 30 foram retirados da zona média, entre a superfície do meio de dissolução e a parte superior das pás, alíquotas de 3 mL. Após o tempo de 30 minutos a agitação do sistema foi aumentada para 100 rpm por 2 minutos, e uma alíquota retirada, isto foi feito para garantir que todo o marcador presente encontrava-se dissolvido no meio. Após filtração da alíquota, a análise foi realizada mediante injeção direta da amostra no cromatografo. As análises foram feitas em triplicata.

Para a quantificação de teofilina, cafeína, catequina e epicatequina liberadas no meio de dissolução, foi necessário a quantificação destes marcadores, nas cápsulas e no comprimido. A porcentagem destes marcadores foi calculada como descrito no item 3.5.3. Para o calculo de teofilina, cafeína, catequina e epicatequina

liberadas após dissolução, foi utilizada a equação da reta, obtida através da curva de calibração e a área média de cada marcador, obtendo-se a concentração x (mg/mL).

Após a obtenção desta concentração foi utilizada a seguinte equação:

$$\% = \frac{x \text{ (mg/mL)} \times Fd \times 100}{m \text{ (mg)}}$$

Em que:

% = porcentagem do marcador;

x = valor correspondente à concentração da amostra de acordo com a curva de calibração em mg/mL feita para cada marcador;

Fd = Fator de diluição da solução (900 mL – volume do meio)

m = massa da amostra (peso do comprimido ou cápsula)

3.6.5 Tratamento dos resultados

Os resultados dos ensaios de dissolução basearam-se nos critérios de aceitação da Farmacópeia Americana (USP 30, 2007). Foram consideradas em conformidade no ensaio de dissolução aquelas amostras que apresentassem um mínimo de 75% a 80% de marcadores dissolvido (Q), após 30 minutos de ensaio.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 QUANTIFICAÇÃO DE TANINOS E METILXANTINAS POR MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO

4.1.1 Análise do teor de taninos em cápsulas de guaraná

O método aplicado para formas farmacêuticas é descrito pela farmacopéia para análise de matéria-prima, porém esse não sofreu interferência pois as cápsulas não tinham excipientes.

De acordo com o método proposto pela Farmacopéia Brasileira, o teor de taninos é obtido, pela diferença do conteúdo de polifenóis totais e polifenóis não adsorvidos pelo pó-de-pele. Desta maneira o método possui duas etapas de quantificação, não quantificando diretamente o teor de taninos (FARMACÓPEIA BRASILEIRA, 2003).

Para a análise de taninos foi construída uma curva, utilizando o pirogalol como substância de referência, nas concentrações de 0,01 mg/mL a 0,05 mg/mL, as absorvâncias foram lidas, após reação de cor a 691 nm. Foi feita análise de regressão linear e obteve-se a seguinte equação da reta: $y = 8,996x + 0,001$, cujo coeficiente de correlação linear (r) é 0,997 (Figura 7).

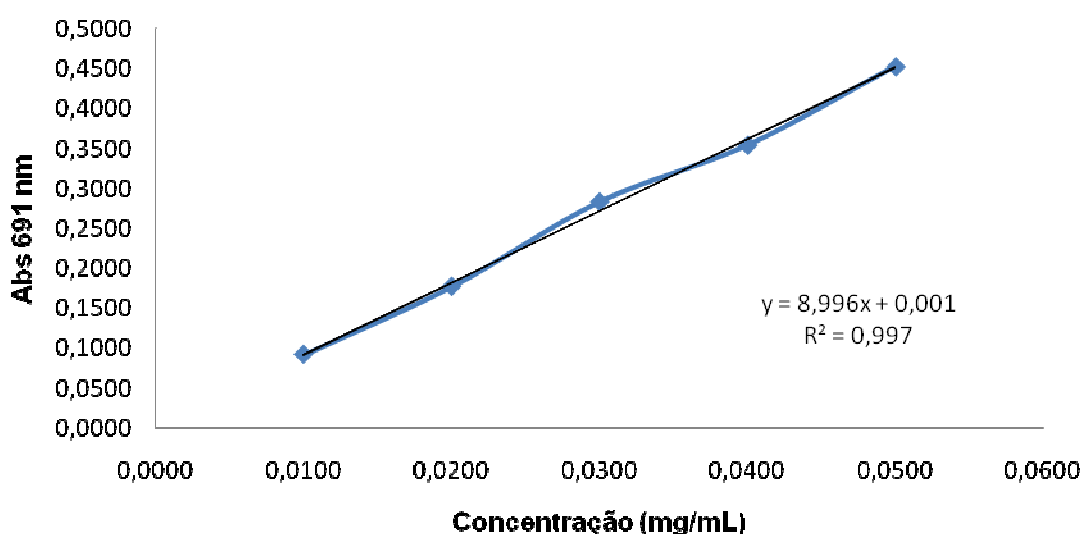


Figura 7. Curva de calibração de taninos obtida por espectrofotometria em 691 nm utilizando concentrações de 0,01 a 0,05 mg/mL.

Para o cálculo do teor de taninos nas cápsulas A e B, inicialmente realizou-se o ensaio de peso médio, que forneceu os valores listados na Tabela 1.

Tabela 1. Peso médio, desvio padrão e desvio padrão relativo das cápsulas A e B e do comprimido A, contendo Guaraná em pó (*Paullinia cupana*).

AMOSTRA	PESO MÉDIO	DP	DPR (%)
Cápsula A	564,70 mg	0,0152	2,69
Cápsula B	576,12 mg	0,0098	1,70
Comprimido A	361,10 mg	0,0123	3,40

Legenda: DP = desvio padrão; DPR (%) = desvio padrão relativo expresso em porcentagem.

Para se calcular a massa equivalente a 750 mg que deveria ser pesada de cada produto foi utilizada a seguinte relação:

$$\begin{array}{l} \text{Peso médio} \quad \text{_____} \quad \text{Peso do fitoterápico (rotulado)} \\ \quad \times \quad \text{_____} \quad 750 \text{ mg (fitoterápico)} \end{array}$$

Onde: x é a massa em mg do produto acabado a ser utilizada nas análises.

Assim, de acordo com o peso médio das cápsulas e a relação acima utilizada, foram pesados para preparação da solução mãe, 770,04 mg de pó da cápsula A e 785,61 mg de pó da cápsula B.

As médias das leituras, em espectrofotômetro, das soluções amostras das cápsulas A e B foram de 0,4208 nm de polifenóis totais e 0,3973 nm para polifenóis não adsorvidos na cápsula A e 0,4530 nm de polifenóis totais e 0,4173 nm para polifenóis não adsorvidos, na cápsula B.

Através da diferença encontrada nas leituras (Abs dos polifenóis totais – Abs dos polifenóis não adsorvidos) e através da equação da reta, os valores das concentrações (x) das soluções foram de 0,0024 mg/mL para cápsula A e 0,0038 mg/mL para cápsula B. O fator de diluição é de 12500, considerando as diluições feitas no método de doseamento.

A partir destes dados utilizou-se a equação citada no item 3.4.3.5 (pág 43) para o cálculo do teor de taninos totais nas cápsulas de Guaraná.

Os valores encontrados para o teor de taninos totais (%TT) foi de 4,05% para a cápsula A e 6,43% para cápsula B (Tabela 2).

Tabela 2. Teor de taninos totais nas cápsulas A e B contendo guaraná.

AMOSTRA	Abs PT	Abs PNA	Abs TT	x (mg/mL)	% TT
Cápsula A	0,4208	0,3979	0,0229	0,0024	4,05
Cápsula B	0,4530	0,4173	0,0357	0,0038	6,43

Legenda: Abs = Absorvância a 691 nm; PT = Polifenóis totais; PNA = Polifenóis não adsorvidos pelo pó-de-pele; TT = Taninos totais; x = Concentração de taninos em solução; %TT = Porcentagem de taninos totais na amostra.

4.1.2 Análise do teor de taninos totais liberados das cápsulas de Guaraná no meio de dissolução

No estudo preliminar de dissolução de cápsulas de Guaraná em pó, utilizando como método de quantificação o ensaio espectrofotométrico, foi utilizada a cápsula A como amostra e as condições do ensaio foram às descritas no item 3.6.4.1.

A porcentagem de taninos totais encontrada no meio de dissolução após 30 minutos de teste foi de 1,88%, sendo o teor de taninos encontrado na cápsula A de 4,05%, concluímos que no ensaio obtivemos uma porcentagem de taninos dissolvidos de 46,42%.

Para análise de taninos, o método espectrofotométrico, de absorção na região do visível (691 nm), contém três etapas no processo de extração dos princípios ativos, quantifica de forma indireta os taninos (dosando os polifenóis totais e não adsorvidos pelo pó de pele), necessita de reações de cor para a leitura das absorvâncias, a qual não possui estabilidade, necessitando um tempo de 5 min para a leitura. Numa análise de rotina de controle de qualidade, e para o propósito do trabalho, que é a avaliação do comportamento de dissolução, ensaios mais rápidos (15 minutos de análise), simples (preparo da amostra em uma única etapa), sensíveis e específicos são mais vantajosos. Sendo assim, o método por CLAE seria

mais indicado, por permitir a quantificação simultânea dos cinco marcadores (Alves e Bragagnolo, 2002).

Devido estes motivos ensaios de dissolução visando otimizar a liberação dos taninos não foram realizados.

4.1.3 Análise do teor de metilxantinas em cápsulas de guaraná.

O método descrito pela Farmacopéia Brasileira quantifica as metilxantinas e as expressa em cafeína, por ser essa a presente em maior concentração no pó de guaraná (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2003). Este método não é capaz de quantificar separadamente cada metilxantina, visto que no comprimento de onda de 271 nm todas são absorvidas.

Para essa análise, a monografia farmacopéica propõe a construção de uma curva de calibração, utilizando a cafeína como substância de referência nas concentrações de 0,005 a 0,025 mg/mL. A partir da curva de calibração, foi feita análise de regressão linear e obteve-se a seguinte equação da reta: $y = 44,90x + 0,009$ cujo coeficiente de correlação linear (r) é 0,999 (Figura 8).

Utilizando os dados de peso médio demonstrados na tabela 2, procedeu-se o cálculo da massa a ser pesada para análise do teor de metilxantinas, descrita no item 3.4.5.

$$\begin{array}{l} \text{Peso médio } \underline{\hspace{2cm}} \text{ Peso do fitoterápico (rotulado)} \\ \times \underline{\hspace{2cm}} 250 \text{ mg (fitoterápico)} \end{array}$$

Onde: x é a massa em mg do produto acabado a ser utilizada nas análises.

Assim, de acordo com o peso médio das cápsulas e a relação acima utilizada, foram pesados para a análise, 256,68 mg para a cápsula A e 261,87 mg de pó da cápsula B.

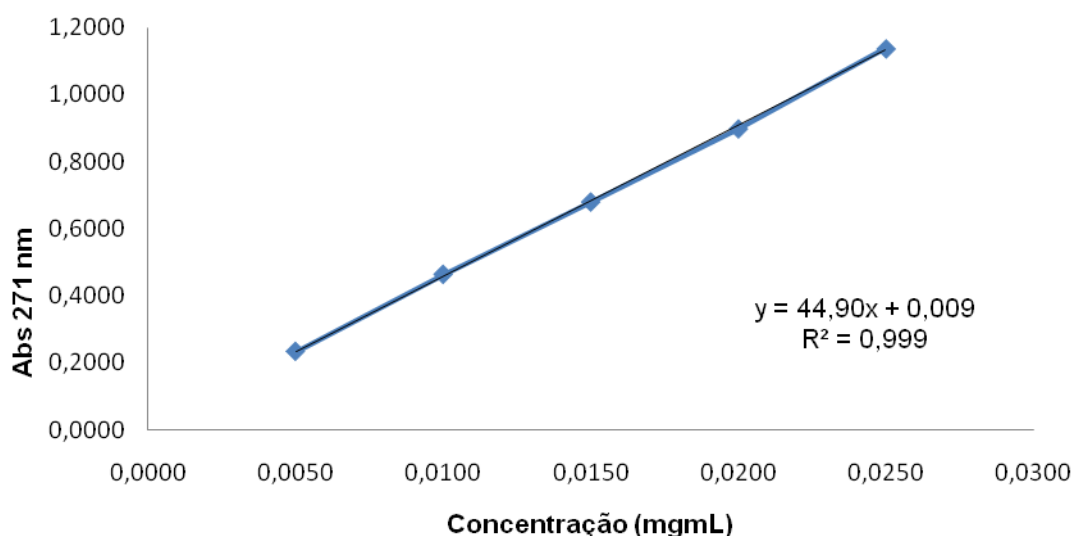


Figura 8. Curva de calibração de cafeína obtida por espectrofotometria em 271 nm utilizando concentrações de 0,005 a 0,025 mg/mL.

As médias das leituras, em espectrofotômetro, das soluções amostras das cápsulas A e B foram de 0,5570 nm e 0,5973 nm, respectivamente.

Através da equação da reta, os valores das concentrações (x) das soluções foram de 0,0122 mg/mL para cápsula A e 0,0131 mg/mL para cápsula B. O fator de diluição é de 1000, considerando as diluições feitas no método de doseamento.

A partir destes dados utilizou-se a equação citada no item 3.4.5.2 para o cálculo do teor de metilxantinas nas cápsulas de Guaraná, que foi de 4,88% para a cápsula A e 5,24% para cápsula B (Tabela 3).

Tabela 3. Teor de metilxantinas em cápsulas de Guaraná

AMOSTRA	Abs	x (mg/mL)	% MX
Cápsula A	0,5570	0,0122	4,88
Cápsula B	0,5973	0,0131	5,24

Legenda: Abs = Absorvância a 271 nm; MX = metilxantinas; x = Concentração de metilxantinas em solução; %MX = Porcentagem de metilxantinas na amostra.

4.1.4 Análise do teor de metilxantinas liberados das cápsulas de guaraná no meio de dissolução

No ensaio de dissolução realizado de acordo com o item 3.6.4.1, as alíquotas retiradas do dissolutor foram diretamente lidas em espectrofotômetro a 271 nm, utilizando HCl 0,1 M como branco. A média das leituras obtida foi de 1,3013.

A porcentagem de metilxantinas encontrada no meio de dissolução após 30 minutos de teste foi de 4,71%, sendo o teor total de metilxantinas encontrado na amostra de cápsula A de 4,88%. Assim, obteve-se uma porcentagem de metilxantinas dissolvidas de 96,52%.

O método de doseamento espectrofotométrico descrito na farmacopéia, alcançou resultados satisfatórios para essa classe de substância ativa, sendo também um método rápido de doseamento, porém quantifica metilxantinas totais, não identificado quais as concentrações isoladas delas.

Considerando estas observações e aquelas feitas com relação ao método que quantifica taninos totais no Guaraná, optamos por utilizar um método por cromatografia líquida de alta eficiência que quantificasse, simultaneamente as metilxantinas (Teobromina, Teofilina e Cafeína) e os taninos (Catequina e Epicatequina) presentes no guaraná.

4.2 QUANTIFICAÇÃO DE TEOBROMINIA, TEOFILINA, CAFEÍNA, CATEQUINA E EPICATEQUINA POR CROMATOGRAPHIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.

4.2.1 Método proposto

No planejamento do método cromatográfico é necessário obter informações sobre a amostra como: estrutura química, valores de pKa e espectros de absorbância no UV.

A escolha do método teve como principal objetivo garantir uma análise rápida, que quantificasse o percentual de ativos em cápsulas de Guaraná em pó e em estudos de perfil de dissolução. O ensaio foi realizado utilizando HCl 0,1M como solvente das amostras, em substituição ao ácido sulfúrico 2,5% preconizado pela Farmacopéia Brasileira 4ª edição, 2003, adequando ao ensaio de dissolução.

A cafeína, a catequina e a epicatequina são solúveis em HCl 0,1M, porém a teofilina e a teobromina são pouco solúveis em HCl 0,1M. A Farmacopéia Americana (USP, 2007) descreve a monografia da teofilina utilizando como padrão interno a teobromina, nela a teofilina é solubilizada em metanol e a teobromina em hidróxido de amônio 6N, esta foi a referência usada no preparo das soluções padrão.

A seleção do comprimento de onda de 274 nm foi realizada através da avaliação dos espectros de absorção no UV das metilxantinas (Teobromina, Teofilina e Cafeína), da catequina e da epicatequina (Figura 9). A teofilina e a teobromina apresentam absorção máxima em torno de 269 nm, a cafeína em 272 nm e a catequina e epicatequina em torno 275 nm.

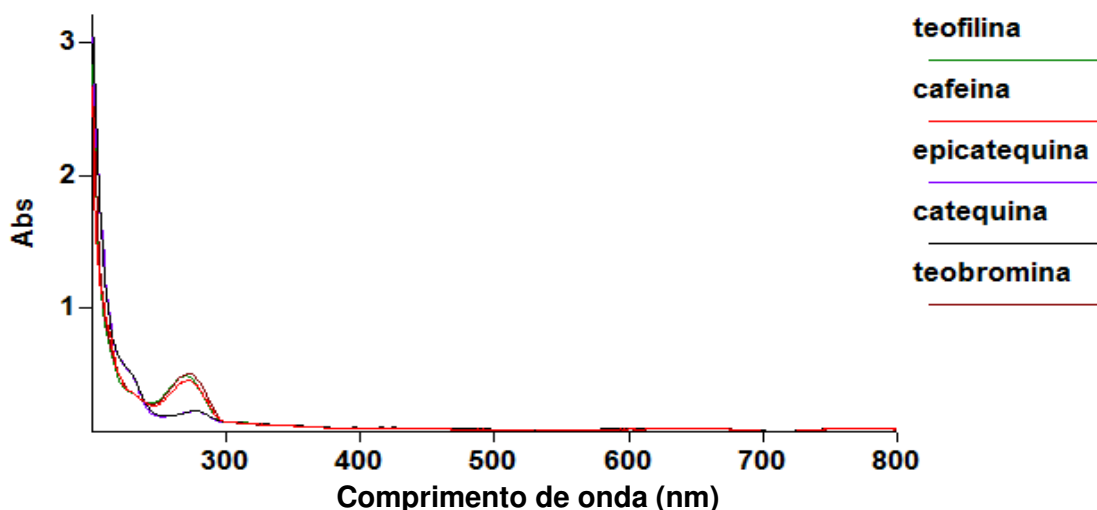


Figura 9. Espectros de absorção no UV da Teofilina (verde), Cafeína (vermelho), teobromina (marrom), Catequina (cinza) e Epicatequina (lilás).

O volume de injeção de 10 μ L, o comprimento de onda a 274 nm, o fluxo da fase móvel e a coluna cromatográfica (C18, 5 μ m, 250 x 4,6 mm, Varian) não foram modificados.

Num estudo que investigou as condições cromatográficas utilizadas na determinação de metilxantinas e catequinas em preparações contendo guaraná (CARLSON; THOMPSON, 1998) e em outro que avaliou a liberação “in vitro” das metilxantinas e catequinas em adesivos transdérmicos (HEARD *et al.*, 2006), em ambos, foi usada como fase móvel tampão fosfato de potássio 0,25M pH 3,5 (ajustado com ácido fosfórico) e metanol (77:23), em eluição isocrática, fluxo de 0,9

mL/min, coluna C18 250 x 4,6 mm, 5 µm, e detector a 272 nm. Estas condições cromatográficas podem ser comparadas com a proposta por Souza e Arantes (2007) que utilizou fase móvel composta por Tampão acetatato pH 3,5 e acetonitrila (85:15), em eluição isocrática, fluxo 1,0 mL/min. A polaridade da fase móvel foi semelhante nos três estudos citados.

A escolha do pH da fase móvel é baseada no pKa das substâncias a serem eluídas. O pKa das metilxantinas, pode variar de 8,4 à 13,9 e das catequinas de 8,6 a 13,2 (GENNARO, 1999). O pH da fase móvel deve ser abaixo da constante de ionização, pois o aumento da forma ionizada do analito aumenta sua dissolução na fase aquosa e reduz seu tempo de retenção, já que a forma iônica passa através da coluna sem retenção (IVANOVIC et al., 1995). O tamponamento é feito visando evitar variações de pH, visto que quando as metilxantinas e catequinas são expostas a pH superiores a 4,0 são protonadas e assim, não interagem com a fase estacionária, sendo eluídas sem sofrer detecção (ARAGÃO et al., 2005).

Nos dois primeiros estudos citados foi utilizado tampão fosfato pH 3,5, porém a utilização deste tampão para o pH 3,5 não é recomendado, visto que o tampão fosfato é para soluções com pH entre 5,5 a 7,0 (USP 30, 2007). Para o pH 3,5 a USP recomenda a utilização de tampão acetatato, porém observamos que o biftalato de potássio, sal necessário para o preparo deste tampão, foi absorvido pelo detector do HPLC, não sendo possível portanto a quantificação dos marcadores.

Condição cromatográfica semelhante à esta, utilizando como fase móvel metanol e água pH 3,5 na proporção 70:30, coluna C18 250 x 4,6 mm e comprimento de onda 254 nm foi utilizada por Sombra et al. (2005) e Gnoato et al., (2007) para quantificação das metilxantinas em guaraná. Baseado nestes estudos, a fase móvel água pH 3,5 e acetonitrila (85:15), foi testada utilizando cafeína, catequina e epicatequina, porém houve a sobreposição dos picos da cafeína e catequina (Figura 10).

Estudo realizado por Saito et al. (2006) para a determinação de epigalato de catequina, epicatequina, catequina e cafeína em amostras de chá verde (*Camellia sinensis*), por CLAE, propõe a utilização de uma fase móvel composta por água, acetonitrila, metanol, acetato de etila e ácido acético glacial (89:6:1:3:1), coluna C18 de 125 x 4,0 mm, 5µm, equipada com coluna guarda, eluição gradiente de 0,7 mL/min a 1,2 mL/min e comprimento de onda de 280 nm.

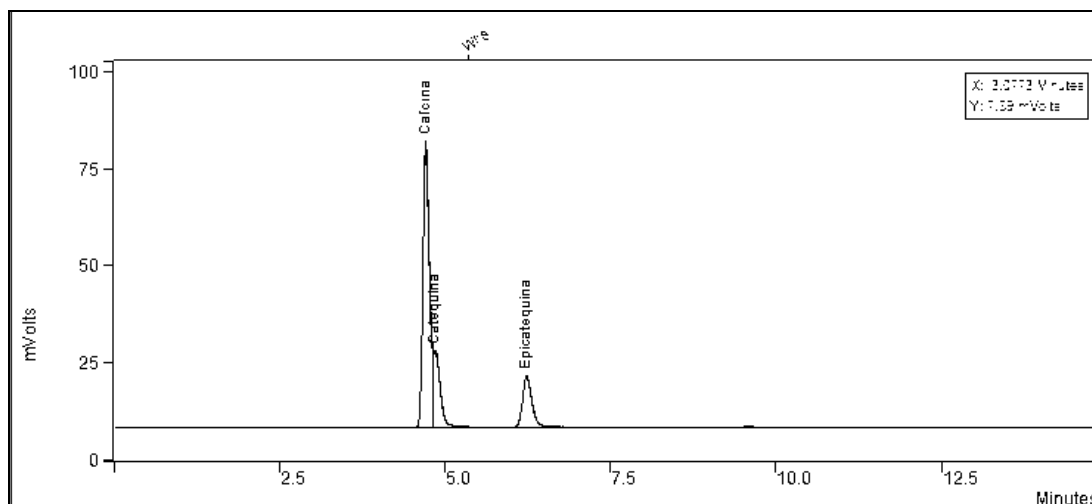


Figura 10. Cromatograma da solução padrão de cafeína, catequina e epicatequina. Condições cromatográficas: fase móvel composta por água pH 3,5 e acetonitrila (85:15) em eluição isocrática, fluxo de 1 mL/min, coluna Varian® C18 250 x 4,6 mm, 5 µm, e detector a 274 nm.

Baseado no estudo de Saito et al. (2006) foi utilizado a mesma fase móvel proposta, em modo de eluição isocrática, fluxo de 1,0 mL/min e comprimento de onda de 274 nm (Figura 11). A figura 12 mostra o cromatograma da amostra de Guaraná. Utilizando esta condição obtivemos resultados satisfatórios, com boa separação dos picos de teobromina, teofilina, cafeína, catequina e epicatequina e um tempo de corrida de 15 minutos.

Para que o método, portanto, fosse utilizado para a quantificação de teofilina, teobromina, cafeína, catequina e epicatequina, em cápsulas e comprimidos a base de Guaraná (*Paullinia cupana*) e também na quantificação destes marcadores em ensaios de dissolução, este foi então validado.

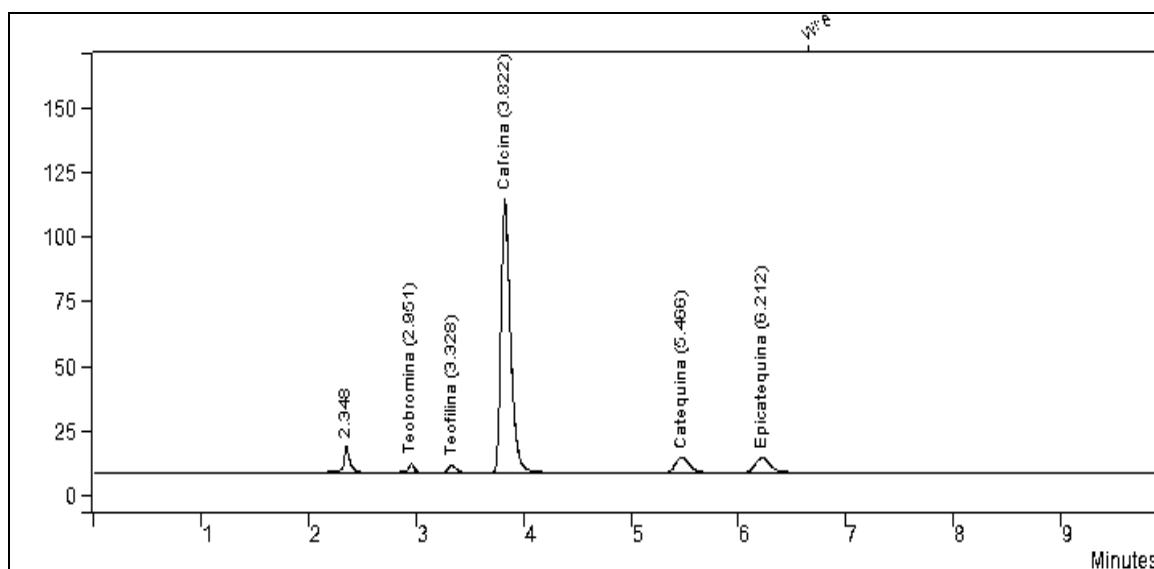


Figura 11. Cromatograma da solução padrão de teobromina, teofilina, cafeína, catequina e epicatequina. Condições cromatográficas: fase móvel composta por água, acetonitrila, metanol, acetato de etila e ácido acético (89:6:1:3:1), em eluição isocrática, fluxo de 1 mL/min, coluna Varian® C18 250 x 4,6 mm, 5 µm, e detector a 274 nm.

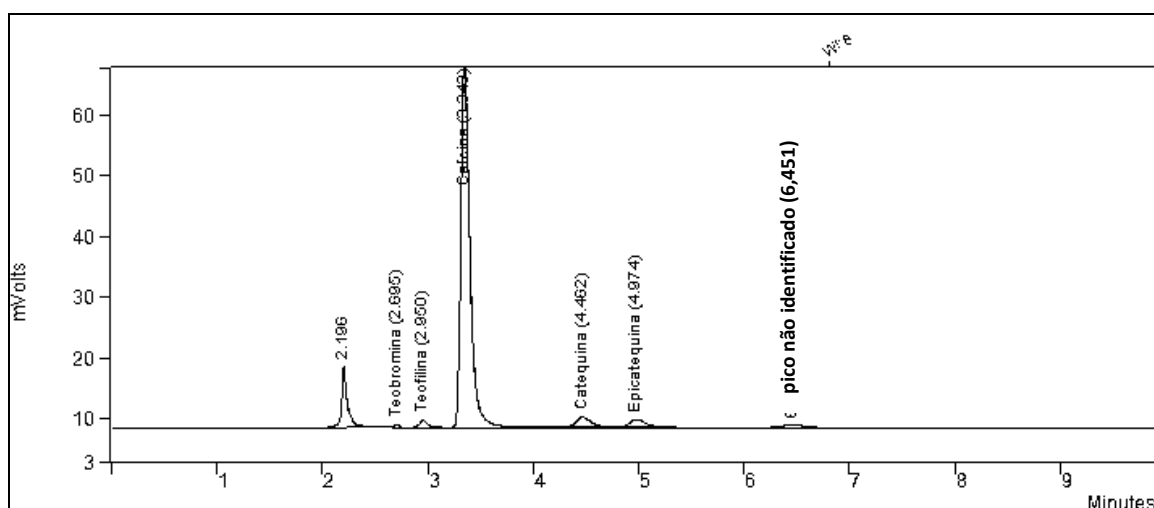


Figura 12. Cromatograma da amostra de cápsulas de guaraná em pó 550 mg. Condições cromatográficas: fase móvel composta por água, acetonitrila, metanol, acetato de etila e ácido acético (89:6:1:3:1), em eluição isocrática, fluxo de 1 mL/min, coluna Varian® C18 250 x 4,6 mm, 5 µm, e detector a 274 nm.

4.2.2 Validação do método

4.2.2.1 Seletividade

O método de separação, identificação e quantificação das metilxantinas, catequina e epicatequina por cromatografia líquida de alta eficiência foi seletivo por ser capaz de separar os cinco marcadores, conforme mostra a figura 13. Pode-se observar que a solução utilizada na diluição dos marcadores não interfere no pico dos marcadores na amostra.

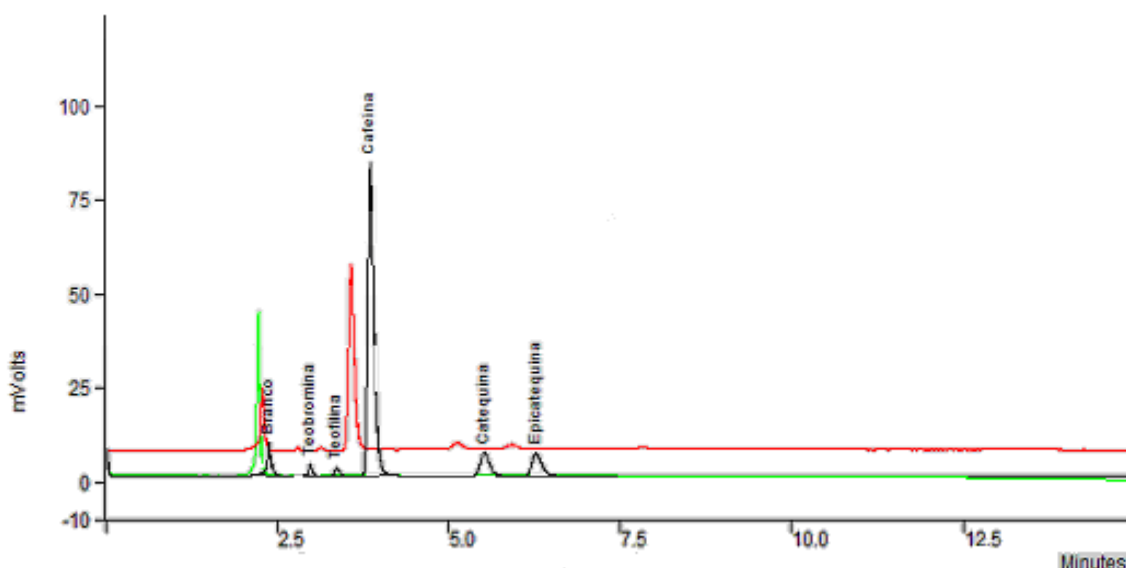


Figura 13. Cromatograma da solução padrão de teobromina, teofilina, cafeína, catequina e epicatequina (preto), cromatograma da amostra de guaraná (vermelho) e cromatograma da solução de diluição – HCl, branco (verde). Condições cromatográficas: fase móvel composta por água, acetonitrila, metanol, acetato de etila e ácido acético (89:6:1:3:1), em eluição isocrática, fluxo de 1 mL/min, coluna Varian® C18 250 x 4,6 mm, 5 µm, e detector a 274 nm.

4.2.2.2 Linearidade e Intervalo

A avaliação do parâmetro de linearidade dos cinco marcadores foi realizada a partir da análise de regressão linear da curva de calibração (obtida pela média de três curvas) feita com cada marcador, obtida com a área de cada pico.

4.2.2.2.1 Teobromina

O método foi linear no intervalo de 0,05 µg/mL a 0,25 µg/mL. A figura 14 mostra a curva de calibração, a equação da reta e o coeficiente de correlação para a Teobromina.

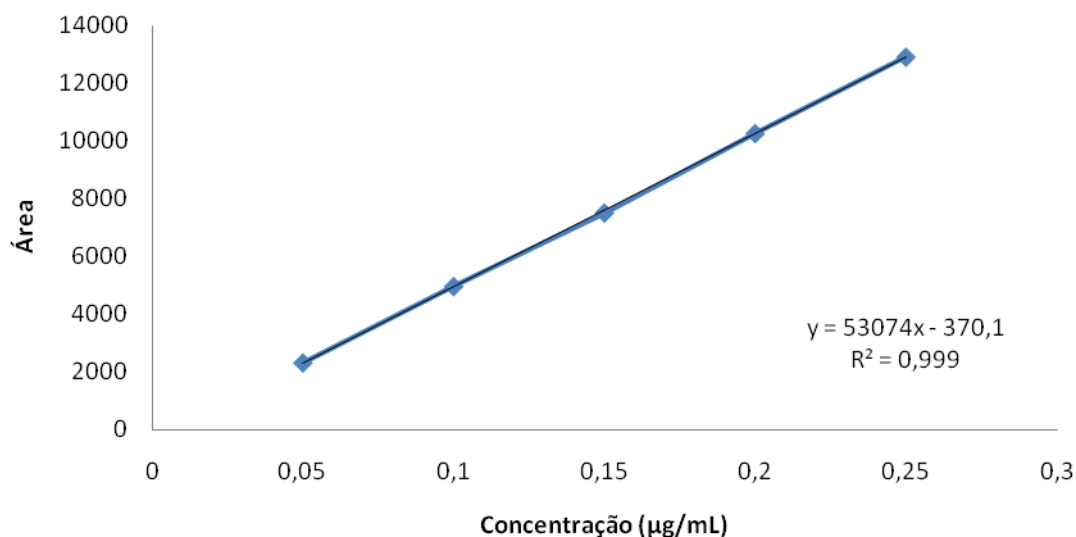


Figura 14. Curva de calibração da teobromina obtida por CLAE utilizando concentrações de 0,05 a 0,25 µg/mL.

4.2.2.2.2 Teofilina

O método foi linear no intervalo de 0,05 µg/mL a 0,25 µg/mL. A figura 15 mostra a curva de calibração, a equação da reta e o coeficiente de correlação para a Teofilina.

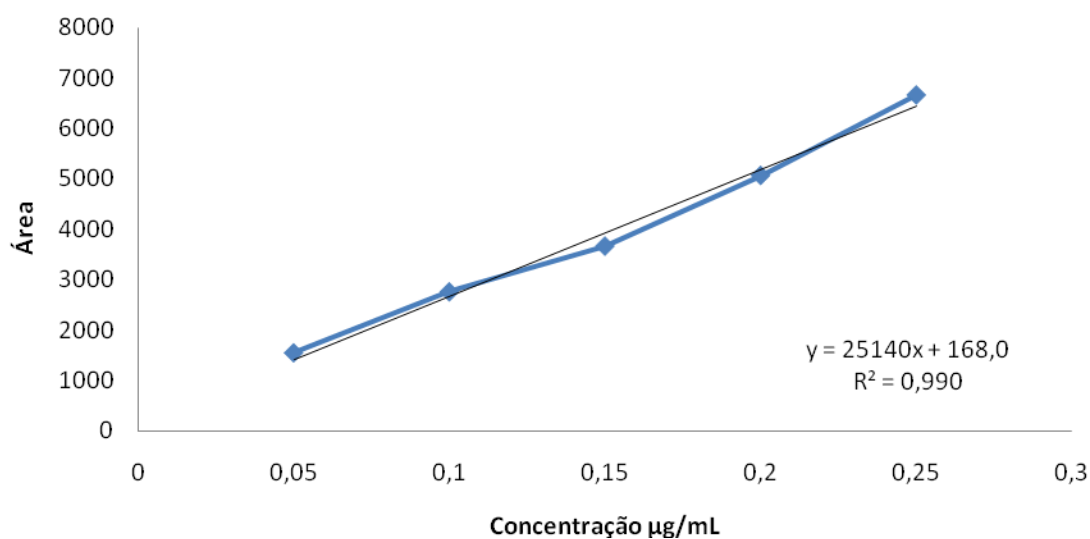


Figura 15. Curva de calibração da teofilina obtida por CLAE utilizando concentrações de 0,05 a 0,25 µg/mL.

4.2.2.2.3 Cafeína

O método foi linear no intervalo de 2,64 µg/mL a 13,20 µg/mL. A figura 16 mostra a curva de calibração, a equação da reta e o coeficiente de correlação para a Cafeína.

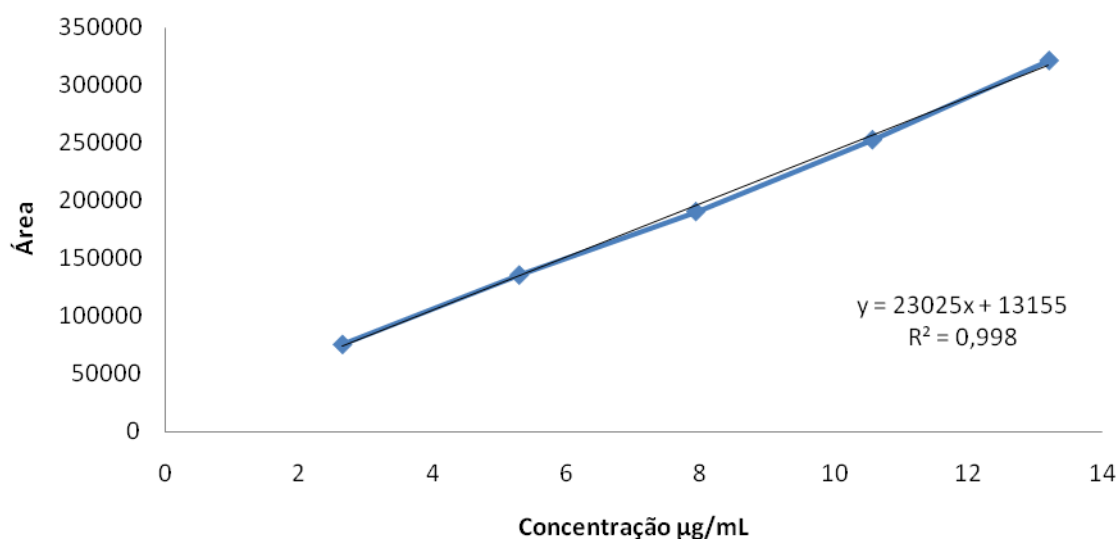


Figura 16. Curva de calibração da Cafeína obtida por CLAE utilizando concentrações de 2,64 µg/mL a 13,20 µg/mL.

4.2.2.2.4 Catequina

O método foi linear no intervalo de 1,2 µg/mL a 5,6 µg/mL. A figura 17 mostra a curva de calibração, a equação da reta e o coeficiente de correlação para a Catequina.

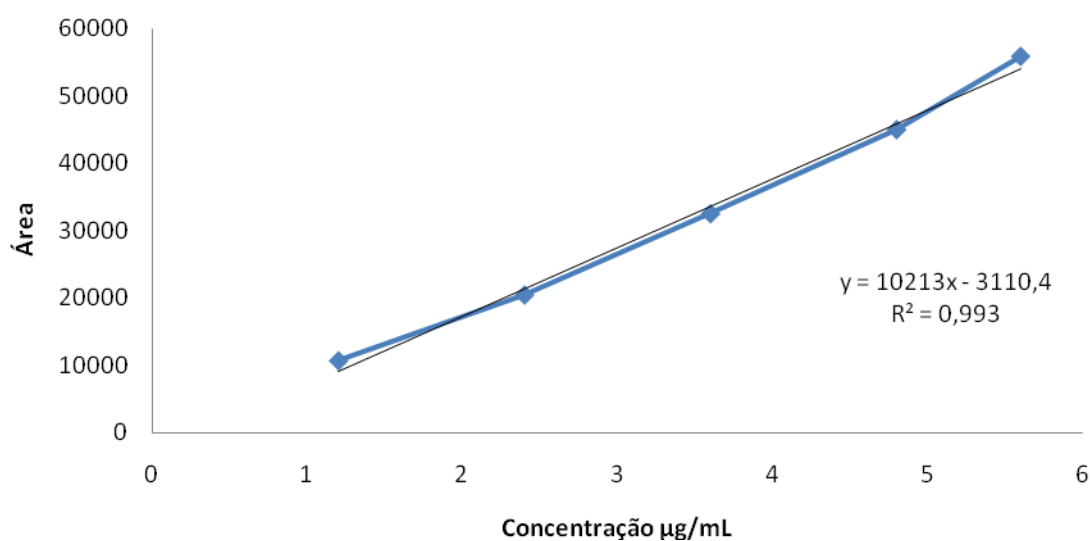


Figura 17. Curva de calibração da Catequina obtida por CLAE utilizando concentrações de 1,2 µg/mL a 5,6 µg/mL.

4.2.2.2.5 Epicatequina

O método foi linear no intervalo de 1,2 µg/mL a 5,6 µg/mL. A figura 18 mostra a curva de calibração, a equação da reta e o coeficiente de correlação para a Epicatequina.

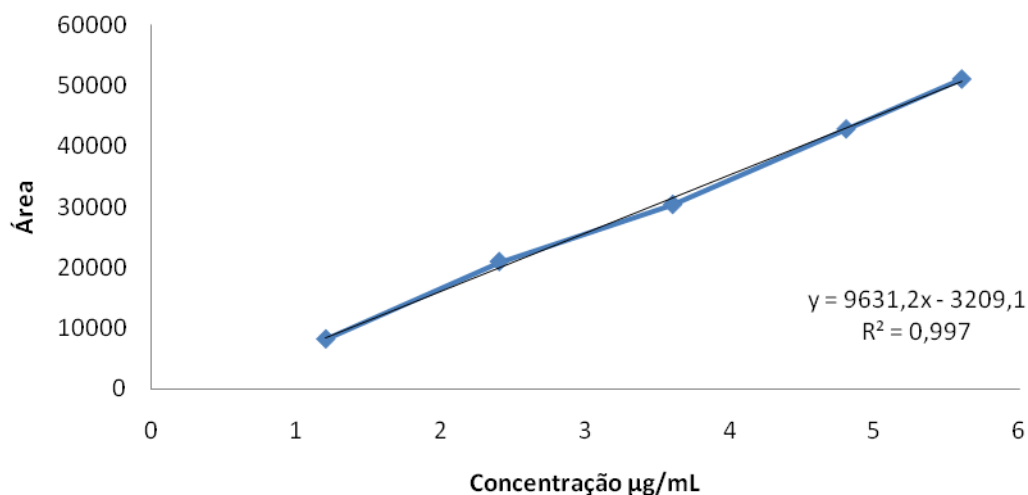


Figura 18. Curva de calibração da Epicatequina obtida por CLAE utilizando concentrações de 1,2 µg/mL a 5,6 µg/mL.

4.2.2.3 Precisão

O método apresentou-se preciso nos dois níveis avaliados com DPR inferiores ao especificado pela resolução vigente (5%) para os cinco marcadores quantificados. Os resultados de repetibilidade, para os cinco marcadores estão apresentados nas tabelas 4, 5, 6, 7 e 8. As tabelas demonstram resultados homogêneos, com pouca variabilidade.

Tabela 4. Resultados da repetibilidade do método por CLAE para quantificação de Teobromina, em cápsulas contendo Guaraná.

AMOSTRA	Área	Concentração (µg/mL)	% Teobromina
1	1568	0,0360	0,0144
2	1760	0,0398	0,0159
3	1599	0,0367	0,0147
4	1594	0,0366	0,0146
5	1556	0,0359	0,0144
6	1626	0,0372	0,0149
	Média	0,0370	0,0148
	DP	0,0013	0,0005
	DPR	3,54	3,47

Tabela 5. Resultados da repetibilidade do método por CLAE para quantificação de Teofilina em cápsulas contendo Guaraná.

AMOSTRA	Área	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	% Teofilina
1	6755	0,2620	0,1048
2	6594	0,2556	0,1022
3	6743	0,2615	0,1046
4	7191	0,2793	0,1117
5	6734	0,2612	0,1045
6	6201	0,2398	0,0959
	Média	0,2599	0,1039
	DP	0,0116	0,0046
	DPR	4,46	4,46

Tabela 6. Resultados da repetibilidade do método por CLAE para quantificação de Cafeína em cápsulas contendo Guaraná.

AMOSTRA	Área	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	% Cafeína
1	344757	14,40	5,76
2	347278	14,51	5,80
3	338582	14,13	5,65
4	350238	14,64	5,86
5	357598	14,96	5,98
6	350356	14,64	5,86
	Média	14,55	5,82
	DP	0,25	0,10
	DPR	1,74	1,74

Tabela 7. Resultados da repetibilidade do método por CLAE para quantificação de Catequina em cápsulas contendo Guaraná.

AMOSTRA	Área	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	% Catequina
1	18382	2,10	0,84
2	17860	2,05	0,82
3	18785	2,14	0,86
4	16991	1,97	0,79
5	16994	1,97	0,79
6	17398	2,00	0,80
	Média	2,04	0,82
	DP	0,06	0,03
	DPR	3,17	3,20

Tabela 8. Resultados da repetibilidade do método por CLAE para quantificação de Epicatequina em cápsulas contendo Guaraná.

AMOSTRA	Área	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	% Catequina
1	14605	1,85	0,74
2	14729	1,86	0,74
3	13981	1,78	0,71
4	14013	1,79	0,72
5	13718	1,76	0,70
6	15918	1,98	0,79
	Média	1,84	0,73
	DP	0,07	0,03
	DPR	4,01	3,99

A avaliação dos resultados da precisão intermediária do método de quantificação por CLAE demonstrou pouca variação, conforme descrição detalhada nas tabelas 9, 10, 11, 12 e 13 e DPR inferiores ao especificado pela resolução vigente (5%) para os cinco marcadores quantificados.

Tabela 9. Resultados da precisão intermediária do método por CLAE para quantificação de Teobromina em cápsulas contendo Guaraná.

ANALISTAS	AMOSTRA	Área	Concentração (µg/mL)	% Teobromina
I	1	1612	0,0370	0,0148
	2	1598	0,0367	0,0147
	3	1605	0,0368	0,0147
II	1	1518	0,0352	0,0141
	2	1563	0,0360	0,0144
	3	1703	0,0387	0,0155
		Média	0,0367	0,0147
		DP	0,0012	0,0004
		DPR	3,18	3,19

Tabela 10. Resultados da precisão intermediária do método por CLAE para quantificação de Teofilina em cápsulas contendo Guaraná.

ANALISTAS	AMOSTRA	Área	Concentração (µg/mL)	% Teofilina
I	1	5882	0,2273	0,0909
	2	5769	0,2228	0,0891
	3	5829	0,2252	0,0901
II	1	5872	0,2269	0,0908
	2	5951	0,2300	0,0920
	3	6351	0,2459	0,0984
		Média	0,2297	0,0919
		DP	0,0083	0,0033
		DPR	3,61	3,61

Tabela 11. Resultados da precisão intermediária do método por CLAE para quantificação de Cafeína em cápsulas contendo Guaraná.

ANALISTAS	AMOSTRA	Área	Concentração (µg/mL)	% Cafeína
I	1	354758	14,83	5,93
	2	360357	15,08	6,03
	3	350238	14,64	5,86
II	1	354748	14,84	5,93
	2	344298	14,38	5,75
	3	344992	14,41	5,76
		Média	14,70	5,88
		DP	0,27	0,11
		DPR	1,85	1,85

Tabela 12. Resultados da precisão intermediária do método por CLAE para quantificação de Catequina em cápsulas contendo Guaraná.

ANALISTAS	AMOSTRA	Área	Concentração (µg/mL)	% Catequina
I	1	17842	2,05	0,82
	2	17405	1,97	0,79
	3	16843	1,95	0,78
II	1	17859	2,05	0,82
	2	16913	1,96	0,78
	3	18108	2,08	0,83
		Média	2,01	0,80
		DP	0,06	0,02
		DPR	2,80	2,80

Tabela 13. Resultados da precisão intermediária do método por CLAE para quantificação de Epicatequina em cápsulas contendo Guaraná.

ANALISTAS	AMOSTRA	Área	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	% Epicatequina
I	1	15918	1,98	0,79
	2	140,13	1,79	0,72
	3	14569	1,84	0,74
II	1	15683	1,96	0,78
	2	15261	1,92	0,77
	3	15849	1,98	0,79
		Média	1,91	0,77
		DP	0,08	0,03
		DPR	4,16	3,77

4.2.2.4 Exatidão

Outro parâmetro avaliado para a validação do método utilizado foi a exatidão. Os valores de recuperação estão demonstrados nas tabelas 14, 15, 16, 17 e 18.

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados de um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro (ANVISA 2003; ICH Q2, 2005). Os processos utilizados para avaliar a exatidão podem ser materiais de referência certificados, comparação de métodos e ensaios de recuperação (INMETRO, 2003; BRASIL, 2003; ICH Q2, 2005).

Para a teofilina (Tabela 14), cafeína (Tabela 15), catequina (Tabela 16) e epicatequina (Tabela 17) o método mostrou ser exato, com valores de recuperação variando entre 95,18% a 104,11%, utilizando concentrações de 50%, 100% e 150% para os quatro marcadores. Porém para a Teobromina o método não mostrou exatidão, como está demonstrado na tabela 18.

Tabela 14. Resultados da Exatidão 50%, 100% e 150% do método por CLAE para quantificação de Teofilina em cápsulas contendo Guaraná.

% da Amostra	AMOSTRA	Área	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Recuperação (%)
50%	1	3380	0,1278	98,36
	2	3483	0,1318	101,54
	3	3285	0,1359	104,62
		Média	0,1318	101,51
		DP	0,0041	3,13
		DPR	3,07	3,08
100%	1	6775	0,2628	101,15
	2	6594	0,2556	98,36
	3	6743	0,2615	100,67
		Média	0,2600	100,06
		DP	0,0038	1,49
		DPR	1,47	1,49
150%	1	10250	0,4010	102,88
	2	10145	0,3968	101,83
	3	10298	0,4029	103,37
		Média	0,4002	102,70
		DP	0,0031	0,78
		DPR	0,77	0,76

Para a Teofilina o método se mostrou exato com valores de recuperação para as concentrações de 50%, 100% e 150%, variando entre 98,36% a 104,62%, e DPR(%) das três concentrações utilizadas, com valores inferiores a 5%.

Tabela 15. Resultados da Exatidão a 50%, 100% e 150% do método por CLAE para quantificação de Cafeína em cápsulas contendo Guaraná.

% da Amostra	AMOSTRA	Área	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Recuperação (%)
50%	1	172925	6,94	95,36
	2	172440	7,05	96,90
	3	179718	7,23	99,31
		Média	7,07	97,19
		DP	0,15	1,99
		DPR	2,07	2,05
100%	1	350238	14,64	100,69
	2	357598	14,96	102,75
	3	350356	14,64	100,69
		Média	14,75	101,38
		DP	0,18	1,19
		DPR	1,25	1,17
150%	1	495836	20,96	96,21
	2	490426	20,73	95,18
	3	534181	22,63	103,61
		Média	21,44	98,33
		DP	1,04	4,60
		DPR	4,84	4,68

Para a Cafeína os valores de recuperação para as concentrações de 50%, 100% e 150%, variaram de 95,18% a 103,61% e o DPR (%) das três concentrações, foi inferior a 5%.

Para a Catequina os valores de recuperação para as concentrações de 50%, 100% e 150%, variaram de 95,76% a 102,44% e o DPR (%) das três concentrações, foi inferior a 5%.

Tabela 16. Resultados da Exatidão a 50%, 100% e 150% do método por CLAE para quantificação de Catequina em cápsulas contendo Guaraná.

% da Amostra	AMOSTRA	Área	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Recuperação (%)
50%	1	7233	1,01	98,78
	2	7807	1,07	103,66
	3	7759	1,06	103,66
		Média	1,05	102,03
		DP	0,03	2,82
		DPR	3,07	2,76
100%	1	17382	2,01	95,76
	2	17860	2,05	100,00
	3	17994	2,07	101,22
		Média	2,04	99,59
		DP	0,03	1,86
		DPR	1,50	1,87
150%	1	28954	3,14	102,44
	2	27277	2,98	96,34
	3	27951	3,04	98,78
		Média	3,05	99,19
		DP	0,08	3,07
		DPR	2,65	3,10

Para a Epicatequina os valores de recuperação para as concentrações de 50%, 100% e 150%, variaram de 95,89% a 104,86% e o DPR (%) das três concentrações, foi inferior a 5%.

Tabela 17. Resultados da Exatidão 50%, 100% e 150% do método por CLAE para quantificação de Epicatequina em cápsulas contendo Guaraná.

% da Amostra	AMOSTRA	Área	Concentração (µg/mL)	Recuperação (%)
50%	1	5912	0,95	104,11
	2	5625	0,92	100,00
	3	6087	0,96	104,86
		Média	0,94	102,99
		DP	0,02	2,62
		DPR	2,21	2,54
100%	1	13718	1,76	95,89
	2	13878	1,77	97,26
	3	13926	1,78	97,26
		Média	1,77	96,80
		DP	0,01	0,79
		DPR	0,56	0,82
150%	1	22595	2,68	97,87
	2	23678	2,80	101,98
	3	23864	2,81	102,74
		Média	2,76	100,86
		DP	0,07	2,62
		DPR	2,62	2,60

Quando o ensaio de recuperação foi aplicado a Teobromina (Tabela 18) observamos, que os valores das áreas dos picos, tanto para concentração de 50%, quanto 100% foram semelhantes, suspeitamos que em concentrações abaixo de 100% ultrapassamos o limite mínimo de quantificação (próximo a 200%), que é a menor quantidade do analito que pode ser quantitativamente determinada com precisão e exatidão (BRASIL, 2003; ICH Q2, 2005), conceito diferente do limite de detecção, que é a menor quantidade do analito presente na amostra que pode ser detectado, mas não quantificado (BRASIL, 2003).

Para a Teobromina, o método não foi exato, mas preciso como demonstrado nas tabelas 4 e 9. Os dois conceitos podem as vezes ser confundidos, mas o que deve ficar esclarecido é que a precisão mede o quão bem os resultados obtidos se assemelham entre si, já a exatidão mede o quanto o valor obtido se assemelha ao valor tido como verdadeiro.

Tabela 18. Resultados da Exatidão 50%, 100% e 150% do método por CLAE para quantificação de Teobromina em cápsulas contendo Guaraná.

% da Amostra	AMOSTRA	Área	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Recuperação (%)
50%	1	1662	0,0379	204,73
	2	1513	0,0351	189,19
	3	1599	0,0367	198,65
		Média	0,0366	197,52
		DP	0,0014	7,83
		DPR	3,84	3,96
100%	1	1599	0,0367	99,32
	2	1594	0,066	98,65
	3	1556	0,0359	92,29
		Média	0,0364	96,75
		DP	0,0002	3,87
		DPR	1,04	4,01
150%	1	6680	0,1324	238,51
	2	6276	0,1248	225,00
	3	6868	0,1360	245,27
		Média	0,1311	236,26
		DP	0,0057	10,32
		DPR	4,36	4,37

4.2.2.5 Robustez

Para avaliar a robustez do método, foi utilizado o mesmo equipamento e coluna cromatográfica, mas com alterações nas condições cromatográficas, como a mudança do fluxo da fase móvel, utilizando fluxo de 0,8, 1,0 e 1,2 mL/min, e mudança no comprimento de onda, com leituras em 272, 274 e 276 nm.

O método foi robusto para as variações de comprimento de onda e variações do fluxo para os quatro marcadores avaliados (Teofilina, Cafeína, Catequina e Epicatequina).

As tabelas 19 e 20 detalham os resultados da robustez do método na quantificação da Teofilina. Os valores de DPR obtidos estão dentro dos limites preconizados (<5%), confirmando a robustez do método.

Tabela 19. Resultados da robustez do método por CLAE para quantificação de Teofilina em cápsulas contendo Guaraná, variando o comprimento de onda de leitura.

λ (nm)	AMOSTRA	Área	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	% Teofilina
272	1	7208	0,2800	0,1120
	2	7335	0,2851	0,1140
	3	6845	0,2656	0,1062
274	1	6775	0,2628	0,1051
	2	6594	0,2556	0,1022
	3	6743	0,2615	0,1046
276	1	6812	0,2643	0,1057
	2	6511	0,2523	0,1009
	3	7013	0,2722	0,1088
		Média	0,2666	0,1066
		DP	0,0108	0,0043
		DPR	4,03	4,03

Tabela 20. Resultados da robustez do método por CLAE para quantificação de Teofilina em cápsulas contendo Guaraná, variando o fluxo da fase móvel.

Fluxo (mL/min)	AMOSTRA	Área	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	% Teofilina
0,8	1	6511	0,2523	0,1009
	2	6847	0,2657	0,1062
	3	6769	0,2626	0,1050
1,0	1	6594	0,2556	0,1022
	2	6743	0,2615	0,1046
	3	6775	0,2628	0,1051
1,2	1	6657	0,2581	0,1032
	2	6812	0,2643	0,1057
	3	6656	0,2581	0,1032
		Média	0,2601	0,1040
		DP	0,0044	0,0017
		DPR	1,68	1,68

Na quantificação de Cafeína o método também se apresentou robusto com valores de DPR menores de 5%, para variações no comprimento de onda e fluxo da fase móvel (Tabela. 21 e 22).

Tabela 21. Resultados da robustez do método de quantificação de Cafeína em cápsulas contendo Guaraná, por CLAE, variando o comprimento de onda de leitura.

λ (nm)	AMOSTRA	Área	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	% Cafeína
272	1	354148	14,81	5,92
	2	347278	14,51	5,80
	3	358126	14,98	5,99
274	1	365509	15,30	6,12
	2	349183	14,59	5,84
	3	348582	14,57	5,83
276	1	353066	14,76	5,90
	2	348054	14,54	5,82
	3	339265	14,16	5,66
		Média	14,69	5,88
		DP	0,32	0,13
		DPR	2,20	2,20

Tabela 22. Resultados da robustez do método de quantificação de Cafeína em cápsulas contendo Guaraná, por CLAE, variando o fluxo da fase móvel.

Fluxo (mL/min)	AMOSTRA	Área	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	% Cafeína
0,8	1	367509	15,39	6,16
	2	338073	14,11	5,64
	3	345181	14,42	5,77
1,0	1	365509	15,30	6,12
	2	349183	14,59	5,84
	3	348582	14,57	5,83
1,2	1	359272	15,03	6,01
	2	343123	14,33	5,73
	3	340569	14,22	5,69
		Média	14,66	5,87
		DP	0,47	0,19
		DPR	3,19	3,21

Para a Catequina, as tabelas 23 e 24, demonstram os resultados da robustez do método, com valores de DPR menores de 5% para o dois parâmetros avaliados.

Tabela 23. Resultados da robustez do método de quantificação de Catequina em cápsulas contendo Guaraná, por CLAE, variando o comprimento de onda de leitura.

λ (nm)	AMOSTRA	Área	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	% Catequina
272	1	15822	1,85	0,74
	2	17408	2,01	0,80
	3	16231	1,89	0,76
274	1	17418	2,01	0,80
	2	16672	1,94	0,77
	3	16741	1,94	0,78
276	1	17918	2,06	0,82
	2	17596	2,03	0,81
	3	16590	1,93	0,77
		Média	1,96	0,78
		DP	0,07	0,03
		DPR	3,49	3,49

Tabela 24. Resultados da robustez do método de quantificação de Catequina em cápsulas contendo Guaraná, por CLAE, variando o fluxo da fase móvel.

Fluxo (mL/min)	AMOSTRA	Área	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	% Catequina
0,8	1	15861	1,86	0,74
	2	14808	1,75	0,70
	3	15987	1,87	0,75
1,0	1	17418	2,01	0,80
	2	16672	1,94	0,77
	3	16741	1,94	0,78
1,2	1	16739	1,94	0,78
	2	16098	1,88	0,75
	3	15789	1,85	0,74
		Média	1,89	0,76
		DP	0,07	0,03
		DPR	3,93	3,91

Os resultados de robustez para a Epicatequina estão demonstrados na tabelas 25 e 26.

Tabela 25. Resultados da robustez do método de quantificação de Epicatequina em cápsulas contendo Guaraná, por CLAE, variando o comprimento de onda de leitura.

λ (nm)	AMOSTRA	Área	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	% Epicatequina
272	1	13936	1,78	0,71
	2	13744	1,76	0,70
	3	13446	1,73	0,69
274	1	13605	1,74	0,69
	2	14729	1,86	0,74
	3	13981	1,78	0,71
276	1	13872	1,77	0,71
	2	13049	1,69	0,68
	3	13280	1,71	0,68
		Média	1,76	0,70
		DP	0,05	0,02
		DPR	2,81	2,71

Tabela 26. Resultados da robustez do método de quantificação de Epicatequina em cápsulas contendo Guaraná, por CLAE, variando o fluxo da fase móvel.

Fluxo (mL/min)	AMOSTRA	Área	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	% Epicatequina
0,8	1	14129	1,80	0,72
	2	13812	1,76	0,71
	3	14456	1,83	0,73
1,0	1	13605	1,74	0,69
	2	14729	1,86	0,74
	3	13981	1,78	0,71
1,2	1	14013	1,79	0,72
	2	14569	1,84	0,74
	3	15683	1,96	0,78
		Média	1,82	0,73
		DP	0,07	0,03
		DPR	3,62	3,51

4.2.3 Análise do teor de teofilina, cafeína, catequina e epicatequina em cápsulas e comprimidos de guaraná em pó por CLAE.

O preparo da amostra para análise dos marcadores foi realizada de acordo com o item 3.5.3., tanto para os comprimidos, quanto para as cápsulas. A quantidade de pó de guaraná foi pesada de acordo com cálculo descrito nos itens 4.1.2 e 4.1.3.

As injeções da amostra foram realizadas em triplicata. O cálculo das concentrações de teofilina, cafeína, catequina e epicatequina foi feito a partir da média das três corridas cromatográficas. O cálculo do teor de marcadores foi feito utilizando a equação da reta de cada marcador (figuras. 15, 16, 17 e 18) e a fórmula descrita no item 3.4.5.2 sendo o fator de diluição 1000.

As tabelas 27, 28 e 29 mostram os teores de cada marcador nas cápsulas A e B e no comprimido A, respectivamente.

Tabela 27. Teor de Teofilina, cafeína, catequina e epicatequina quantificadas por CLAE na cápsula A.

Marcador	Área média	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Teor do marcador (%)
Teofilina	2711	0,1011	0,0404
Cafeína	393565	16,52	6,61
Catequina	24671	2,72	1,09
Epicatequina	22862	2.70	1,08

A concentração de metilxantinas encontrada na amostra foi 0,0404% de teofilina e 6,61% de cafeína. As quantidades de metilxantinas isoladamente quantificadas por este método esta próximo aos valores citados por Simões *et al.*, 2003.

Tabela 28. Teor de Teofilina, cafeína, catequina e epicatequina quantificadas por CLAE na cápsula B.

Marcador	Área média	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	%
Teofilina	6703	0,2599	0,1039
Cafeína	348134	14,70	5,88
Catequina	17735	2,04	0,82
Epicatequina	14494	1,84	0,73

Tabela 29. Teor de Teofilina, cafeína, catequina e epicatequina quantificadas por CLAE no comprimido A.

Marcador	Área média	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	%
Teofilina	7987	0,3110	0,0888
Cafeína	51578	21,82	6,23
Catequina	*nd	*nd	*nd
Epicatequina	*nd	*nd	*nd

*nd – Não detectado

As tabelas demonstram teores dentro dos padrões especificados pelo método espectrofotométrico descritos na literatura para cafeína em matéria-prima, sendo que para catequina e epicatequina não foram encontrados dados para o guaraná em

pó. A tabela 30 sintetiza os teores encontrados para as três formas farmacêuticas analisadas.

Tabela 30. Teor de Teofilina, cafeína, catequina e epicatequina quantificadas por CLAE na cápsula A e B e no comprimido A.

AMOSTRA	% Teofilina	% Cafeína	% Catequina	% Epicatequina
Cápsula A	0,0402%	6,61%	1,08%	1,07%
Cápsula B	0,1039%	5,82%	0,82%	0,73%
Comprimido A	0,0888%	6,23%	*Nd	*Nd

*Nd – Não detectado

Observa-se pela análise das tabelas que no comprimido não foi detectado a presença de catequina e epicatequina (Figura 19) fator preocupante, visto que os compostos fenólicos são marcadores que devem estar presentes no pó de guaraná. Esse resultado permite sugerir a má qualidade desse medicamento e uma possível adulteração do fitoterápico, neste caso pela prática da sofisticação, ou seja, adição de cafeína e teofilina sintética em um pó de guaraná de qualidade ruim (SHARAPIN, 2000).

As sofisticações constituem uma pratica mais difícil de serem detectadas. Normalmente, ocorrem pela adição, a plantas medicinais ou fitoterápicos com baixo teor de princípios ativos, substâncias sintéticas ou naturais de estrutura semelhante a do principio ativo, com o objetivo de “enganar” o controle de qualidade. Tem sido detectado, por exemplo, adição de rutina a extratos de *Ginkgo biloba* e de cafeína sintética em extratos de Guaraná (LEITE; ROCHA, 2009)

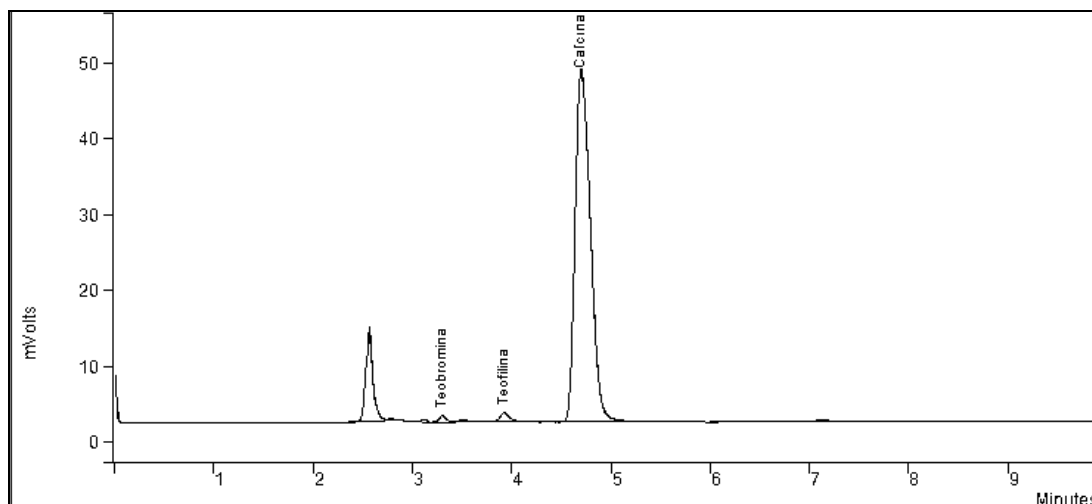


Figura 19. Cromatograma da amostra de guaraná comprimidos. Condições cromatográficas: fase móvel composta por água, acetonitrila, metanol, acetato de etila e ácido acético (89:6:1:3:1), em eluição isocrática, fluxo de 1 mL/min, coluna Varian® C18 250 x 4,6 mm, 5 µm, e detector a 274 nm

O método por CLAE proposto no presente trabalho mostrou-se preciso, linear, seletivo, exato e robusto, para quatro marcadores presentes no guaraná – teofilina, cafeína, catequina e epicatequina.

Para análise de taninos, o método espectrofotométrico, de absorção na região do visível, necessita de reações de cor anteriores que tornam o método trabalhoso e demorado. Este método é apropriado para análise de metilxantinas e taninos quando não se tem acesso a métodos que utilizam equipamentos de custo elevado como por ex., a CLAE.

Mesmo o método por CLAE proposto não sendo exato para teobromina, ele apresenta algumas vantagens em relação ao método proposto pela farmacopéia. O método identifica e quantifica cada marcador separadamente, sendo mais seletivo e preciso, além de que, para o propósito que foi desenvolvido ele tem a vantagem de quantificar os marcadores em uma mesma corrida cromatográfica em apenas 15 minutos.

4.3 ENSAIO DE DISSOLUÇÃO

4.3.1 Determinação dos parâmetros para procedimento dos ensaios de dissolução

Com todos os trabalhos de dissolução citados, como por exemplo o trabalho realizado por Taglioli *et al.* (2001), Westerhoff *et al.* (2002), Sitichai *et al.* (2007), Kressmann *et al.* (2002), Bempong *et al.* (1992), nota-se que a caracterização biofarmacêutica, de um produto de origem natural, através do teste de dissolução pode ser realizada, com o uso da metodologia geral descrita nas farmacopéias, desde que se conheça o princípio ativo responsável pela atividade terapêutica. Com o ajuste das condições do experimento, do meio de dissolução e o uso de agentes surfactantes em alguns casos, a análise do perfil de dissolução de fitoterápico trará resultados relevantes para análises biofarmacêuticas.

O trabalho realizado com cápsulas de Guaraná por Bempong *et al.* (2002), visou comparar a dissolução de cápsulas de guaraná, com cápsulas de cafeína. Neste estudo houve a utilização de meio com pH 2 e pH 6,8 e foi verificado a dissolução da cafeína em ambos em 90 minutos de teste com rotação de 100 rpm. E volume do meio de 500 mL. Porém ele utilizou 5 cápsulas por cuba, o que pode ter levado a saturação do meio, e a obtenção de resultados insatisfatórios, incondizentes com o comportamento *in vivo*.

Após a análise dos resultados dos ensaios preliminares, variando-se os parâmetros citados no item 3.6.1, foram selecionados aqueles que forneceram os dados mais consistentes a respeito da dissolução das cápsulas.

Inicialmente foi realizado ensaios com velocidade de rotação de 100 rpm e foi detectado uma rápida dissolução dos marcadores no meio de dissolução (em 5 minutos de teste, cerca de 100% dos marcadores já haviam sido dissolvidos), o que para o propósito do trabalho não é recomendável visto que, se quer avaliar o perfil de dissolução. Foi utilizado então a velocidade de 50 rpm e observou-se que em cerca de 30 minutos de teste o conteúdo total da cápsula ainda não havia sido liberado. Utilizamos então a velocidade de 75 rpm e observamos a liberação dos marcadores em menos de 30 minutos e uma visualização melhor do comportamento de dissolução das cápsulas.

O volume do meio foi definido, visando uma quantificação exata dos marcadores (mesmo em pequenas concentrações) e a não saturação do meio. O volume apropriado do meio depende principalmente da solubilidade do fármaco, de forma a minimizar o gradiente de concentração e garantir condição *sink* (volume de 5 a 10 vezes o necessário para saturação) do meio (MARCOLONGO, 2003). Visto que a forma farmacêutica testada contém um fitocomplexo, a escolha do volume ideal foi feita baseada nos testes preliminares, onde um volume de 500 mL, apresentou menor liberação dos marcadores (provavelmente pela saturação do meio) e o volume de 900 mL apresentou uma maior liberação dos mesmos.

Para a escolha do aparato, observou-se uma velocidade de dissolução menor quando da utilização de cestas e quando da realização do teste em dias diferentes, verificamos que os resultados, não tinham repetibilidade. Neste aparato pode ocorrer bloqueio parcial das aberturas da cesta durante o teste de dissolução devido a deposição de filme de revestimento ou outros materiais, podendo levar a resultados incorretos (MARCOLONGO, 2003). Frente a estes fatores foi escolhido o aparato pá para o ensaio de dissolução das cápsulas de guaraná em pó.

Quando se utiliza a pá como aparato, as cápsulas tendem a flutuar no meio contido nas cubas; para contornar este problema, recomenda-se o uso de afundadores, feitos de material inerte, que não interfiram nos resultados do teste. No método utilizado neste trabalho foi necessário a utilização de um afundador de aço inoxidável, sendo este um dispositivo que envolvia a cápsula de maneira a não interferir no resultado final.

Com relação ao meio de dissolução (HCl 0,1 M pH 1,2, Tampão fosfato monopotássico pH 6,8 e água), não foram encontradas diferenças acentuadas nos testes realizados com os três meios. Considerando que as cápsulas são de liberação imediata e o estômago é o local mais provável para liberação do seu conteúdo, utilizou-se como meio de dissolução HCl 0,1 M pH 1,2, por este simular o meio gástrico.

Todos os marcadores avaliados são solúveis em solução aquosa, sendo a Teobromina levemente solúvel em água fria. (BRITISH PHARMACOPEA, 2007; USP 30; SIMÕES *et al*, 2004; GENNARO, 1999).

A figura 20 mostra o perfil de dissolução de cápsulas de guaraná de 550 mg utilizando cafeína como marcador, nas condições citadas.

Após análise dos perfis de dissolução para cafeína nas várias condições propostas, optou-se por utilizar as condições descritas no quadro 3 para a avaliação do comportamento de dissolução de cápsulas e comprimidos de guaraná em pó

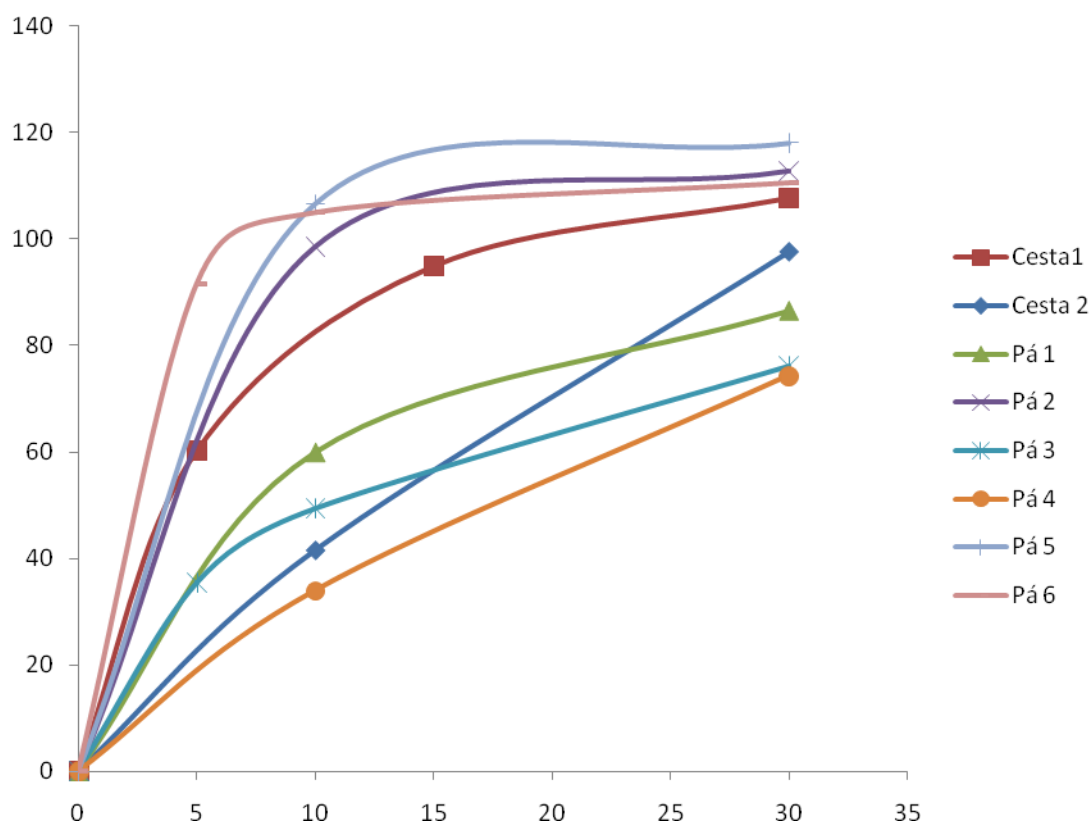


Figura 20. Perfis de dissolução de cápsulas contendo pó de guaraná 550 mg, utilizando cafeína como marcador, após 30 minutos de teste, utilizando as condições preliminares do teste. Cesta 1: Aparato cesta, 100 rpm, HCl 900 mL; Cesta 2: aparato cesta, 100 rpm, HCl 500 mL; Pá 1: aparato pá, 75 rpm, HCl 500 mL; Pá 2: aparato pá, 75 rpm, HCl 900 mL; Pá 3: aparato pá, 50 rpm, HCl 900 mL; Pá 4: aparato pá, 100 rpm HCl 500 mL; Pá 5: aparato pá, 100 rpm, HCl 900 mL; Pá 6: aparato pá, 75 rpm Tampão 900 mL.

Temperatura	37 °C ± 0,5 °C
Sistema de agitação	Aparato 2 (pá)
Velocidade	75 rpm
Meio de dissolução	HCl 0,1 N pH 1,2
Volume do meio	900 mL
Alíquota amostrada	3 mL
Tempo de amostragem	0, 5, 10 e 30 min
Quantificação	CLAE (metodologia validada)

Quadro 3. Parâmetros utilizados para avaliar o comportamento de dissolução de cápsulas e comprimidos a base de *Paullinia cupana* Kunth.

Alguns fatores devem ser controlados, pois possuem relevância no desenvolvimento de um teste: posição e controle do agitador, volume, temperatura e pH do meio, alíquota de amostragem e local de retirada da alíquota, presença de bolhas de ar no meio de dissolução e método de quantificação final. A determinação dos parâmetros adequados para a realização do ensaio de dissolução é de extrema importância para a realização de um teste com resultados precisos e confiáveis.

4.3.2 Validação do método de dissolução utilizado

Após selecionados os parâmetros considerados mais adequados para a realização dos testes, o método de dissolução foi validado através do ensaio de precisão por meio da repetibilidade utilizando cápsulas de 550 mg e para os quatro marcadores – Teofilina, Cafeína, Catequina e Epicatequina, com alíquotas sendo retiradas no tempo de 30 minutos. Os resultados da repetibilidade estão demonstrados nas Tabelas 31, 32, 33 e 34.

O teste de dissolução é classificado, segundo sua finalidade, em teste de categoria III (BRASIL, 2003), sendo portanto, necessário para sua validação o ensaio de precisão por meio da repetibilidade. Os valores de DPR no ensaio foram inferiores a 5%, o que certifica a precisão do método.

Tabela 31. Resultados da repetibilidade do método de dissolução de cápsulas contendo Guaraná para Teofilina.

AMOSTRA	Área	Concentração (µg/mL)	% Teofilina
1	15574	0,6128	0,1002
2	15327	0,6029	0,0986
3	14761	0,5804	0,0949
4	15067	0,5926	0,0969
5	15890	0,6253	0,1023
6	15392	0,6055	0,0990
	Média	0,6032	0,0986
	DP	0,01	0,0023
	DPR	2,36	2,37

Tabela 32. Resultados da repetibilidade do método de dissolução de cápsulas contendo Guaraná para Cafeína.

AMOSTRA	Área	Concentração (µg/mL)	% Cafeína
1	870955	37,26	6,09
2	894122	38,26	6,26
3	874938	37,43	6,12
4	892976	38,21	6,25
5	902864	38,64	6,32
6	897919	38,43	6,29
	Média	38,03	6,22
	DP	0,51	0,08
	DPR	1,34	1,38

Tabela 33. Resultados da repetibilidade do método de dissolução de cápsulas contendo Guaraná para Catequina.

AMOSTRA	Área	Concentração (µg/mL)	% Catequina
1	54586	5,65	0,92
2	50612	5,26	0,86
3	52079	5,40	0,88
4	51981	5,39	0,88
5	54802	5,67	0,92
6	50253	5,22	0,85
	Média	5,43	0,88
	DP	0,17	0,02
	DPR	3,20	3,04

Tabela 34. Resultados da repetibilidade do método de dissolução de cápsulas contendo Guaraná para Epicatequina.

AMOSTRA	Área	Concentração (µg/mL)	% Epicatequina
1	39981	4,48	0,73
2	39602	4,44	0,73
3	41104	4,60	0,75
4	41518	4,64	0,76
5	39971	4,48	0,73
6	35860	4,06	0,66
	Média	4,45	0,72
	DP	0,18	0,03
	DPR	4,23	4,39

4.3.3 Ensaio de dissolução de cápsulas e comprimidos a base de *Paullinia cupana* Kunth.

Foram realizados ensaios de dissolução com as cápsulas A e B, com o comprimido A e com a cápsula de gelatina mole.

As figuras 20, 21 e 22 mostram o perfil de dissolução da cápsula A, B e o comprimido A, respectivamente, avaliada para os marcadores, teofilina, cafeína, catequina e epicatequina.

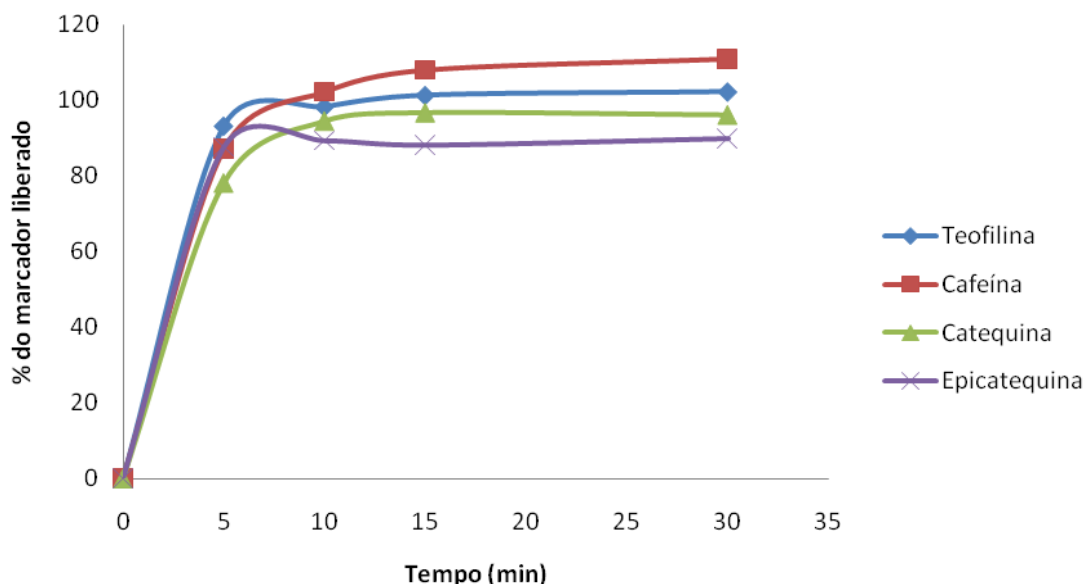


Figura 21. Comportamento de dissolução da Cápsula A, contendo 550 mg de pó de guaraná, avaliada para quatro marcadores: teofilina (azul), cafeína (vermelho), catequina (verde) e epicatequina (roxo).

A análise dos gráficos do comportamento de dissolução das cápsulas A e B e do comprimido, demonstram que todos os marcadores presentes, encontram-se dissolvidos em mais de 80%, no tempo de 10 minutos.

A cápsula de gelatina mole testada, não apresentou desintegração no meio ácido utilizado, mantendo-se intacta após uma hora de teste, fato que impossibilitou a quantificação dos marcadores. Uma alternativa para a dissolução destas cápsulas, seria a utilização de outros meios, como por exemplo meios adicionados de tensoativos, que fizessem a cápsula abrir e proporcionar a quantificação.

Podemos observar que para a catequina e a epicatequina o teor dissolvido no meio encontrado para as três formas farmacêuticas foi menor que o teor de teofilina e cafeína, mas esta dentro do critério de aceitação geral, visto que para fitoterápico não há critério estabelecido, pois no tempo de 30 minutos, mais de 80% encontra-se dissolvido.

O estudo realizado visou encontrar parâmetros mais adequados para avaliação do comportamento de dissolução de formas farmacêuticas a base de guaraná em pó, utilizando quatro marcadores, porém conseguir uma condição ideal para os quatro marcadores é difícil. Sendo assim, optamos por estabelecer parâmetros que contemplassem os quatro marcadores e que também destacasse a análise da cafeína no ensaio de dissolução, pois é o marcador em maior concentração e o uso popular do guaraná está mais relacionado ao seu conteúdo de cafeína, pela ação revigorante.

Westerhoff et al. (2002), fizeram um estudo de dissolução com erva de São João (*Hypericum perforatum*), em que utilizou 6 marcadores da planta, que possuem ação como antidepressivos. Uma vez que os marcadores possuem polaridades e solubilidades bastante diferentes, portanto uma condição que fosse ideal para os seis marcadores não foi possível.

No caso deste estudo com o guaraná, os marcadores possuem solubilidades e polaridades semelhantes, por isso não houve muita diferença de dissolução entre os marcadores avaliados.

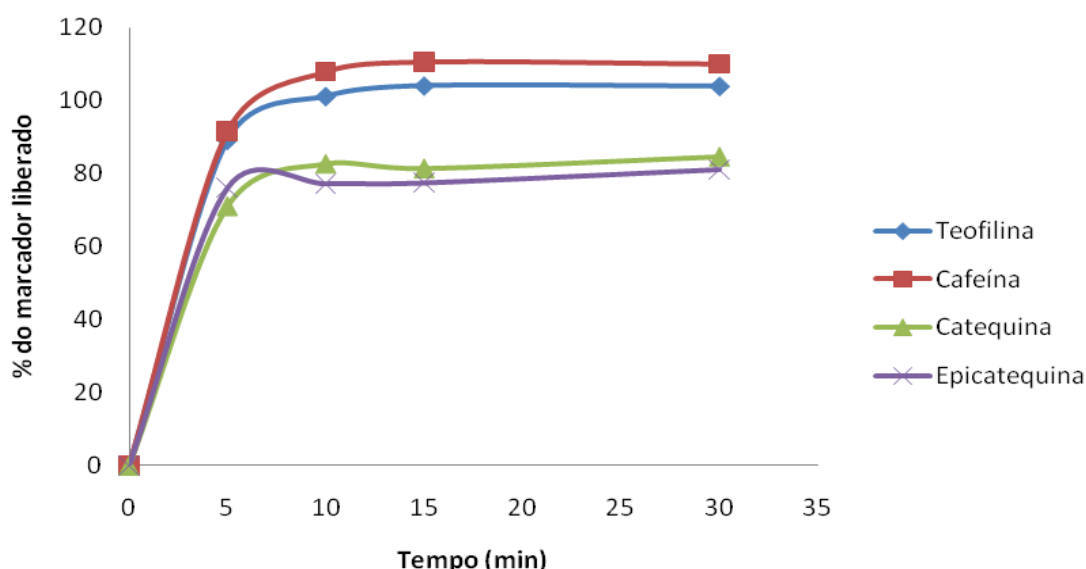


Figura 22. Comportamento de dissolução da Cápsula B, contendo 550 mg de pó de guaraná, avaliada para quatro marcadores: teofilina (azul), cafeína (vermelho), catequina (verde) e epicatequina (roxo).

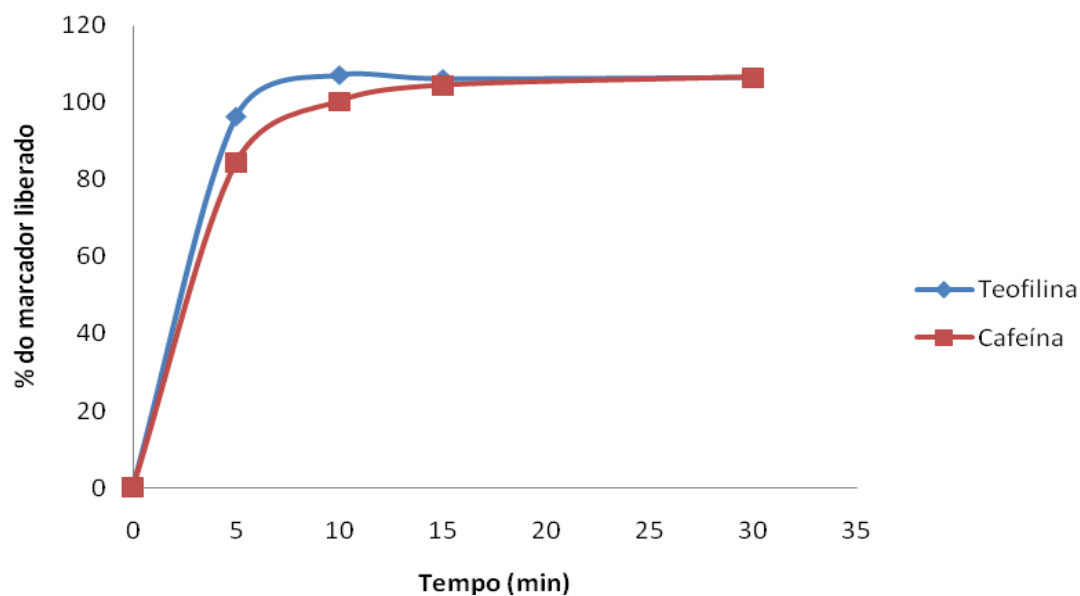


Figura 23. Comportamento de dissolução do Comprimido A, contendo 250 mg de pó de guaraná, avaliada para dois marcadores: teofilina (azul) e cafeína (vermelho).

Considerando os critérios de aceitação adotados, as cápsulas e o comprimido estão em conformidade. Foram considerados em conformidade no ensaio de dissolução aquelas amostras que após 30 minutos de ensaio apresentaram um mínimo de 75% a 80% de marcadores dissolvidos no meio.

5. CONCLUSÕES

- O método analítico aplicado para quantificação de teofilina, cafeína, catequina e epicatequina em cápsulas contendo pó de guaraná (*Paullinia cupana* Kunth.), por CLAE, foi validada demonstrando seletividade, linearidade e intervalo, precisão (repetibilidade e intermediária), exatidão e robustez.
- A técnica de dissolução foi adequada para testes de dissolução de cápsulas e comprimidos a base de guaraná em pó, nas condições testadas.
- A metodologia de dissolução aplicada para as cápsulas foi validada através do parâmetro de repetibilidade, utilizando os quatro marcadores: teofilina, cafeína, catequina e epicatequina.
- As cápsulas de gelatina dura e o comprimido a base de pó de guaraná, alcançaram o valor próximo de 100% de dissolução nos primeiros 10 minutos.
- A cápsula de gelatina mole utilizada, não solubilizou no meio testado, sendo necessária a utilização de outros meios para avaliar o perfil desta cápsula.
- Para a teobromina não constatamos exatidão nas condições experimentais adotadas.
- Tanto a metodologia de quantificação por CLAE, quanto a metodologia de dissolução, podem ser aplicadas para comprimidos a base de guaraná em pó, produzindo resultados coerente.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, A. B.; BRAGAGNOLO, N. Determinação simultânea de teobromina, teofilina e cafeína em chás por cromatografia líquida de alta eficiência. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.38, n.2, p. 237-243, abr./jun., 2002.

AMOROZO, M. C. M. Abordagem etnobotânica na pesquisa de plantas medicinais. In: Di STASI, L. C. **Plantas medicinais: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo: Editora da UNESP, p. 47-68, 1996.

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN JR, L. V. **Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Farmacos**. 6. Ed., Baltimore: Editorial Premier, 2000. 568 p.

ANTONELLI-USHIROBIRA, T. M.; YAMAGUTI, E.; UHEMURA, L. M.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P.; PALAZZO DE MELLO, J. C. Chemical and Microbiological Study of Extract from Seeds of Guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*). **Latin American Journal of Pharmacy**, n. 26(1), p. 5-9, 2007.

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

ARAGÃO, N. M.; VELOSO, M. C. C.; BISPO, M. S.; FERREIRA, S. L. C.; ANDRADE, J. B. Multivariate optimisation of the experimental conditions for determination of three methylxanthines by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Talanta**, v.67, p. 1007-1013, 2005.

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.

BARATA L. E. S. Empirismo e ciência: fonte de novos fitomedicamentos. **Ciência e Cultura**, n. 4(57), p. 4-5, 2005.

BEMPONG, D. K.; HOUGHTON, P. J. Dissolution and absorption of caffeine from guaraná. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.44, p. 769-771, 1992.

BRASIL, Decreto nº 5813, de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 13 jan. 2007.

BRASIL, RDC nº 48, de 16 de março de 2004a. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 13 dez.2006.

BRASIL, RE nº 89, de 16 de março de 2004b. Determina a publicação da “Lista de registro simplificado de fitoterápicos”. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em 28 de dez. 2007.

Brasil, RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 13 dez.2006.

BRASIL. Programa de Biotecnologia e Recursos Genéticos – Definição de Metas. Brasília: Departamento de Programas Temáticos, Secretaria de políticas e Programas de Ciência e Tecnologia, Ministério da Ciência e Tecnologia, 2002.

BRASIL, Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS), 2008. Disponível em: www.saude.gov.br/renisus. Acesso em: 27 maio 2009.

BUSSE, W. The significance of quality for efficacy and safety of herbal medicinal products. **Drug Information Journal**, v.34, p. 15-23, 2000.

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.

CARLSON, M.; THOMPSON, R. D. Liquid Chromatographic determination of methylxanthines and catechins in herbal preparations containing guaraná. **Journal of AOAC International**, v.81, n.4, 1998.

CARVALHO, A. C. B.; NUNES, D. S. G.; BARATELLI, T. G.; SHUQAIR, N. S. M. S. A. Q.; NETTO, E. M. Aspectos da legislação no controle de medicamentos fitoterápicos. **T&C Amazônia**, ano V, n.11, p. 26-32, 2007.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas: Editora da Unicamp, 2006.

DE MARIA, C. A. B.; MOREIRA, R. F. A. Cafeína: Revisão sobre métodos de análise. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 99-105, 2007.

EMA (The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products). Points to consider on the Biopharmaceutical Characterisation of herbal Medicinal Products. 2003. Disponível em: <http://www.emea.eu.int>. Acesso em: 18 nov. 2006.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA IV ed. Brasil, 1988.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. Parte II, Quinto Fascículo, 4. ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2003.

FERREIRA, D.; SLADE, D. Oligomeric proanthocyanidins: naturally occurring O-heterocycles. **Nat. Prod. Rep.**, n.19, p. 517-541, 2002.

FISHER, D. C. H. Controle de Qualidade de Fitoterápicos, In: GIL, E. S. **Controle Físico-Químico de Qualidade de Medicamentos**. 2 ed. São Paulo: Editora Pharmabooks, p. 289-327, 2007.

GENNARO, A. R. **Remington Farmácia**. 19 ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana, v. 2, 1999.

GNOATTO, S. C. B.; BASSANI, V. L.; COELHO, C. G.; SCENKEL, E. P. Influência do método de extração nos teores de metilxantinas em erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. ST.-Hil., Aquifoliaceae). **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 304-307, 2007.

GUILLAUME, Y.; GUINCHARD, C. Method to study the separation of eight p-hydroxybenzoic esters by gas chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 727, p. 93-96, 1995.

HAGERMAN, A. E., Tannin chemistry, 2001. Disponível em: <http://users.muohio.edu/hagemae>. Acesso em 24 dez. 2006.

HEARD C. M., JOHNSON S., MOSS G., THOMAS C. P. In vitro transdermal delivery of caffeine, theobromine, theophylline and catechin from extract of Guarana, *Paullinia cupana*. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 317, p.26-31. 2006.

HEARD C. M., JOHNSON S., MOSS G., THOMAS C. P. In vitro transdermal delivery of caffeine, theobromine, theophylline and catechin from extract of Guarana, *Paullinia cupana*. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 317, p.26-31. 2006.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL – INMETRO. DOQ-CGCRE-008: Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. Brasil, 2003. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/kits/doqcgcre008r01.pdf>. Acesso em: 15 março 2009.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH) Q2. Validation of analytical Procedures: Text and Methodology, 2005 Disponível em: <http://www.ich.org>. Acesso em 15 março 2009.

IVANOVIC, D.; MEDENICA, M.; NIVAUD-GUERNET, E.; GUERNET, M. Effect of pH on the retention behaviour of some preservatives-antioxidants in reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Chromatographia**, v.40, n.11/12, p. 652-656, 1995.

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.

LACHMAN, L.; HANNA, S. A.; LIN, K. Controle e Garantia de Qualidade. In: LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANING, J. L. **Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica**. Volume II. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, cap. 27. P. 799-1104, 2001.

LEITE, F. **Validação em análise química**. 4. ed. Campinas: Editora Átomo, 2002.

LIMA, L. R.; XAVIER, H. S.; MEIRA, J. L.; NETO, P. J. R. Desenvolvimento e validação da metodologia de quantificação gravimétrica de resina glicosídica em fitoterapicos contendo *Operculina macrocarpa* (L.) Urban. **Revista Brasileira de Farmmacognosia**, v. 16, n. 4, 2006.

LOEW, D.; KASZKIN, M. Approaching the problem of bioequivalence of herbal medicinal products. **Phytotherapy Research**, Frankfurt, v. 16, n. 8, p. 705-711, Sept. 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.

MATSUBARA, S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Teores de catequinas e Teaflavina em chás comercializados no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, n. 26(2), p. 401-407, 2006.

MORAES, M. L.; MICKE, G. A.; TAVARES, M. F. M. Separação e análise de metilxantinas em extratos de guaraná e erva-mate por eletroforese capilar. **Revista Analytica**, n.5, p. 44-50, jun/jul, 2003.

MULLER, S. D. **Determinação de alcalóides e flavonoides através de CLAE e UV de extratos de Passiflora alata Curtis, Passifloraceae – Maracujá-doce**. 2006. 91 p. Dissertação (Mestrado) – Centro de Educação de Ciências da Saúde, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, Santa Catarina, 2006.

OLIVEIRA, M. A. C.; ALBUQUERQUE, M. M.; XAVIER, H. S.; STRATTMANN, R. R.; JUNIOR, S. G.; QUEIROZ, A. T. Desenvolvimento e validação de metodologia para quantificação de alcaloides totais como berberina em fitoterápico contendo *Berberis vulgaris* L. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 3, 2006.

PENILDON, S.; **Farmacologia**. 6 ed. Rio de Janeiro: Editora: Guanabara Koogan S.A, 2002.

PINTO, T. J. A.; KANECO, T. M.; OHARA, M. T. **Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos**. 2. Ed. São Paulo: Editora Atheneu, p. 219-258, 2003.

QUEIROZ, C. R. A. A.; MORAIS, S. A. L.; NASCIMENTO, E. A. Caracterização dos taninos da Aroeira-Preta (*Myracrodruon urundeuva*). **R. Árvore**, n.4(26), p. 485-492, 2002.

QURESHI, S. A.; SHABNAM, J. Applications of new device (spindke) for improved characterization of drug release (dissolution) of pharmaceutical products. **European Journal of Pharmaceutical sciences**, v.19, p. 291-297, 2003.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E.; **Farmacognosia e Farmacobiotechnologia**. 1 ed., São Paulo: Ed. Premier, 1997.

ROCHA, L. M. Controle de Qualidade de Drogas Vegetais e Fitoterápicos, In: LEITE, J. P. V. **Fitoterapia: Bases científicas e tecnológicas** 1 ed. São Paulo: Editora Atheneu, p. 253-276, 2009.

SAITO, S. T.; WELZEL, A.; SUYENAGA, E. S.; BUENO, F. A Method for fast determination of epigallocatechin gallate (EGCG), epicatechin (EC), catechin (C) and caffeine (CAF) in green tea using HPLC. **Rev. Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26(2), p. 394-400, 2006.

SHARAPIN, N. **Fundamentos de Tecnologia de Produtos Fitoterápicos**. Santafé de Bogotá - Colombia. 2000

SIANI, A. C. **Desenvolvimento tecnológico de fitoterápicos: plataforma metodológica**. Rio de Janeiro: Scriptorio, 2003. 97 p.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**, 5. ed., Porto Alegre: Editora UFRGS, 2004. 1102 p.

SITTICHA, 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.

SOMBRA, L. L.; GÓMEZ, M. R.; OLSINA, R.; MARTÍNEZ, L. D.; SILVA, M. F. Comparative study between capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography in 'guarana' based phytopharmaceuticals. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.36, p. 989-994, 2005.

SOUZA, A.; ARANTES, M. C. B. **Desenvolvimento de Metodologia para quantificação de Teobromina, Teofilina e Caféina em pó de Guaraná (*Paullinia cupana* var. *Sorbilis*) por CLAE**. Monografia (Especialização). Faculdade de Farmácia. Universidade Federal de Goiás. Goiânia, 2007.

SUZUKI, T.; ASHIARA, H.; WALLER, R. Purine and purine alkaloid metabolism in *Camellia* and *Coffea* plants. **Phytochemistry**, n.8(31), p. 2575-2584, 1992.

TAGLIOLI, V.; BILIA, A. R.; GHIARA, C.; MASSI, G.; MERCATI, V.; VINCIERI, F. F. Evaluation of the dissolution behaviour of some commercial herbal drugs and their preparations. **Die Pharmazie**, v. 56, n. 11, p. 868-870, 2001.

TOLEDO, A. C. O.; HIRAT, L. L.; BUFFON, M. C. M.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Fitoterapicos: uma abordagem farmacotécnica. **Revista Lecta**, v. 21, n. 1/2, p. 7-13, 2003.

TUROLLA, M. S. R.; NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, p. 289-306, 2006.

UNITED STATES PHARMACOPEIA, 29. Ed. Rockville: The United States Pharmacopeiasl Convention, 2006.

UNITED STATES PHARMACOPEIA, 30. ed. (USP 30) Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 2007.

UNITED STATES. Departamento of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research. Center for Biologics Evaluation and Research. Analytical Procedures and Methods Validation: Chemistry, Manufacturing, and Controls Documentation, 2000. Disponível em: <http://www.fda.gov/cder>. Acesso em 15 março de 2009.

WESTERHOFF, K.; KAUNZINGER, A.; WURGILICS, M.; DRESSMAN, J.; SHUBERT, M. Z. Biorelevant dissolution testing of St. John's wort products. **Journal of Pharmacy end Pharmacology**, v. 54, p. 1615-1621, 2002.

YAMAGUTI-SASAKI, E.; ITO, L. A.; CANTELI, V. C. D.; ANTONELLI USHIROBIRA, T. M.; UEDA-NAKAMURA, T.; FILHO, B. D.; NAKAMURA, C. V.; PALLAZO DE MELLO, J. C. Antioxidant capacity and In vitro Prevention of Dental plaque formation by extracts and Condensed Tannins of *Paullinia cupana*. **Molecules**, n. 12, p. 1950-1963, 2007.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; FILHO, V. C. Fármacos e fitoterapicos: a necessidade do desenvolvimento da industria de fitoterapicos e fitofarmacos no Brasil. **Quimica Nova**, v. 24, n. 1, 2001.