

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

TRAUDI KLEIN

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA E TECNOLÓGICA
PARA OBTENÇÃO DE COMPRIMIDOS DE *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.)**

Ducke - Sapindaceae

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello

MARINGÁ

2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

TRAUDI KLEIN

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA E TECNOLÓGICA
PARA OBTENÇÃO DE COMPRIMIDOS DE *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.)**

Ducke - Sapindaceae

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Estadual de Maringá, UEM, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello

MARINGÁ

2012

K64d Klein, Traudi
Desenvolvimento de metodologia analítica e tecnológica para obtenção de comprimidos de *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke – Sapindaceae/
Traudi Klein. – Maringá, UEM, 2012.
145 p.: il.; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello.
Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Maringá. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Maringá, 2012.

Inclui bibliografias: p.

1. Guaraná. 2. *Paullinia cupana*. 3. Medicamentos. I. Título.
II. Mello, João Carlos Palazzo de, orient. III. Universidade Estadual de Maringá.

CDD 22.ed 615.1

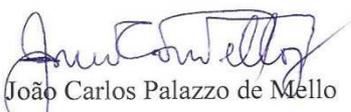
TRAUDI KLEIN

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA E
TECNOLÓGICA NA OBTENÇÃO DE COMPRIMIDOS DE *PAULLINIA*
CUPANA VAR. *SORBILIS* (MART.) DUCKE SAPINDACEAE

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciências Farmacêuticas da
Universidade Estadual de Maringá como
requisito para obtenção do título de Doutor em
Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 02 de fevereiro de 2012

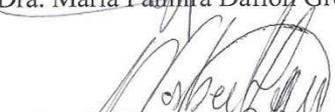
BANCA EXAMINADORA


Dr. João Carlos Palazzo de Mello


Dr. Antonio Medina Neto


Dra. Diva Sonaglio


Dra. Maria Palmira Daflon Gremião


Dr. Norberto Peporine Lopes


Dra. Rubiana Mara Mainardes

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais José e Marlise Klein, meus eternos tutores, educadores e incentivadores, que sempre me amaram, me apoiaram e fizeram o possível e o impossível para tornar realidade esta etapa do meu sonho.

“Amizades podem ir e vir, amores podem chegar e partir, mas Pai e Mãe, mesmo que não estejam presentes estão sempre juntos daqueles que precisam e sabem sentir”

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello, pela sua orientação, dedicação, ensinamentos, confiança e amizade.

Ao Prof. Dr. Marcos Luciano Bruschi pelo apoio e parceria no trabalho realizado.

A todos os docentes do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pelos conhecimentos transmitidos.

À amiga e colega desde os tempos de graduação, Renata Longhini, pela amizade e colaboração em partes deste trabalho.

Aos amigos e colegas de laboratório que são imprescindíveis nos experimentos e necessários nos momentos de descontração, pela amizade e companheirismo.

Aos técnicos Admir e Claudio pela amizade e imensa ajuda na realização do trabalho.

À secretaria do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, especialmente a Helena, pela imensa paciência e ajuda no decorrer de todo trabalho.

Aos departamentos de Química e Física da UEM pela realização de alguns experimentos.

À todas as pessoas, professores, técnicos, funcionários, amigos, colegas que conviveram e ajudaram no trabalho: Muito Obrigada!

À CAPES e Fundação Araucária pela bolsa concedida e pelos recursos disponibilizados para a realização deste trabalho.

NOTA BIOGRÁFICA



Traudi Klein nasceu em São João, PR, no dia 03 de junho de 1981. Em 1999 ingressou no curso de Farmácia da Universidade Estadual de Maringá (UEM) tendo obtido título de Farmacêutica Industrial em maio de 2004. Após realizou curso de Especialização em Biotecnologia com ênfase em Meio Ambiente e Saúde na UEM. Em 2005 iniciou o curso de Mestrado na Universidade Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Araraquara, SP na área de concentração de Fármacos e Medicamentos, Farmacotecnia sob a orientação da Profa. Dra. Maria Palmira Daflon Gremião. Foi docente na UNICENTRO, Guarapuava, PR, em 2007, além de ter sido responsável técnica em farmácia de dispensação, em São João, PR. Em dezembro de 2008 iniciou o curso de Doutorado em Ciências Farmacêuticas da UEM sob a orientação do Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello, na área de concentração de Produtos Naturais e Sintéticos Biologicamente Ativos.

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	2
INTRODUÇÃO.....	3
OBJETIVOS.....	14
CAPÍTULO I.....	15
CAPÍTULO II.....	39
CAPÍTULO III	69
CAPÍTULO IV	91
CAPÍTULO V	111
DISCUSSÃO	127
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	130
ANEXO I.....	137
ANEXO II	139

RESUMO

O guaraná, sementes de *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke, tem ampla utilização no mercado alimentício e farmacêutico no Brasil e em outros países. Suas sementes contêm altas concentrações de metilxantinas, como a cafeína, teofilina e teobromina, saponinas e polifenóis, especialmente taninos. O efeito antidepressivo tem sido avaliado com resultados promissores comparáveis ao do antidepressivo tricíclico imipramina. Porém ainda não há disponível comercialmente uma forma farmacêutica a base de guaraná obtida a partir de extrato padronizado da droga. A padronização química do extrato semipurificado EPA foi realizada com base nos marcadores químicos catequina e epicatequina por CLAE. Fitomedicamentos em comprimidos requerem elevados cuidados de produção, devido, principalmente às propriedades higroscópicas e à instabilidade química das matérias-primas de origem vegetal. Para contornar o problema da instabilidade química a produção de micropartículas a partir do extrato semipurificado EPA para posterior produção de comprimidos apresenta como grande vantagem a proteção dos constituintes ativos vegetais da ação de agentes ambientais como luz, calor e umidade. Micropartículas de EPA foram produzidas por secagem por atomização utilizando maltodextrina e goma arábica como materiais poliméricos e caracterizadas por morfologia, tamanho de partícula, análise térmica, atividade antioxidante e perfil de dissolução. Este trabalho visou o desenvolvimento de metodologia analítica e tecnológica na obtenção de extrato semipurificado padronizado e comprimidos de *P. cupana* var. *sorbilis*. Comprimidos de EPA produzidos a partir de micropartículas contendo o extrato semipurificado foram obtidos e caracterizados por estudos de fluxo dos pós, aspecto, dureza, friabilidade, doseamento, desintegração e dissolução. A metodologia utilizada foi adequada para produção de comprimidos de guaraná.

Palavras-chave: *Paullinia cupana*, Sapindaceae, guaraná, validação de extrato, comprimidos, padronização.

ABSTRACT

Guaraná seeds of *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke, is widely used in food and pharmaceutical market in Brazil and elsewhere. Its seeds contain high concentrations of methylxanthines such as caffeine, theobromine and theophylline, saponins and polyphenols, especially tannins. The antidepressant effect has been evaluated with promising results comparable to the tricyclic antidepressant imipramine. But there is still no commercially available pharmaceutical form of guarana extract obtained from the standard drug. The chemical standardization of EPA semipurified extract was performed on the basis of chemical markers catechin and epicatechin by HPLC. Phytomedicines tablets require high care production, mainly due to the hygroscopic properties and chemical instability of the raw materials of plant origin. And to avoid the problem of chemical instability of the production of microparticles from the semipurified extract for subsequent production of tablets are presented as a great advantage to the protection of plant active constituents of the action of environmental agents such as light and moisture. EPA microparticles were produced by spray drying using maltodextrin and arabic gum as polymeric materials and characterized by morphology, particle size, thermal analysis, antioxidant activity and dissolution test. This study aimed the development of analytical methodology and technology in achieving standardized extract and tablets of *P. cupana* var. *sorbilis*. EPA tablets were produced from microparticles containing the semipurified extract and these were characterized by powders flow studies, appearance, hardness, friability, disintegration and dissolution test. The methodology used was suitable for production of guarana tablets.

Key-words: *Paullinia cupana*, Sapindaceae, guaraná, extract validation, tablets, standardization.

INTRODUÇÃO

Plantas têm sido tradicionalmente usadas por populações de todos os continentes no controle de diversas doenças e a pesquisa de novos compostos ativos originários de produtos naturais está se expandindo. Porém, os fitomedicamentos despertam reações variadas nos profissionais de saúde que vão desde uma resistência absoluta a um entusiasmo extremado, passando por uma indiferença. Isto porque, muitos fitomedicamentos ainda não têm sua eficácia comprovada em estudos clínicos controlados, há falta de controle de qualidade adequado e não possuem os mesmos controles de prescrição e venda dos medicamentos sintéticos. Essas posturas pré-concebidas representam prejuízos potenciais para os pacientes, pois muitos fitoterápicos apresentam importantes efeitos adversos e possibilidade de interações medicamentosas (ANDREATINI, 2000; FRANÇA, 2001).

Portanto torna-se interessante a pesquisa nessa área como forma de oferecer maiores possibilidades de tratamento aos pacientes e desenvolver a indústria nacional de medicamentos.

O guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke - Sapindaceae) é uma planta brasileira originária da região central da Amazônia. Suas sementes contêm altas concentrações de metilxantinas, como a cafeína, teofilina e teobromina, saponinas e polifenóis especialmente taninos. É utilizada como estimulante do sistema nervoso central, em casos de estresse físico e intelectual, como antidiarréico, diurético e antineurálgico (HENMAN, 1982; YAMAGUTI-SASAKI et al., 2007). O efeito antidepressivo do extrato do guaraná tem sido avaliado por pesquisadores com efeitos promissores comparáveis ao do antidepressivo tricíclico imipramina (FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ, 2000; OTOBONE et al., 2005; OTOBONE et al., 2007).

Plantas medicinais produzem diferentes metabólitos secundários (alcalóides, taninos, flavonóides, saponinas, entre outros) e o fazem em diferentes proporções, dependendo do habitat, do regime de chuvas, da insolação, do solo, enfim, das características climáticas- edáficas. Entretanto, algumas substâncias químicas são características para um determinado vegetal, e desta forma podem servir como parâmetro para sua caracterização e identificação (MIGLIATO et al., 2007). O guaraná tem sido estudado há tempos devido às suas propriedades terapêuticas. A primeira descrição data de 1669, quando o missionário jesuíta João Felipe Betendorf esteve na Amazônia observando os índios da região. Estes utilizavam o guaraná como bebida diariamente devido as suas propriedades diuréticas e eficácia contra enxaqueca, febre e câimbras. Na metade do século XVIII, a atividade antidiarreica passou a ser explorada. A partir daí, muitas características desta planta passaram a serem exploradas e pesquisas em torno da constituição química ganharam espaço (HENMAN, 1982). E por ser amplamente utilizado no mercado farmacêutico, pelo efeito estimulante do sistema nervoso central, o guaraná foi inserido como droga oficial da Farmacopeia Brasileira.

A investigação científica das propriedades do guaraná iniciou em 1826 quando se isolou uma substância a qual se mostrou ser a tetrametilxantina, com a estrutura idêntica à cafeína, e quantidades relativamente grandes de teofilina e teobromina. Pesquisadores passaram a atribuir as propriedades medicinais do guaraná nas várias xantinas e na quantidade de taninos presentes na planta, que é relativamente alta, cerca de 5-6%, o que pode explicar a ação adstringente do guaraná no trato digestivo (HENMAN, 1982).

Segundo dados farmacopeicos a droga vegetal é constituída pelas sementes contendo, no mínimo, 5% de metilxantinas, calculadas como cafeína, e, no mínimo, 4% de taninos (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2003).

O estudo fitoquímico de uma fração semipurificada de guaraná mostrou a presença das seguintes substâncias: cafeína, epicatequina, catequina, *ent*-epicatequina e procianidinas B1,

B2, B3, B4, A2 e C1 (USHIROBIRA et al., 2007; YAMAGUTI-SASAKI et al., 2007). Esta fração demonstrou atividade antidepressiva em animais submetidos a tratamento crônico. Esta atividade não pode ser relacionada com as metilxantinas presentes, pois quando a cafeína é testada isoladamente os efeitos são diferentes dos apresentados pela fração semipurificada. Isto sugere que esta atividade deve-se à presença de outros constituintes presentes, e os taninos condensados, isolados por Ushirobira et al. (2007) e Yamaguti-Sasaki et al. (2007), podem ser os responsáveis ou podem contribuir para a ação farmacológica (OTOBONE et al., 2005; OTOBONE et al., 2007).

Vários trabalhos já foram realizados com o interesse de se confirmar alguns dos efeitos atribuídos ao guaraná. Alguns experimentos *in vivo* relataram baixa toxicidade desta droga, exibindo efeitos antioxidantes, antiamnésia (ESPINOLA et al., 1997; MATTEI et al., 1998; OTOBONE et al., 2005) e potencial ação como quimiopreventivo na carcinogênese (FUKUMASU et al., 2006). Uma potencial atividade antibactericida contra *Streptococcus mutans* foi descrita em experimentos *in vitro*, a qual pode ser utilizada na prevenção da placa dental bacteriana (YAMAGUTI-SASAKI et al., 2007). Alguns trabalhos relacionados à ação desta droga sobre o sistema nervoso central relatam um efeito benéfico sobre a cognição, não alterando a atividade locomotora e uma relevante atividade antidepressiva após tratamento crônico (OTOBONE et al., 2005; OTOBONE et al., 2007).

Segundo Nicoletti et al. (2007) algumas interações medicamentosas têm sido atribuídas ao guaraná: ele potencia a ação de analgésicos e, quando administrado com anticoagulantes pode inibir a agregação de plaquetas aumentando o risco de sangramento.

Estudos avaliaram as propriedades farmacológicas do extrato bruto liofilizado (EBPC) da *P. cupana* (guaraná) e frações semipurificadas (EPA e EPB) após administração aguda ou crônica pela via oral em ratos. O trabalho utilizou técnicas de controle da droga vegetal, padronizando os extratos e verificou o efeito antidepressivo com o tratamento crônico de

EBPC e EPA comparável ao do antidepressivo imipramina. A fração semipurificada EPB não demonstrou efeito antidepressivo (patente requerida pela FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ, 2000).

Otobone et al. (2005) estudaram os extratos citados acima sobre o comportamento cognitivo em ratos submetidos ao teste do labirinto aquático de Morris. O extrato bruto e uma das frações semipurificadas (EPA) demonstraram um efeito benéfico sobre a cognição. A cafeína, quando administrada isoladamente, demonstrou efeitos diferentes dos encontrados com os extratos. Os animais tratados cronicamente com os extratos tiveram a mesma evolução ponderal e sobreviveram o que sugere baixa toxicidade dos extratos.

Otobone et al. (2007) avaliaram os efeitos ansiolíticos, antidepressivos e estimulantes do extrato bruto e frações semipurificadas (EPA, EPB), utilizando os testes PMT (*plus maze test*), FST (*forced swimming test*) e OFT (*open field test*), respectivamente. Os resultados com uma das frações semipurificadas (EPB) sugere que esta fração não contém componentes responsáveis pelos efeitos observados com o extrato bruto e a outra fração semipurificada (EPA). A fração semipurificada EPA, contém o(s) componente(s) responsável pelo efeito antiimobilidade, sugerindo um efeito antidepressivo como o observado com EBPC. Estes componentes não podem ser relacionados com a cafeína porque os resultados obtidos com esta substância isoladamente são diferentes daqueles encontrados com a administração dos extratos. Assim, taninos condensados, que foram isolados da fração EPA por Yamaguti-Sasaki et al. (2007), poderiam ser os responsáveis por esta atividade. Flavonóides, incluindo taninos condensados (Figura 3 do capítulo II), podem agir no sistema nervoso central porque conseguem atravessar a barreira hemato-encefálica (JOHNSTON, BEART, 2004).

Roncon et al. (2011) demonstraram que o EPA é ativo por via oral e produz efeitos panicolíticos em ratos submetidos ao teste ETM (*elevated T maze model*). Os sistemas neurotransmissores serotoninérgicos e dopaminérgicos estão envolvidos neste efeito. Assim,

EPA pode ser muito útil no tratamento de transtornos de humor tais como transtorno do pânico (RONCON et al. 2011).

A partir desses resultados, outros estudos ainda devem ser realizados com intuito de identificar as substâncias responsáveis por estas ações farmacológicas e os mecanismos envolvidos, assim como uma forma farmacêutica deve ser desenvolvida para facilitar a administração da fração semipurificada, promissora como fitomedicamento no tratamento da depressão.

A validação de um processo é a demonstração de que o controle dos passos críticos de um processo resulta em produtos com propriedades reprodutíveis (ex: uniformidade de teor) ou que provoca um acontecimento reprodutível (ex: esterilização) (LACHMAN, LIEBERMAN, KANIG, 2001). Para drogas vegetais, é imprescindível para garantir, por meio de estudos experimentais, que o método de quantificação de substâncias marcadoras atenda às exigências analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, alguns parâmetros de validação devem ser estudados: especificidade, linearidade, precisão, recuperação, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ), de acordo com a RE 899/2003-ANVISA (BRASIL, 2003).

Como os extratos vegetais nem sempre apresentam as mesmas concentrações dos ativos, devido às diferenças apresentadas entre lotes de uma mesma droga que têm diferenças em função das características edafo-climáticas, é necessário que se tome alguns marcadores químicos presentes no extrato, que podem ou não serem os componentes ativos, para que sejam avaliados e quantificados sempre que um novo lote de extrato seja produzido. Assim consegue-se padronizar o extrato em função dos marcadores químicos e tem-se sempre um mesmo teor de substâncias ativas na forma farmacêutica final (SIMÕES et al., 2001).

A padronização química é uma forma de assegurar não somente a qualidade de um extrato, mas também, de forma indireta, a eficácia terapêutica do mesmo.

Sem a padronização, o produto perde qualidade e a indústria não pode garantir a eficácia do medicamento já que desconhece a concentração do produto. Com a resolução da ANVISA (RDC 48/04 de 16.03.04) (BRASIL, 2004) estabeleceu-se uma legislação específica que se baseia na garantia da qualidade exigindo a reprodutibilidade dos fitoterápicos produzidos, o que só pode ser alcançado se as empresas utilizarem extratos padronizados e estabelecerem rígido controle de qualidade.

Os diferentes métodos existentes para a padronização físico-química de fitoterápicos incluem, entre outros, técnicas cromatográficas que permitem a quantificação de componentes de interesse. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) apresenta muitas vantagens em relação a outras técnicas. Possui fase estacionária empacotada e a quantidade de solvente que atravessa a coluna é grande em relação à sua massa. A combinação desses dois elementos com a uniformidade da fase estacionária e a utilização de sistema de detecção *on line* contribui para uma série de outras vantagens e resultados confiáveis. Soma-se a isso o fato do cromatógrafo ser um instrumento capaz de incorporar, ainda, sistemas completamente automatizados de extração de amostras e injeção, o que aumenta enormemente a capacidade de análise e diminui a geração de erros durante a análise (GIL et al., 2005).

O desenvolvimento de uma forma farmacêutica engloba várias etapas, entre elas, estudos de pré-formulação e formulação propriamente ditos, os quais consistem na caracterização física, química, físico-química e biológica de todas as matérias-primas, incluindo o fármaco, usado na elaboração do produto, assim como das características anatômicas e fisiológicas da via de administração e absorção e finalmente, a elaboração da forma farmacêutica (WANCZINSKI et al., 2002).

A fase de pré-formulação tem início quando um fármaco demonstra ter ação farmacológica em modelos animais e potencial uso no homem. Estes estudos devem incidir nas propriedades físico-químicas da substância, passíveis de afetar o desempenho adequado

da forma farmacêutica. A compreensão dessas propriedades pode levar à concepção da formulação (LACHMAN, LIEBERMAN, KANIG, 2001).

Polifenóis são substâncias muito susceptíveis á degradação por fatores ambientais como luz, calor e oxigênio. A microencapsulação, dependendo dos polímeros e da tecnologia utilizada podem estabilizar esses compostos instáveis. De uma perspectiva industrial, pós micrencapsulados podem ser facilmente obtidos e usados em alimentos e materiais farmacêuticos mantendo a concentração inicial de flavonoides, sua atividade biológica e segurança por longos períodos de armazenagem. Nesses sistemas a estabilização ocorre porque o material de parede age como uma barreira física e permeável ao oxigênio e moléculas pequenas e por essa razão os materiais microencapsulados tem sua estabilidade aumentada (MANACH et al., 2005; SANSONE et al., 2011). A técnica de secagem por atomização (spray-drying) é frequentemente utilizada na indústria de alimentos e farmacêutica devido a grande disponibilidade de equipamentos e facilidade de industrialização. A técnica é um processo de uma etapa onde um líquido é transformado em pó por uma rápida evaporação do solvente sob pressão e temperatura. A secagem por atomização é muito recomendada para materiais sensíveis ao calor tais como os polifenóis (SANSONE et al., 2011).

Dentre as formas farmacêuticas destinadas à administração pela via oral, os comprimidos têm sido o sistema de liberação de fármacos preferido para obtenção de efeito sistêmico e são, dentre as formas farmacêuticas, a mais difundida por apresentar as maiores vantagens em relação ao seu uso, como a grande precisão de dosagem, a baixa variabilidade do conteúdo, a facilidade de identificação visual, manuseio e administração e a grande aceitação por parte os pacientes, além de proporcionarem maior estabilidade, se comparadas às líquidas ou semi-sólidas (BANKER, ANDERSON, 2001).

Os comprimidos são obtidos por compressão, que é o método de fabricação dos mais variados tipos de comprimidos e que pode ser realizado através de três tipos de procedimentos: a compressão direta, a granulação por via úmida e a granulação por via seca (ANSEL et al., 2000; LACHMAN et al., 2001).

A compressão direta é a forma mais simples de obtenção de comprimidos, pois consiste na mistura de pós e sua posterior compressão. É o processo ideal para produção de medicamentos em escala industrial, pois economiza tempo e energia, é ambientalmente menos agressivo e reduz investimentos em equipamentos e na estrutura da área de produção, por requerer menor número de etapas no processamento que os métodos tradicionais de granulação. É adequada para aquelas substâncias que possuem fluxo livre, propriedades de coesão e que possibilitam serem compactadas diretamente, sem necessidade de granulação anterior à compressão. No entanto, muitos fármacos não são diretamente compressíveis, o que limita o uso desse método de fabricação. Para contornar essa situação a indústria farmacêutica emprega excipientes que permitem a compressão direta, que devem ser materiais com propriedades de fluidez e compressibilidade (ANSEL et al., 2000; LACHMAN et al., 2001; WANCZINSKI et al., 2002; KLEINEBUDDE, 2004; MARTINELLO, 2005).

As vantagens da compressão direta incluem: rapidez, facilidade de obtenção e redução de perdas de princípio ativo, além de poder ser empregada para substâncias instáveis frente à umidade e à temperatura elevada, diminuindo riscos de contaminação, aumentando a capacidade produtiva e gerando economia no setor produtivo (ANSEL et al., 2000; PALACIOS, 2000; LACHMAN et al., 2001; WANCZINSKI et al., 2002). Outra vantagem da compressão direta é a otimização da desintegração do comprimido, onde cada partícula do fármaco é liberada da massa do comprimido e fica disponível para a dissolução (MARTINELLO, 2005).

Quando os fármacos são termolábeis, que pode ocorrer em fitocomplexos, a compressão direta é a técnica de escolha. A principal limitação dessa técnica é que não é indicada para fármacos de baixo escoamento e segregação (MARTINELLO, 2005).

O sucesso no desenvolvimento e planejamento de um comprimido obtido por compressão direta se dá, principalmente, pela correta escolha dos excipientes. A compressibilidade desses excipientes depende das propriedades moleculares dos compostos (massa molecular, estrutura cristalina, propriedades termodinâmicas, entre outras) e das propriedades da partícula propriamente dita (tamanho da partícula, forma, entre outras) (WU; HO; SHEU, 2001; TERASHITA; IMAMURA, 2002).

Os materiais derivados de drogas vegetais, como os extratos secos, apresentam qualidades de fluxo deficientes. Essa característica pode influenciar enormemente a produção de comprimidos à partir desses extratos vegetais, já que a alimentação das câmaras de compressão das máquinas de comprimir não é homogênea, resultando em comprimidos não uniformes quanto ao teor de substâncias ativas. Para melhorar as características de fluxo pode-se fazer uso de um processo anterior à compressão visando à otimização das características de fluxo dos extratos vegetais. Um exemplo desse tipo de processo é a utilização de *spray dryer* (secagem por atomização).

Esse processo consiste em transformar uma solução ou suspensão em produto seco por um único processo de secagem. A vaporização da água acontece a partir da desintegração de uma corrente líquida em pequenas gotas (atomização) que entram em contato com uma quantidade de ar quente suficiente para suprir o calor latente de vaporização (ESTEVES, 2006).

O estudo da secagem de materiais nestes secadores visa à otimização de processos industriais e a obtenção de produtos com características morfológicas (área superficial, diâmetro médio de partícula, densidade específica, propriedades de fluxo) de acordo com as

exigências do processo tecnológico. Um dos materiais mais utilizados como encapsulante na secagem por atomização é a maltodextrina isso devido ao seu baixo custo e por apresentar baixa higroscopicidade, evitando a aglomeração das partículas. Esse material de parede tem, também, efeito antioxidante e uma ótima retenção de substâncias voláteis que está na ordem de 65 a 80% (ANSELMO et al., 2006).

Fitomedicamentos em comprimidos requerem elevados cuidados de produção, devido às propriedades higroscópicas, à instabilidade química das matérias-primas de origem vegetal e às deficientes qualidades compressionais. A cedência das substâncias ativas e, com isso sua biodisponibilidade, pode ser fortemente influenciada pelos adjuvantes, quer pela variação de sua qualidade ou quantidade na formulação. Para contornar o problema da instabilidade química, uma forma sólida revestida apresenta como grande vantagem a proteção dos constituintes ativos vegetais da ação de agentes ambientais como luz e umidade. A tecnologia de revestimento pelicular também colabora no valor comercial do produto por melhorar o aspecto numa perspectiva de marketing pela utilização de determinadas cores e por uma impressão que contraste com a nova superfície (SEITZ; MEHTA; YEAGER, 2001; SONAGLIO et al., 2007).

Embora os comprimidos sejam uma das formas farmacêuticas mais prescritas em função da facilidade de administração e maior estabilidade, são os que mais apresentam problemas de biodisponibilidade (PRISTA et al., 1995).

Como a absorção depende da quantidade de fármaco solúvel, características de dissolução adequadas são consideradas importantes para garantir os efeitos terapêuticos desejados. Desse modo, torna-se importante realizar estudos de dissolução *in vitro*, afim de assegurar que a liberação da substância ativa apresente cinética adequada, garantindo, assim, sua qualidade biofarmacêutica (CASTRO et al., 2005).

A dissolução pode ser definida como um ensaio físico para prever a liberação para uma determinada área numa determinada quantidade e no tempo corretos. Fundamentalmente, este processo é controlado pela afinidade entre a substância sólida e o solvente e pelo modo como o sistema farmacêutico o libera. No entanto, podem ser incorporadas substâncias no seio da forma farmacêutica, que permitem alterar a solubilidade do fármaco no meio. As metodologias mais frequentes de avaliação dos perfis de dissolução são a determinação do tempo necessário para que se liberte no meio de dissolução uma determinada fração do teor rotulado (ex.: t90%) e a determinação da fração liberada após um determinado período de tempo pré-estabelecido (ex.: 60% liberado ao fim de 60 min). Avaliam-se, assim, não apenas a quantidade que se liberou ao fim de um determinado tempo, mas a cinética de liberação ao longo de todo o período em questão (MANADAS; PINA; VEIGA, 2002).

Assim, o objetivo do trabalho foi desenvolver e caracterizar comprimidos de guaraná para a administração pela via oral, validando a metodologia analítica de quantificação de marcadores químicos por CLAE; desenvolvendo e caracterizando o extrato seco padronizado; desenvolvendo e caracterizando comprimidos de *P. cupana*; avaliando a liberação *in vitro* dos comprimidos revestidos de *P. cupana*.

OBJETIVOS

Objetivo: Este trabalho visou o desenvolvimento de metodologia analítica e tecnológica na obtenção de extrato padronizado e comprimidos de *P. cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke – Sapindaceae.

Assim, foram realizadas as etapas a seguir para atingir o objetivo geral deste trabalho.

- Desenvolvimento e validação de metodologia analítica de quantificação de marcadores químicos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).
 - 1 – desenvolver metodologia analítica de quantificação de marcadores químicos envolvidos na padronização do extrato de guaraná por CLAE.
 - 2 – validar a metodologia analítica de acordo com a RE 899/2003-ANVISA (BRASIL, 2003)

- Desenvolvimento e caracterização de extrato seco padronizado (EPA).
 - 1 – obter o extrato seco de acordo com a metodologia proposta pela patente requerida pela Universidade Estadual de Maringá (FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ, 2000–PI 00066389).
 - 2- padronizar o extrato de acordo com os marcadores químicos envolvidos na validação.

- Desenvolvimento e caracterização de micropartículas contendo EPA
 - 1 – escolher metodologia adequada para produção das micropartículas.
 - 2 - escolha do material polimérico mais adequado para o fim que se propõe.
 - 3 – produzir e caracterizar as micropartículas obtidas.

- Desenvolvimento e caracterização de comprimidos de *P. cupana*.
 - 1 - escolher adjuvantes farmacotécnicos e a técnica de fabricação dos comprimidos mais adequados.
 - 2 – produzir e caracterizar os comprimidos obtidos.
 - 3 – avaliar a liberação *in vitro* dos comprimidos de *Paullinia cupana*.

Capítulo I

Fitoterápicos: um mercado promissor

Este capítulo discute e apresenta o cenário atual dos fitomedicamentos (FTMs) na saúde da população. Também discorre sobre a qualidade, segurança e eficácia destes medicamentos, características imprescindíveis para a utilização de FTMs pela população. Para se obter FTMs seguros e eficazes algumas etapas na produção destes medicamentos devem ser seguidas e avaliadas. Ainda discute e apresenta a legislação brasileira para os FTMs e a inserção destes na saúde pública brasileira.

FITOTERÁPICOS: UM MERCADO PROMISSOR

Klein, T.^{1*}; Longhini, R.¹; Bruschi, M.L.¹; Mello, J.C.P.¹

¹Departamento de Farmácia e Farmacologia, Universidade Estadual de Maringá –
UEM, Maringá - PR

Revista de Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada, 30(3):241-248, 2009.

RESUMO

Observa-se na Fitoterapia uma tendência de contribuição efetiva à saúde da população. Por consequência, a padronização de fitomedicamentos é um pré-requisito para a garantia da qualidade, bem como para a constância dos efeitos terapêuticos e segurança do usuário. A validação de processo analítico deve garantir, através de evidências experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Assim, os equipamentos e materiais de laboratório devem ser devidamente calibrados e o analista qualificado. As substâncias químicas de referência devem ser certificadas por compêndios oficiais, como as Farmacopeias ou por outros códigos autorizados pela legislação vigente. Tão importante quanto o desenvolvimento e validação de uma metodologia analítica é o posterior estudo de estabilidade, a fim de garantir que o produto mantenha sua qualidade durante toda vida útil. Para a obtenção de registro de um medicamento fitoterápico dentro dos padrões requeridos pela legislação faz-se necessário, portanto, a realização de diferentes testes para validação deste medicamento de forma a garantir sua segurança no uso, eficácia na utilização e qualidade do produto.

Palavras-chave: fitomedicamentos, validação, padronização, saúde pública.

ABSTRACT: Phytotherapy: a promising market. It is observed in a trend of Phytotherapy effective contribution to public health. Consequently, the standardization of phytomedicines is a prerequisite for quality assurance, as well as the consistency of therapeutic effects and safety of the user. The validation of the analytical process should ensure, through experimental evidence, that the method meets the requirements of analytical applications, ensuring the reliability of results. Thus, the equipment and laboratory materials must be properly calibrated and the analyst qualified. The chemicals references must be certified by official compendiums, such as Pharmacopoeia, or other accepted official codes. As important as the development and validation of an analytical methodology is the stability study, to ensure that the product retains its quality throughout its life. Therefore, to registry a phytomedicine, according the official standard requirements, is necessary accomplish different validation tests of this product to ensure its safety, effectiveness and quality.

Keywords: phytomedicines, validation, chemical standardization, public health.

INTRODUÇÃO

As grandes fontes de biodiversidade são as florestas tropicais, localizadas em países em desenvolvimento como o Brasil, detendo aproximadamente um terço da flora mundial. Porém, os países desenvolvidos, como EUA, Japão e os europeus são os que mais manufaturam e comercializam produtos naturais. No desenvolvimento e produção de um fitomedicamento (FTM) os custos são elevados, como em qualquer medicamento alopático, e estes países investem montantes superiores aos países em desenvolvimento como o Brasil. Neste processo de pesquisa e desenvolvimento (P&D) pode-se afirmar que, nos primeiros dez anos os custos estão todos vinculados à pesquisa e desenvolvimento e não ao retorno dos investimentos. Esta situação só começa a mudar a partir do 11º ano, quando os custos com pesquisa e desenvolvimento caem e são desviados para custos de produção e vendas,

chegando a ser zero após 19 e 20 anos, quando começam a surgir os lucros. Neste contexto, espera-se que novos produtos possam ser desenvolvidos a partir de espécies nativas, por meio de compromissos institucionais (universidade e empresa), com a aplicação recursos que garantam a atuação de especialistas das áreas da Botânica, Biologia, Agronomia, Farmácia, Química e Medicina (Yunes et al., 2001; David et al., 2004; Netto et al., 2006).

A biodiversidade e o potencial econômico da flora brasileira, desde 1886, já eram descritos em inventários, testemunhando a sua riqueza em plantas produtoras de frutos alimentares, resinas, óleos, gomas, aromas, e, principalmente, o potencial medicinal, podendo citar muitas espécies (Jacobson et al., 2005).

No mercado de FTM, os investimentos em P&D são ainda incipientes no Brasil, estando restritos a um reduzido número de empresas. As informações referentes ao total de capital requerido como investimento no setor é ainda inconsistente. Como barreira institucional tem-se as normas e critérios para produção e comercialização de FTM no país.

Baseado no modelo europeu, os requisitos para obtenção do registro como FTM referem-se à comprovação da eficácia terapêutica, da qualidade, tanto da matéria-prima utilizada quanto do produto final, e estudos de toxicidade que definam o grau de risco do produto (Ministério da Saúde, 2007a).

O Brasil tem conhecimento científico sobre um percentual, ainda que baixo, das plantas destinadas ao uso medicinal e as empresas brasileiras têm capacitação necessária para gerar processos tecnológicos, no entanto não possuem um corpo de P&D capaz de gerar inovações na área de FTM de forma contínua. Com o uso sustentável da biodiversidade nacional, e um desenvolvimento de parcerias da Universidade com as empresas, alguns desafios poderão ser suplantados para gerar novos FTM éticos para o Brasil.

A tendência observada para a Fitoterapia é de participação cada vez mais intensa na assistência à saúde da população. Desta forma, não se pode prescindir da avaliação dos efeitos

terapêuticos de cada FTM, com base em estudos clínicos, conduzidos dentro de padrões ético e científicos. Outro aspecto relevante é a padronização da manufatura de fitoterápicos para doses uniformes, atendendo aos critérios de qualidade inerentes aos medicamentos. Por conseqüência, a padronização é um pré-requisito para a constância dos efeitos terapêuticos e segurança do usuário de FTM (Sonaglio et al., 1986; David, 2004).

O aumento no consumo de FTM pode ser associado ao fato de que as populações questionam os perigos do uso irracional dos medicamentos alopáticos associados a seus custos muitas vezes dispendiosos e procuram substituí-los pelo uso de plantas medicinais. A comprovação da ação terapêutica, associada à insatisfação da população perante o sistema de saúde, tem favorecido essa dinâmica (Tomazzoni et al., 2006).

O conhecimento atualizado das condições de saúde e dos usuários de terapias disponibilizadas, no Brasil, torna-se ferramenta útil para que diretrizes sejam traçadas para melhorar a qualidade de vida da população cujas ações devem ser estabelecidas na conquista desta meta (Nicoletti et al., 2007).

A fitoterapia, por ser prática tradicional de saúde e já revelada em diversos estudos como de utilidade terapêutica para uma parcela significativa da população, poderia atender às várias demandas cabendo aos governos assegurarem-lhe uma sustentabilidade (Tomazzoni et al., 2006).

Assim, torna-se interessante discutir a situação atual dos FTM e a seriedade que se deve ter no seu desenvolvimento.

FITOMEDICAMENTOS COM QUALIDADE, SEGURANÇA E EFICÁCIA

Buscando dar aos FTM tratamento semelhante aos medicamentos alopáticos, encontram-se problemas inerentes à sua própria origem devido, principalmente, a complexidade de sua composição e a variabilidade na qualidade das drogas obtidas a partir de

uma mesma espécie vegetal. Tal característica está relacionada com os fatores referentes às condições do local de plantio, processo de coleta, manuseio e processamento da matéria-prima. Desta forma, as drogas vegetais apresentam, frequentemente variações, justificando a necessidade da padronização desses produtos (Fischer, 2005).

Os FTM podem ser tão eficazes quanto os medicamentos produzidos com ativos oriundos de síntese química, por isso a transformação de uma planta num medicamento deve priorizar a preservação da integridade química dos princípios ativos e por consequência, a ação farmacológica do vegetal, garantindo a constância da ação biológica desejada. Para atingir esses objetivos, a produção de FTM requer, necessariamente, estudos prévios relativos aos aspectos botânicos, agronômicos, fitoquímicos, farmacológicos, toxicológicos, e de desenvolvimento de metodologias analíticas (Toledo et al., 2003).

Há de se deixar claro que a qualidade dos FTM não é obtida, simplesmente, por um laudo de análise da matéria prima vegetal favorável, mas deve ser embasada na estrutura da produção, minuciosamente planejada, desde o cultivo até a fase de dispensação. Os requisitos de qualidade auxiliam neste processo aliados à aplicação das Boas Práticas de Fabricação e de Garantia de Qualidade, propiciando a obtenção de matérias-primas vegetais e FTM de qualidade (Fischer, 2005).

Entende-se por qualidade o conjunto de critérios que caracterizam tanto a matéria-prima quanto o produto final. A eficácia é dada pela comprovação, através de ensaios farmacológicos pré-clínicos e clínicos, dos efeitos biológicos preconizados. A segurança é determinada pelos ensaios que comprovam a ausência de efeitos tóxicos, bem como pela inexistência de contaminantes nocivos à saúde (metais pesados, agrotóxicos, microorganismos e seus produtos de degradação) (Ministério da Saúde, 2007a).

O avanço terapêutico dos FTM é grande, pelo fato de associarem o conhecimento popular ao desenvolvimento tecnológico nas diversas fases de industrialização, alicerçados

em pesquisas inerentes. Os extratos obtidos de plantas medicinais devem preservar os diversos componentes ativos, se caracterizando em um fitocomplexo. Esta manutenção busca garantir a ação farmacológica específica da espécie vegetal, lembrando que o isolamento de princípios ativos não reproduz obrigatoriamente o efeito do fitocomplexo.

Plantas medicinais produzem diferentes substâncias químicas (alcalóides, taninos, flavonóides, saponinas, entre outros) e o fazem em diferentes proporções, dependendo do habitat, da pluviosidade, do oferecimento de luz às plantas, das características dos solos, enfim, das características edafo-climáticas, além do seu potencial genético. Algumas substâncias químicas são características de uma determinada espécie vegetal, servindo como parâmetros para a sua caracterização e identificação (Migliato et al., 2007; Gobbo-Neto & Lopes, 2007).

Atualmente, a padronização de fitoterápicos é realizada com base no teor de uma substância marcadora presente no extrato concentrado, indicando que se a mesma estiver presente em quantidade apropriada também os demais componentes estarão igualmente representados (David, 2004). Tal substância não necessariamente apresenta a atividade farmacológica esperada ou para a qual o extrato é empregado.

Os diferentes métodos existentes para a padronização físico-química de fitoterápicos incluem, entre outros, técnicas cromatográficas como a cromatografia em camada delgada, que permitem a quantificação de componentes de interesse diretamente ou indiretamente, após separação e extração do cromatograma, seguida de determinação química ou físico-química (Sonaglio, 1986). No entanto, esta metodologia é considerada fora do estado da arte atual, principalmente pelo advento das técnicas mais sensíveis como cromatografias líquida e gasosa acopladas a espectrômetro de massas ou ressonância magnética nuclear, entre outras. A técnica acoplada CCD (cromatografia em camada delgada)-densitometria empregando

placas de alta eficiência (HPTLC) tem sido utilizada em análise de ativos de drogas vegetais e seus extrativos, tanto quali quanto quantitativamente.

De acordo com o Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos, Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003 (Brasil, 2003), a validação de processo analítico deve garantir, através de evidências experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, o método deve ter definidos seus limites de detecção e de quantificação e apresentar precisão, exatidão, linearidade, especificidade, reprodutibilidade, estabilidade e recuperação adequada à análise. Além da legislação brasileira, RE nº 899, de 29 de maio de 2003 (Brasil, 2003), outros documentos oficiais, tais como os descritos pelo ICH (*International Conference on Harmonisation*) Q2 (2005) descrevem os parâmetros que devem ser avaliados para validação de um método bioanalítico.

Assim, os equipamentos e materiais devem ser devidamente calibrados e o analista qualificado. As substâncias químicas de referência devem ser certificadas por organismos oficiais, como Farmacopeia Brasileira, Farmacopeia Americana ou por outros códigos autorizados pela legislação vigente (Brasil, 2003).

Um método analítico abrange a determinação qualitativa, semi-quantitativa e/ou quantitativa de fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos. Já um método bioanalítico é a determinação quantitativa de fármacos e/ou metabólitos em matrizes biológicas, tais como sangue, soro, plasma e urina (Brasil, 2003).

Produtos intermediários (extratos vegetais) são considerados matrizes complexas, e podem ser tratados como nos bioanalíticos, ou seja, sua composição é tão complexa quanto a composição das matrizes biológicas. No entanto, quando do produto final, ou FTM, este deve apresentar níveis mais severos de aceitação para as análises quantitativas, com determinação exata da sua composição.

A determinação quantitativa de fármacos e/ou metabólitos em matrizes biológicas permite limites de aceitação maiores em relação aos métodos analíticos para controle de qualidade de fármacos, por exemplo, o desvio padrão relativo deve ser menor ou igual a 15% para aceitar-se uma curva de calibração, enquanto que para os métodos analíticos se aceita no máximo 5%. O coeficiente de correlação linear deve ser igual ou superior a 0,99 para métodos analíticos, enquanto que para os métodos bioanalíticos permite-se igual ou superior a 0,98 (Brasil, 2003).

Tão importante quanto o desenvolvimento e validação de uma metodologia analítica que será utilizada para quantificar os marcadores químicos envolvidos na padronização do FTM é o posterior estudo de estabilidade da formulação para continuar mantendo os níveis da qualidade garantidos na sua manufatura.

A estabilidade de produtos farmacêuticos depende de fatores ambientais como temperatura, umidade e luz, e de fatores relacionados ao próprio produto como propriedades físicas e químicas de substâncias ativas e excipientes farmacêuticos, forma farmacêutica e sua composição, processo de fabricação, tipo e propriedades dos materiais de embalagem (Brasil, 2005).

A ANVISA disponibiliza um guia para realização de estudos de estabilidade, contido na Resolução nº 1 de 2005 (Brasil, 2005), a qual contempla diretrizes para estudos de estabilidade acelerada, estabilidade de acompanhamento e estabilidade de longa duração, seja para medicamentos alopáticos ou mesmo FTM. Estes estudos abrangem um conjunto de testes projetados para se obter informações sobre a estabilidade de produtos farmacêuticos visando definir seu prazo de validade e período de utilização em embalagem e condições de armazenamento especificadas. A estabilidade acelerada representa o estudo no qual a degradação química ou mudanças físicas de um produto são aceleradas em condições forçadas de armazenamento. A estabilidade de longa duração contempla um estudo projetado para

verificar as características físicas, químicas, biológicas e microbiológicas de um produto durante o prazo de validade esperado e, opcionalmente, após seu vencimento. Já na estabilidade de acompanhamento o estudo é realizado após o início da comercialização do produto, para verificar a manutenção das características físicas, químicas, biológicas e microbiológicas, previstas nos estudos de estabilidade de longa duração (Brasil, 2005).

O tempo de duração dos estudos varia de acordo com qual estudo está sendo realizado. Para o estudo acelerado, recomenda-se de 3 a 6 meses. Para o estudo de longa duração o tempo é maior de 3 a 24 meses. Ambos contemplam os testes de doseamento, quantificação de produtos de degradação, dissolução (quando aplicável) e pH (quando aplicável). No estudo de acompanhamento todas as análises requeridas são realizadas a cada 12 meses (Brasil, 2005).

Para os FTM a determinação de produtos de degradação é um pouco mais complexa, considerando que a matéria-prima destes medicamentos, extratos vegetais, contém centenas de substâncias químicas, sendo muitas destas não identificadas, tornando-se uma tarefa de difícil execução.

Os guias estabelecidos pelo ICH vão um pouco além, abrangendo testes de fotoestabilidade tanto para a substância ativa como para os produtos acabados, assim como para a avaliação destes estudos.

Entre os vários estudos para que um extrativo vegetal passa até atingir a etapa clínica e mesmo o registro, a padronização deste é fundamental para que os lotes sejam uniformes e com qualidade e eficácia garantida.

Um produto não atingirá a qualidade necessária e a indústria não poderá garantir a eficácia do FTM sem a padronização já que desconhece a concentração dos princípios ativos do produto. Com a resolução da ANVISA, RDC 48/04 de 16/03/04, estabeleceu-se uma legislação específica baseada em critérios para a garantia da qualidade em fitoterápicos

exigindo a reprodutibilidade dos parâmetros aceitáveis para o controle físico-químico, químico e microbiológico dos fitoterápicos produzidos no Brasil, o que só pode ser alcançado se as empresas produtoras utilizarem-se de extratos padronizados de plantas.

Para uma garantia da qualidade relativa a material botânico, não apenas os aspectos físico-químicos são importantes, mas também o microbiológico, considerando o fato de que os materiais vegetais normalmente podem conter um grande número de propágulos de fungos e bactérias, pertencentes à microbiota natural ou introduzidos durante a manipulação. Ainda, esta contaminação pode ser intensificada com o tempo e não somente comprometer o material em si, mas também o usuário (Migliato et al., 2007). Diversos são os estudos relativos à qualidade microbiológica de plantas medicinais e há especificação de níveis aceitáveis de microorganismos nesses materiais vegetais. A especificação da OMS para contaminação por microorganismos aeróbios totais é de, no máximo, $5,0 \times 10^7$ UFC/g para materiais vegetais destinados ao uso na forma de chás e infusões e de, no máximo, $5,0 \times 10^5$ UFC/g para uso interno. Já a contaminação por bolores e leveduras pode ser, no máximo, $5,0 \times 10^4$ UFC/g para materiais vegetais destinados ao uso na forma de chás e infusões e de, no máximo, $5,0 \times 10^3$ UFC/g para uso interno (Rocha et al., 2004, Zaroni et al., 2004).

Para a obtenção de registro de um FTM dentro dos padrões requeridos pela legislação brasileira faz-se necessário, portanto, a realização de diferentes testes para validação deste medicamento de forma a garantir sua segurança no uso, eficácia na utilização e qualidade do produto, realizados por meio de diversos ensaios, de controle de qualidade, farmacológicos, toxicológicos, tecnológicos, pré-clínicos, clínicos toxicológicos e ensaios clínicos (Ministério da Saúde, 2007).

ETAPAS NA PRODUÇÃO DE FTM

O desenvolvimento de um fitoterápico padronizado agrega um valor tecnológico no desenvolvimento da forma farmacêutica contendo plantas medicinais, fugindo daquelas formas farmacêuticas que contem apenas o material vegetal moído, além de garantir a qualidade e eficácia do medicamento.

O ponto de partida pode ser um levantamento bibliográfico na literatura científica e popular enfocando a droga vegetal e suas propriedades químicas e farmacológicas. Através do levantamento bibliográfico pode-se selecionar uma espécie por meio de pesquisa quimiotaxonômica (onde aspectos morfológicos associados a identificação de grupos botânicos podem indicar a presença de determinados grupos químicos que tenham atividade farmacológica). Sequencialmente coleta-se um espécime da planta, prepara-se uma exsicata e faz-se a identificação botânica e o registro em um herbário oficial (Toledo et al., 2003). Em paralelo pode-se desenvolver uma pesquisa etnobotânica, a qual tratará da observação do uso popular de plantas para fins terapêuticos nas diferentes sociedades.

A seguir, remete-se o vegetal aos estudos botânicos, que têm por objetivo a identificação da espécie, que considera as suas características morfológicas externas bem como as anatômicas, procurando destacar aquelas consideradas características da espécie. Para o estabelecimento de características botânicas comparativas que permitam detectar, durante o controle de qualidade, a presença de drogas e/ou espécies adulterantes.

Uma grande dificuldade é o oferecimento de matéria-prima de qualidade pelos fornecedores. Antes da compra é possível conhecer-se o local de plantio/coleta do material vegetal a ser adquirido, bem como amostras de lotes podem ser solicitadas para avaliação. Caso não estejam de acordo com as especificações, os respectivos fornecedores serão informados da impossibilidade da aceitação daquele lote, na tentativa de manter um bom padrão de qualidade (Ogava et al., 2003; Toledo et al., 2003).

Os estudos agronômicos visam à otimização da produção de biomassa e de constituintes ativos por meio de estudos edafo-climáticos, de micropropagação, inter-relações ecológicas, densidade de plantio, de melhoramento genético da espécie, além dos aspectos sanitários de manejo e beneficiamento da espécie (Sonaglio et al., 2007).

Os estudos fitoquímicos compreendem as etapas de isolamento, elucidação estrutural e identificação de constituintes do vegetal, sobretudo aqueles originários do metabolismo secundário, responsáveis, ou não, pela ação biológica. É importante o estabelecimento de marcadores químicos, que são substâncias químicas características de determinada espécie vegetal, indispensáveis ao planejamento e monitoramento das ações de transformação tecnológica, bem como aos estudos de estabilidade dos produtos intermediários e finais (Sonaglio et al., 2007; Toledo et al., 2003).

Diversos são os grupos de metabólitos secundários produzidos pelas plantas medicinais e que podem ser os responsáveis por suas atividades biológicas. Dentre eles tem-se, por exemplo, os taninos, um grupo de substâncias fenólicas extensamente estudado.

A avaliação da atividade biológica inclui a investigação da atividade farmacológica e toxicológica de substâncias isoladas, frações obtidas ou extratos brutos da droga vegetal. Esses aspectos são fundamentais para a transformação de uma planta medicinal em medicamento fitoterápico, havendo a necessidade de estudos de desenvolvimento tecnológico, no qual a validação do processo tecnológico exige a conservação da composição química e, sobretudo, da atividade farmacológica a ser explorada. Os métodos analíticos permitem a avaliação da qualidade do produto fitoterápico, garantindo, assim, a constância de ação terapêutica e a segurança de utilização (Sonaglio et al., 2007; Toledo et al., 2003).

Aqui se destaca a avaliação do teor de substância ou grupo de substâncias ativas e do perfil qualitativo dos constituintes químicos de interesse, presentes na matéria-prima vegetal, produtos intermediários e produto final, empregando-se testes espectrofotométricos,

cromatográficos, físicos, físico-químicos ou químicos, os quais devem possuir especificidade, exatidão, precisão e tempo de rotina analítica, para que possam ser utilizados em estudos de estabilidade, permitindo, inclusive, a detecção de produtos oriundos da degradação de substâncias ativas e/ou de marcadores químicos (Toledo et al., 2003; Audi et al., 2004; Antonelli-Ushirobira et al., 2004; Pelozo et al., 2008; Lopes et al., 2009a, b, c).

Outros aspectos de qualidade a serem avaliados, sobretudo nas drogas de origem vegetal são a carga microbiana, a contaminação química por metais, pesticidas e outros defensivos agrícolas e a ocorrência de material estranho, como terra, areia, partes vegetais, insetos e pequenos vertebrados) (Brasil, 2004).

FITOTERÁPICOS NA SAÚDE PÚBLICA

Terapias alternativas são práticas que visam a assistência à saúde do indivíduo, seja na prevenção, tratamento ou cura, considerando-o como mente/corpo/espírito e não um conjunto de partes isoladas. Seu objetivo é diferente daqueles da assistência alopática, também conhecida como medicina ocidental, na qual a cura deve ocorrer através da intervenção direta no órgão ou parte doente. Há crescente interesse mundial pela utilização dessas práticas alternativas dentre as quais se inclui a fitoterapia, e tal interesse é devido a vários fatores, tais como: elevado custo da assistência médica privada, elevado custo dos medicamentos alopáticos e precariedade da assistência prestada pelos serviços públicos de saúde (Trovo et al., 2003).

As plantas medicinais representam fator de grande importância para a manutenção das condições de saúde das pessoas. Somado a comprovação da ação terapêutica de várias plantas utilizadas popularmente, há o fato de que a fitoterapia representa parte importante da cultura dos povos, sendo parte de saberes utilizados e difundidos pelas populações ao longo de várias gerações. Estes fatores geralmente não são considerados pelos gestores de saúde, na

implantação da fitoterapia na atenção primária. O interesse por parte dos gestores municipais na implantação de programas para o uso de fitoterápicos na atenção primária à saúde muitas vezes aparece associado apenas à concepção de que estes sejam uma opção para suprir a falta de medicamentos alopáticos, já que na maioria das vezes são contabilizados os ganhos (em custos gerados) pela utilização dos fitomedicamentos (Tomazzoni et al., 2006), no entanto esta assertiva não é verdadeira quando se trata da discussão da legislação (Ministério da Saúde, 2007b).

O Decreto nº 5813 de 22 de junho de 2006, dispõe sobre a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (Brasil, 2006a), e proporciona à população brasileira o acesso seguro, bem como o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional, ampliando as opções terapêuticas aos usuários, com garantia de acesso a plantas medicinais, fitoterápicos e serviços relacionados à fitoterapia, na perspectiva da integralidade da atenção à saúde, considerando o conhecimento tradicional sobre plantas medicinais (Ministério da Saúde, 2007b).

Para estimular o desenvolvimento e consumo dos fitoterápicos o Decreto nº 5813 (Brasil, 2006a) ainda incentiva o cultivo, a formação técnico-científica, a formação e capacitação de recursos humanos para o desenvolvimento de pesquisas, tecnologias e inovações em plantas medicinais e fitoterápicos, estabelecer estratégias de comunicação para a divulgação do setor de plantas medicinais e fitoterápicos. Para cumprir o proposto, promoverá a interação entre o setor público e a iniciativa privada, universidades, centros de pesquisa e organizações não-governamentais na área de plantas medicinais e desenvolvimento de fitoterápicos.

A Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS, criada pelo ministério da saúde em 2006, cria grupos de trabalho multiinstitucionais, para tratar da

Homeopatia, da Medicina Tradicional Chinesa-Acupuntura, da Medicina Antroposófica e da Fitoterapia como práticas terapêuticas, garantindo a integralidade na atenção à saúde pública cuja implementação envolve justificativas de natureza política, técnica, econômica, social e cultural. Esta política atende, sobretudo, à necessidade de se conhecer, apoiar, incorporar e implementar experiências que já vêm sendo desenvolvidas na rede pública de muitos municípios e estados (Brasil, 2006b).

As plantas medicinais representam fator de grande importância para a manutenção das condições de saúde das pessoas. Além da comprovação da ação terapêutica de várias plantas utilizadas popularmente, a fitoterapia representa parte importante da cultura de um povo, sendo também parte de um saber utilizado e difundido pelas populações ao longo de várias gerações. No entanto estes fatores geralmente não têm sido considerados pelos gestores locais de saúde, na implantação do uso de fitoterápicos nos programas de Atenção Primária à Saúde. Um programa adequado de fitoterapia deve incorporar um conjunto de atitudes, valores e crenças que constituem uma filosofia de vida e não meramente uma porção de medicamentos fitoterápicos. Portanto, a implantação de determinadas políticas de saúde depende de um conjunto de informações essenciais, que possam subsidiar a construção da situação da saúde local e a orientação do modelo de atenção (Tomazzoni et al., 2006). É, portanto, indispensável continuar o processo de formação de recursos humanos e lutar pelo estabelecimento de programas direcionados para a investigação científica e tecnológica na área, buscando soluções na privilegiada biodiversidade brasileira, através da descoberta e desenvolvimento de fitoterápicos genuinamente nacionais e que possam atender aos interesses da política de saúde para a fitoterapia (Simões & Schenkel, 2002; Brasil, 2004).

Os avanços nas pesquisas de FTM em nível farmacológico, toxicológico e molecular (receptores, enzimas, todo mecanismo de ação envolvido, seriam os alvos moleculares “o estudo das bases moleculares, ou seja, de qual estrutura está envolvida na ação, leva a supor

diferentes alvos bioquímicos a serem atingidos”. Por exemplo, *Hypericum perforatum*, prescrito para distúrbios psíquicos, possui determinação química bem estabelecida e estudada. Estudos demonstraram q a hipericina e a pseudohipericina seriam as substâncias responsáveis pela ação, assim propõe-se vários mecanismos de ação, nisto constitui os efeitos moleculares) têm permitido constatar que estes apresentam um mecanismo de ação total ou parcialmente esclarecido. Sabe-se que, de uma maneira geral, as plantas possuem várias substâncias com efeitos similares, que agem no organismo de uma forma sinérgica atuando em uma associação de mecanismos em alvos moleculares diferentes (Yunes et al., 2001).

A segurança de um medicamento, independente de sua origem, é fundamental para a promoção da saúde, e isto se aplica à política pública e são necessários estudos toxicológicos, estudos farmacocinéticos pré-clínicos e clínicos para evitar reações adversas aos medicamentos. É necessário que os medicamentos tenham qualidade, eficácia garantida e segurança, contribuindo para o sucesso terapêutico.

Os estudos de toxicologia pré-clínica devem indicar qual o grau de confiança a ser depositado em um medicamento a ser administrado à espécie humana. Nos estudos de toxicidade aguda os animais são tratados uma única vez com doses parceladas em período não superior a 24 horas. É possível evidenciar risco de intoxicações agudas, inadvertidas ou não, e a forma de prevení-las, assim os resultados obtidos dão suporte à escolha das doses para os demais testes de toxicidade. Já na toxicidade com doses repetidas ou a longo prazo ou crônica, o produto é administrado a intervalos regulares durante períodos variáveis. A finalidade é descobrir ações qualitativa ou quantitativamente diferentes produzidas pelo maior tempo de exposição do produto, permitindo medir a latência para instalação dos efeitos tóxicos e o acúmulo da droga no organismo (Lapa et al., 2004). Outros estudos de toxicidade de longo prazo envolvem dados sobre embriotoxicidade, fertilidade e capacidade produtiva,

carcinogenicidade e mutagenicidade (Lapa et al., 2004). Todos visam garantir administração segura ao ser humano, seja para medicamentos alopáticos e/ou FTM.

Já os estudos farmacocinéticos pré-clínicos servem para avaliar o destino do fármaco depois da administração ao animal de experimentação. A velocidade e a intensidade de absorção, a distribuição no organismo, a afinidade pelos sítios de ligação, as formas de metabolização, a velocidade e os órgãos responsáveis por sua excreção do organismo são todos parâmetros importantes para os estudos de eficácia e toxicidade. O seu conhecimento permite antecipar os efeitos tóxicos com administração de doses repetidas e as interações prováveis com outros medicamentos, além de permitir o cálculo da frequência de administração necessária para manter estável o seu nível plasmático. Essas informações, além de facilitarem a extrapolação à espécie humana, permitem estabelecer, com mais fundamento, as bases iniciais da terapêutica humana (Lapa et al., 2004).

O papel regulador da ANVISA é essencial para evitar que medicamentos ineficazes, nocivos e de má qualidade atinjam o mercado e acarretem problemas como intoxicações, interações com outros medicamentos, fracassos terapêuticos, agravamento de enfermidades ou até mesmo a morte do paciente (Netto et al., 2006).

O registro de medicamentos é o instrumento que o Ministério da Saúde, no uso de sua atribuição específica, determina a inscrição prévia do medicamento na ANVISA, pela avaliação do cumprimento de caráter jurídico-administrativo e técnico-científico relacionada com a eficácia, segurança e qualidade destes produtos, para sua introdução no mercado e sua comercialização ou consumo (Netto et al., 2006). O registro de medicamentos tem validade de cinco anos e pode ser renovado por períodos iguais e sucessivos. A realização de qualquer alteração, referente ao produto ou à empresa, deverá ser comunicada à ANVISA e submetida à nova análise técnica para aprovação.

A legislação brasileira trata o registro de fitoterápicos com a mesma seriedade aplicada à legislação dos medicamentos sintéticos. Porém ainda há várias dificuldades para o controle de qualidade e a comprovação de segurança e eficácia dos fitoterápicos devido à complexidade química dos derivados de drogas vegetais (Netto et al., 2006).

Espera-se que, com a implementação da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, haja mais investimentos por parte do governo, como também por parte das indústrias, privilegiando a rica flora brasileira e os conhecimentos acumulados.

A RDC nº 48 de 16 de março de 2004 prevê, em seu anexo, a possibilidade de registro para determinadas plantas como medicamento fitoterápico tradicional, cujo uso estaria alicerçado na tradição popular, sem evidências, conhecidas ou informadas, de risco à saúde do usuário, sendo a eficácia validada através de levantamentos etnofarmacológicos de utilização e outras documentações tecnocientíficas. Tal possibilidade, contudo, não exclui a obrigatoriedade do certificado de Boas Práticas de Fabricação, que valida processos de produção, bem como não soluciona a maior parte dos problemas de impossibilidade de registros, já que vários medicamentos não se encaixariam na possibilidade apresentada. Há de se ressaltar, entretanto, que, este mercado de FTM que é composto por produtos sem validação, em termos de qualidade, eficácia e segurança no uso, são comercializados conjuntamente a produtos certificados, com elevado valor agregado. Considerando, ainda, a grande assimetria de informações à classe dispensadora resta a possibilidade do descrédito, da desconfiança a esses produtos, relegando-os a segunda posição em tratamentos de doenças, classificando-os ainda como produtos de terapia alternativa (Ministério da saúde, 2007a).

O farmacêutico comunitário possui especial relevância na busca do uso racional das plantas medicinais, devendo se comprometer com a utilização correta do medicamento, pela orientação sanitária e pelo fornecimento de informações sobre o produto aos usuários. Igualmente cabe a este profissional enfatizar aos usuários que todo fitomedicamento é um

medicamento, estimulando a notificação de eventuais reações adversas e valorizar a necessidade da farmacovigilância desses produtos (Soares et al., 2005). Como forma de instruir a prescrição e a orientação dos produtos farmacêuticos pelos profissionais da saúde é importante a organização de cursos introdutórios gerais sobre a fitoterapia e treinamentos específicos sobre os produtos padronizados (Ogava et al., 2003).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A idéia primordial na indicação do uso de FTM na medicina humana não é substituir medicamentos registrados e já comercializados, mas sim aumentar a opção terapêutica para os profissionais da saúde. A oferta de FTM registrados, com espectro de ação adequado e com indicações terapêuticas definidas, conta com a segurança de um medicamento padronizado e com eficácia garantida.

Agradecimentos

Os autores agradecem a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo apoio financeiro, INCT_if, CNPq, Fundação Araucária e Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Maringá.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andreatini R. Uso de fitoterápicos em psiquiatria. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, 2000, 22 (3): 104-105.

Antonelli-Ushirobira TM, Yamaguti E, Uhemura LM, Mello JCP. Controle de qualidade de amostras de *Paullinia cupana* H.B.K. var. *sorbilis* (Mart.) Ducke. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 2004, 23 (3), 383-386.

Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE n. 899 de 29 de maio de 2003. Dispõe sobre o guia para validação de processos analíticos e bioanalíticos. 2004.

Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC n. 48 de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. 2004.

Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE n. 1 de 29 de julho de 2005. Autoriza ad referendum, a publicação do Guia para a Realização de Estudos de Estabilidade. 2005.

Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Decreto n. 5813 de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápico. 2006a.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS - PNPIC-SUS / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. - Brasília : Ministério da Saúde, 92 p. - (Série B. Textos Básicos de Saúde), 2006b.

Cavalini M, Folis GP, Resener MC, Alexandre RF, Zannin M, Simões CMO. Serviço de informações sobre plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos. *Extensio*, 2005, 2.

David JPL, Nascimento JAP, David JM. Produtos fitoterápicos: uma perspectiva de negócio para a indústria, um campo pouco explorado pelos farmacêuticos. *Infarma*, 2004, 16 (9-10), 71-76.

Elisabetsky E, Souza GC. Etnofarmacologia como ferramenta na busca de substâncias ativas. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmam G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6 ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; 2007.

Fischer DCH. Controle de qualidade de matérias-primas vegetais e produtos fitoterápicos. In: Gil ES, Orlando RM, Matias R, Serrano SHP. Controle físico-químico de qualidade de medicamentos. 1ª Edição, Editora Uniderp, 2005.

Gobbo-Neto L, Lopes NP. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova*, 2007, 30 (2), 374-381.

ICH. Quality guidelines. Stability. Disponível em URL: <http://www.ich.org/cache/compo/276-254-1.html> [008 nov 23].

ICH Q2. Validation of analytical procedures: text and methodology. Disponível em URL: <http://www.ich.org/cache/compo/276-254-1.html> [2008 nov 20].

Jacobson TKB, Garcia J, Santos SC, Duarte JB, Farias JG, Kliemann HJ. Influência de fatores edáficos na produção de fenóis totais e taninos de duas espécies de barbatimão. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 2005, 35 (3), 163-169.

Lapa AJ, Souccar C, Lima-landman MTR, Godinho RO, Nogueira TCML. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmam G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6 ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; 2007.

Lopes GC, Bruschi ML, Mello JCP. RP-LC-UV Determination of proanthocyanidins in *Guazuma ulmifolia*. *Chromatographia*, 2009a, 69, S175-181.

Lopes GC, Rocha JCB, Almeida GC, Mello JCP. Condensed tannins from the bark of *Guazuma ulmifolia* Lam. (Sterculiaceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 2009b, 20 (6), 1103-1109.

Lopes GC, Sanches ACC, Toledo CEM, Isler AC, Mello JCP. Determinação quantitativa de taninos em três espécies de *Stryphnodendron* por cromatografia líquida de alta eficiência. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 2009c, 45 (1), 135-143.

Migliato KF, Moreira RRD, Mello JCP, Sacramento LVS, Correa MA, Salgado HRN. Controle de qualidade do fruto de *Syzygium cumini* (L.) Skeels. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 2007, 17 (1), 94-101.

Ministério da Saúde. Estrutura de mercado do segmento de fitoterápicos no contexto atual da indústria farmacêutica brasileira, 2007a.

Ministério da Saúde. Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos, 2007b.

Netto EM, Shuqair NSMSAQ, Balbino EE, Carvalho ACB. Comentários sobre o registro de fitoterápicos. *Revista Fitos*, 2006, 1 (3), 9-17.

Nicoletti MA, Oliveira-junior MA, Bertasso CC, Coporossi PY, Tavares APL. Principais interações no uso de medicamentos fitoterápicos. *Infarma*, 2007, 19 (1/2), 32-40.

Ogava SEM, Pinto MTC, Kikuchi T, Meneguetti VAF, Martins DBC, Coelho SAD, Marques MJNJ, Virmond JCS, Monteschio P, D'aquino M, Marques LC. Implantação do programa de fitoterapia "Verde Vida" na secretaria de saúde de Maringá (2000-2003). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 2003, 13, 58-62.

Pelozo MIG, Cardoso MLC, Mello, JCP. Spectrophotometric determination of tannins and caffeine in preparations from *Paullinia cupana* var. *sorbilis*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 2008, 51 (3), 447-451.

Rocha LO, Soares MMSR, Corrêa CL. Análise da contaminação fúngica em amostras de *Cassia acutifolia* Delile (sene) e *Peumus boldus* (Molina) Lyons (boldo-do-Chile) comercializadas na cidade de Campinas, Brasil. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 2004, 40 (4), 521-527.

Simões CMO, Schenkel EP. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 2002, 12 (1), 35-40.

Soares FC, Futuro D, Castilho SR. Uso racional das plantas medicinais. Informativo Ceatrim, 2003, outubro.

Sonaglio D, Petrovick PR, Bassani VL. Padronização de extratos vegetais: extrato hidroalcoólico de *Achyrocline satureoides* (LAM.) DC., compositae (Marcela): comparação entre cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia em papel/ultravioleta. Caderno de Farmácia, 1986, 2, (1), 55-74.

Sonaglio D, Ortega GG, Petrovick PR, Bassani VL. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmam G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6 ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2007.

Toledo ACO, Hirata LL, Buffon MCM, Miguel MD, Miguel OG. Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. Revista Lecta, Bragança Paulista, 2003, 21 (1/2), 7-13, jan/dez.

Tomazzoni MI, Negrelle RRB, Centa ML. Fitoterapia popular: a busca instrumental enquanto prática terapêutica. Texto Contexto Enferm., Florianópolis, 2006, 15 (1), 115-121.

Trovo MM, Silva MJP, Leão ER. Terapias alternativas/complementares no ensino público e privado: análise do conhecimento dos acadêmicos de enfermagem. Revista Latino Americana de Enfermagem, 2003, 11 (4), 483-489.

Zaroni M, Pantarolo R, Abrahão WSM, Fávero MLD, Correa Júnior C, Stremel DP. Qualidade microbiológica das plantas medicinais produzidas no Estado do Paraná. Revista Brasileira de Farmacognosia, 2004, 14 (1), 29-39.

Yunes RA, Pedrosa RC, Fechine Filho V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria e fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. Química Nova, 2001, 24 (1), 147-152.

Capítulo II

Aspectos químicos e farmacológicos de *Paullinia*

cupana var. *sorbilis* (Mart.) Ducke

O capítulo trata de uma revisão bibliográfica sobre as propriedades químicas, físico-químicas, físicas e botânicas do guaraná e ainda, apresenta e discute seus efeitos farmacológicos e toxicológicos.

Aspectos químicos e farmacológicos de *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke

Traudi Klein, João Carlos Palazzo de Mello

Departamento de Farmácia e Farmacologia, Universidade Estadual de Maringá, 87020-900, Maringá – PR.

Resumo: O guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke - Sapindaceae) é uma planta brasileira que contém altas concentrações de metilxantinas, como a cafeína, teofilina e teobromina, saponinas e polifenóis especialmente taninos. Estudo químico mostrou presença das seguintes substâncias: cafeína, epicatequina, catequina, *ent*-epicatequina e procianidinas B₁, B₂, B₃, B₄, A₂ e C₁. É utilizada como estimulante do sistema nervoso central, em casos de estresse físico e intelectual, como antidiarréico, diurético e antineurálgico. É ainda indicado nos casos de esgotamento, depressão e no combate à enxaqueca exibindo efeitos antioxidantes e antiamnésia e com baixa toxicidade.

Palavras-chave: *Paullinia cupana*, guaraná, drogas vegetais, fitoterápicos.

Autor para correspondência:

João Carlos Palazzo de Mello, Departamento de Farmácia e Farmacologia, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo 5790, 87020-900, Maringá, PR. Fone: +55 44 30114816; Fax: +55 44 3011-4999. E-mail: traudiklein@yahoo.com.br

INTRODUÇÃO

Plantas medicinais produzem diferentes metabólitos secundários (alcalóides, taninos, flavonóides, saponinas, entre outros) e o fazem em diferentes proporções, dependendo das características edafo-climáticas. Entretanto, algumas substâncias químicas são específicas para um determinado vegetal, e desta forma podem servir como parâmetro para sua caracterização e identificação (GLOBBO-NETO, LOPES, 2007; MIGLIATO et al., 2007). Para a maioria dos fitoterápicos, os princípios ativos que determinam a atividade farmacológica do produto são desconhecidos. Neste caso, a droga vegetal ou extratos derivados desta podem ser considerados o componente ativo fitocomplexo (DAVID et al., 2004).

O guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke - Sapindaceae) é uma planta brasileira originária da região central da Amazônia. Suas sementes contêm altas concentrações de metilxantinas, como a cafeína, teofilina e teobromina, além de saponinas e polifenóis especialmente taninos. É utilizado como estimulante do sistema nervoso central, em casos de estresse físico e intelectual, como antidiarreico, diurético e antineurálgico (HENMAN, 1982; YAMAGUTI-SASAKI et al., 2007). Vários trabalhos já foram realizados com o interesse de se confirmar alguns dos efeitos atribuídos ao guaraná. Alguns experimentos *in vivo* relataram baixa toxicidade desta droga, exibindo efeitos antioxidantes, antiamnésia (ESPINOLA et al., 1997; MATTEI et al., 1998; OTOBONE et al., 2005) e potencial ação como quimiopreventivo na carcinogênese (FUKUMASU et al., 2006). Uma potencial atividade antibacteriana contra *Streptococcus mutans* foi descrita em experimentos *in vitro*, a qual pode ser utilizada na prevenção da placa dental bacteriana (YAMAGUTI-SASAKI et al., 2007). Alguns trabalhos relacionados à ação desta droga no sistema nervoso central relatam um efeito benéfico sobre a cognição, não alterando a atividade locomotora e

uma relevante atividade antidepressiva após tratamento crônico (OTOBONE et al., 2005; OTOBONE et al., 2007).

HISTÓRICO

A família Sapindaceae compreende cerca de 1900 espécies de 125 gêneros e tem uma distribuição predominantemente tropical com a ocorrência de alguns táxons em áreas temperadas (por exemplo, *Acer* L., *Aesculus* L., *Atalaya* Blume, *Diplopeltis* Endl., *Dodonaea* Mill.). A maioria das espécies são nativas da Ásia, porém há algumas na América do Sul, África e Austrália e incluem muitas espécies importantes economicamente (por exemplo, o guaraná (*Paullinia cupana* Mart.), lichia (*Litchi chinensis* Sonn.), longan (*Dimocarpus longan* Lour.), pitomba (*Talisia esculenta* Radlk.) e rambutan (*Nephelium lappaceum* Poir.), a madeira (por exemplo, *Buckeyes* (*Aesculus* L.)) ou como plantas ornamentais (*Koelreuteria* Laxm., *Ungnadia* Endl.) (BUERKI et al., 2009; HERCULANO & MATOS, 2008; MENZEL, 2003).

O guaraná é natural da região norte do Brasil, sendo encontrado principalmente na Amazônia. As partes utilizadas são as sementes, secas e levemente torradas. É comercializado em quatro formas diferentes: em rama, em bastão, em pó e na forma de xaropes e essências. Além de ser muito utilizado no preparo de bebidas refrigerantes devido às suas propriedades estimulantes, suas propriedades lipolítica e vasodilatadora o tornam adequado no preparo de cosméticos indicados para o tratamento da celulite. O guaraná é ainda indicado nos casos de esgotamento, depressão nervosa e no combate à enxaqueca (MORAES et al., 2003).

A planta tem sido estudada há tempos devido às suas propriedades terapêuticas. A primeira descrição data de 1669, quando o missionário jesuíta João Felipe Betendorf esteve na Amazônia observando os índios da região. Estes utilizavam o guaraná como bebida diariamente devido às suas propriedades diuréticas e eficácia contra enxaqueca, febre e

câimbras. Na metade do século XVIII, a atividade antidiarreica passou a ser explorada. A partir daí, muitas características desta planta passaram a ser exploradas e pesquisas em torno da constituição química ganharam espaço (HENMAN, 1982). Por ser amplamente utilizado no mercado farmacêutico, pelo efeito estimulante do sistema nervoso central, o guaraná foi inserido na Farmacopeia Brasileira (Farmacopeia Brasileira, 2003).

A investigação científica das propriedades do guaraná iniciou em 1826 quando isolou-se uma substância cristalina chamada guaranina, a qual se mostrou ser a tetrametilxantina, com a estrutura idêntica à cafeína, e quantidades relativamente grandes de teofilina e teobromina. A partir daí os pesquisadores passaram a atribuir as propriedades medicinais do guaraná as várias xantinas e na quantidade de taninos presentes na planta, que é relativamente alta, cerca de 5–6%, o que pode explicar a ação adstringente do guaraná no trato digestivo (HENMAN, 1982). Segundo dados farmacopeicos a droga vegetal é constituída pelas sementes contendo, no mínimo, 5% de metilxantinas, calculadas como cafeína, e, no mínimo, 4% de taninos (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2003).

Curiosamente, o guaraná foi consumido nos Estados Unidos e na Europa nos séculos XVIII e XIX, e, em seguida, retirado das farmacopéias daquelas regiões até o final do século XX, quando ressurgiu em refrigerantes energéticos e comprimidos afrodisíacos para ficar alerta. As vendas de produtos contendo guaraná continuam aumentando, apesar de algumas preocupações médicas. Os efeitos estimulantes do guaraná são mais duradouros do que os efeitos do café aparentemente porque no guaraná estão presentes os taninos. Nas últimas duas décadas ou mais, o guaraná emergiu como um ingrediente-chave em vários esportes como bebidas energéticas, bem como misturas que, alegadamente, causam um aumento da libido (SMITH e ATROCH, 2007).

ASPECTOS BOTÂNICOS

O guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke - Sapindaceae) tem semente globosa com 0,6 cm a 0,8 cm de diâmetro, sendo coberta por uma casca, que deve ser descartada. Os cotilédones são constituídos por uma epiderme unisseriada, formada por células alongadas tangencialmente e por um parênquima cotiledonar de células arredondadas ou arredondado poliédricas, de 40 a 80 µm de diâmetro. Contém grãos de amido simples e compostos, de formas variadas, globosos, poligonais, ovalados ou elípticos, de 10 a 25 µm de diâmetro. O hilo é central e por vezes ramificado. A maioria dos grãos encontra-se aglutinados e deformados devido ao aquecimento durante a torrefação (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2003).

São características do pó de guaraná: cor castanho clara a castanho-avermelhada, porções de células do parênquima cotiledonar, em geral isodiamétricas, amareladas, com ou sem massas de grãos de amido aglutinados, grãos de amido isolados, com hilo central. Fragmentos do tegumento, quando presentes até o limite permitido, formados por células em paliçada de paredes muito espessas e pouco pontoadas, sinuosas em vista frontal; células pétreas agrupadas ou isoladas (Figura 1) (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2003).

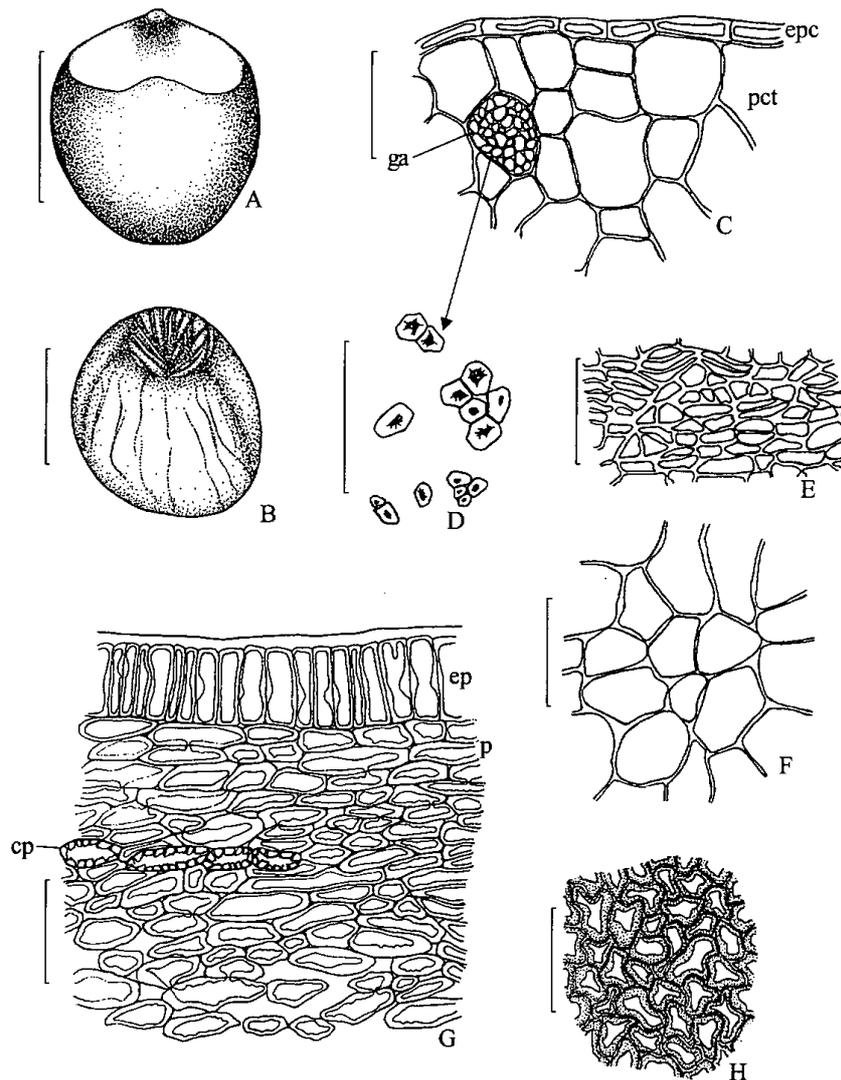


Figura 1. *Paullinia cupana* - A. aspecto geral da semente; B. aspecto geral dos cotilédones; C. secção transversal da porção externa de um cotilédone; epc: epiderme cotiledonar; ga: célula contendo grãos de amido; pct: parênquima cotiledonar; D. detalhe dos grãos de amido; E. células epidérmicas dos cotilédones em vista frontal; F. células parenquimáticas dos cotilédones; G. detalhe da secção transversal do tegumento da semente; cp: células pétreas; ep: epiderme do tegumento; p: parênquima; H. células epidérmicas do tegumento em vista frontal. As escalas correspondem: em 1 cm (A e B); 100 μ m (C até H) (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2003).

ASPECTOS QUÍMICOS E DE QUALIDADE

O guaraná é derivado das sementes da *Paullinia cupana*, uma planta sul americana conhecida por suas propriedades estimulantes. Os efeitos estimulantes da ingestão do guaraná são semelhantes à cafeína, no entanto, a duração da ação pode ser muito diferente com o guaraná, devido à presença de saponinas e taninos. Além do guaraná outras espécies que contêm cafeína são noz de cola, café, chá mate e cacau. A inclusão destas outras espécies vegetais no produto de guaraná necessita de rotulagem e sua presença pode não ser incluída no cálculo do teor de cafeína (BABU et al., 2008).

Demonstrou-se que o extrato semipurificado de guaraná (EPA) possui 180.75 µg catequina/mg de EPA, 278.875 µg epicatequina/mg de EPA) e 300,875 µg cafeína/mg de EPA (KLEIN et al., 2012).

Na caracterização do teor de cafeína no tegumento e amêndoa de sementes de plantas matrizes de guaraná existentes no Instituto Agronômico de São Paulo, encontrou-se que o teor de cafeína nas amêndoas foi de $2,33 \pm 0,38\%$, no tegumento $1,09 \pm 0,29\%$ e nas sementes $2,15 \pm 0,34\%$ (SPOLADORE et al., 1987). Já outro estudo teve como objetivo determinar os teores de cafeína em diferentes marcas de guaraná em pó disponíveis comercialmente. Os teores de cafeína nas amostras apresentaram grande variabilidade, situando-se na faixa de 9,52 a 36,71 mg/g de pó, isso se deve, possivelmente, às diferenças de procedência e processo de secagem a que a matéria-prima foi submetida. Entre os consumidores de guaraná em pó esse produto pode ser considerado uma importante fonte de cafeína na dieta, e sua associação com demais produtos que contêm cafeína sugere que seu consumo deve ser controlado, uma vez que controvérsias persistem quanto à dose segura de ingestão da cafeína (TFOUNI et al., 2007).

Amostras de sementes de guaraná provenientes da região amazônica e secas por diferentes métodos foram analisadas por técnicas farmacopeicas de doseamento de

metilxantinas e dos taninos totais. O maior teor de metilxantinas foi obtido com as sementes secas em tacho metálico por 4 horas com adição de água, enquanto que o maior teor de taninos totais foi obtido em tacho metálico por 4 horas sem água (USHIROBIRA et al., 2004).

Cafeína, teobromina e teofilina são designadas como metilxantinas e fazem parte de um grupo de compostos por vezes classificados como alcalóides verdadeiros (alcalóides purínicos) em razão de sua marcante atividade biológica, distribuição restrita e presença estrutural de nitrogênio heterocíclico (Figura 2). Entretanto, em razão de suas origens biogénicas, provenientes de bases púricas e não de aminoácidos, como também de seu caráter anfotérico, as metilxantinas são mais propriamente classificadas como pseudoalcalóides (MORAES et al., 2003).



Figura 2 – Estruturas químicas das metilxantinas: teofilina, teobromina e cafeína.

A cafeína, identificado como 1,3,7-trimetilxantina, é encontrada em grande quantidade nas sementes de café (*Coffea* sp. L.), nas folhas de chá verde (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze), no cacau (*Theobroma cacao* L.), no guaraná (*Paullinia cupana* Mart.) e na erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.). Embora uma parcela pequena da população consuma cafeína na forma de fármacos, como por exemplo, em antigripais, grande parte deste alcalóide é ingerida na forma de bebidas. Apresenta ação farmacológica variada provocando, dentre outros efeitos,

alterações no sistema nervoso central e sistema cardiovascular. Estes efeitos podem ser descritos como aumento da capacidade de alerta e redução da fadiga, com concomitante melhora no desempenho de atividades que requeiram maior vigilância. 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. 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. Com relação à homeostase de cálcio, dados indicam que a cafeína não é prejudicial ao metabolismo ósseo de indivíduos cujo consumo de cálcio é adequado às suas necessidades metabólicas. Seu consumo moderado (máximo de 4,6 mg/kg de peso), praticado por adultos saudáveis em idade reprodutiva, não está associado a efeitos adversos (DE MARIA e MOREIRA, 2007).

Taninos são substâncias fenólicas solúveis em água que apresentam a 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 outros produtos vegetais. Tradicionalmente 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 o ácido gálico. Já os taninos condensados são oligômeros e polímeros formados pela policondensação de duas ou mais unidades flavan-3-ol e flavan-3,4-diol. Essa última classe de taninos também é denominada como proantocianidinas (SANTOS & MELLO, 2007).

Os taninos condensados exercem efeitos tanto positivos quanto negativos sobre a digestibilidade e desempenho dos animais, dependendo tanto da quantidade quanto da

atividade biológica dos taninos presentes na planta (SCHOFIELD, MBUGUA E PELL, 2001).

O guaraná é amplamente comercializado como medicamento fitoterápico, porém a análise de amostras comerciais demonstra que muitas vezes esses medicamentos estão fora das especificações farmacopeicas de qualidade. Isto demonstra a necessidade de implementação de técnicas quantitativas no controle de qualidade físico-químico de matérias-primas vegetais, além da necessidade de qualificar os fornecedores destes materiais e também reforçam a idéia de que empresas farmacêuticas que adquiram estes produtos devam ter maior critério para o uso das mesmas, armazenando-as e manipulando-as de forma adequada e realizando o controle de qualidade adequado (BARA et al., 2006).

Para que o guaraná atenda as exigências de mercado ele deve ser produzido em larga escala, e há uma preocupação na realização de testes analíticos de controle de qualidade que sejam precisos, sensíveis, reprodutíveis, de fácil execução e baixo custo, tanto para a análise da droga vegetal, quanto para a análise de extratos e derivados. Diversos são os testes analíticos farmacopeicos utilizados para caracterizar a droga vegetal: perda por dessecação, teor de extrativos, teor de resíduo seco e teor de metilxantinas e taninos totais. Espectrofotometria na região do UV e análises cromatográficas por CCD e CLAE também são realizadas, confirmando a necessidade de estabelecimento de um perfil cromatográfico para a padronização de extratos vegetais (ANDRADE et al., 1999; ANTONELLI-USHIROBIRA et al., 2004; PELOZO, CARDOSO, MELLO, 2008).

Sob condições ideais a eletroforese capilar pode alcançar alta eficiência, baixo custo por análise, rapidez, sensibilidade e menor utilização de solventes orgânicos (SOMBRA et al., 2005). Anteriormente, Kofink, Papagiannopoulos e Galensa (2007) empregaram a eletroforese capilar na análise de guaraná demonstrando a separação quiral dos enantiômeros catequina e *ent*-catequina, epicatequina e *ent*-epicatequina, com as condições: capilar de sílica

fundida 75 μm I.D. x 375 μm O.D., cortado em 50 cm, com comprimento efetivo de 40 cm, solução eletrolítica de 100 mmol l^{-1} tampão borato (pH 8,5) adicionado de 12,0 mmol l^{-1} (2-hidroxi)-propil- γ -ciclodextrina, voltagem de 18 kV, detecção em 280 nm, temperatura de 20 $^{\circ}\text{C}$, injeção de amostra por pressão por 3 s a 0,3 psi. Recentemente, Ito desenvolveu método cromatografia eletrocínética micelar na separação e padronização de um extrato semipurificado de guaraná (EPA) e demonstrou ser eficiente na separação quiral da catequina, epicatequina, procianidina B1, B2 e B4, bem como da cafeína (ITO, 2011).

As técnicas termoanalíticas (termogravimetria (TG)/termogravimetria derivada e calorimetria exploratória diferencial) mostram-se como ferramentas potenciais para a obtenção de parâmetros tecnológicos, como técnicas analíticas de controle de qualidade, na análise do teor de umidade e cinzas (ARAÚJO et al., 2006).

Um método por CLAE de identificação e quantificação de marcadores foi desenvolvido para análise de guaraná em bebidas refrigerantes e se baseia não somente na quantidade de cafeína presente, mas também na razão de cafeína/teofilina presente nas amostras. O método inclui extração em fase sólida e separação em fase reversa da cafeína e teofilina por CLAE (MARX & MAIA, 1990). Outro método por CLAE com extrato semipurificado de guaraná (EPA) foi desenvolvido e demonstrou ser eficiente, reprodutível, robusto (KLEIN et al., 2012).

O ensaio químico de uma fração semipurificada de guaraná por ressonância magnética nuclear (RNM) mostrou a presença das seguintes substâncias: cafeína, epicatequina, catequina, *ent*-epicatequina e procianidinas B1, B2, B3, B4, A2 e C1 (Figura 3) (ANTONELLI-USHIROBIRA et al. 2007; YAMAGUTI-SASAKI et al., 2007).

Há uma grande preocupação com a qualidade das drogas vegetais já que diversas amostras comerciais apresentam contaminação fúngica elevada, tornando o produto impróprio para consumo, mesmo quando em embalagens originais da indústria. Não há limites de

contaminação fúngica em amostras de guaraná especificamente na legislação brasileira, tampouco existe qualquer menção à forma de comercialização ou acondicionamento. Uma maneira de diminuir tal problema seria a ionização (raios gama) desses materiais vegetais evitando o risco de contaminação de consumidores e fabricantes, sendo útil na comprovação da qualidade sanitária do produto (AQUINO et al., 2007).

Diversas são as técnicas de secagem dos extratos vegetais e um cuidado deve ser tomado com relação as temperaturas utilizadas nesses processos de secagem. Pesquisadores relatam a técnica de secagem em leito fluidizado e que há uma temperatura ótima de secagem de extratos que é de 120 °C (PAGLIARUSSI, BASTOS e FREITAS, 2006).

Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) representam uma importante classe de carcinógenos químicos formados durante a combustão incompleta de material orgânico e que ocorrem como contaminantes em diferentes tipos de alimentos, devido principalmente à poluição ambiental e alguns tipos de processamentos como a defumação, a secagem e a torrefação. Durante o processamento das sementes de guaraná podem surgir tais substâncias como contaminantes químicos. Os HPAs foram detectados em 81% das amostras de guaraná analisadas, com níveis variando de 0,05 a 8,04 µg/kg. Os resultados indicam que o tipo de processamento utilizado durante a manufatura do guaraná em pó pode resultar na presença desses contaminantes no produto final (CAMARGO et al., 2006).

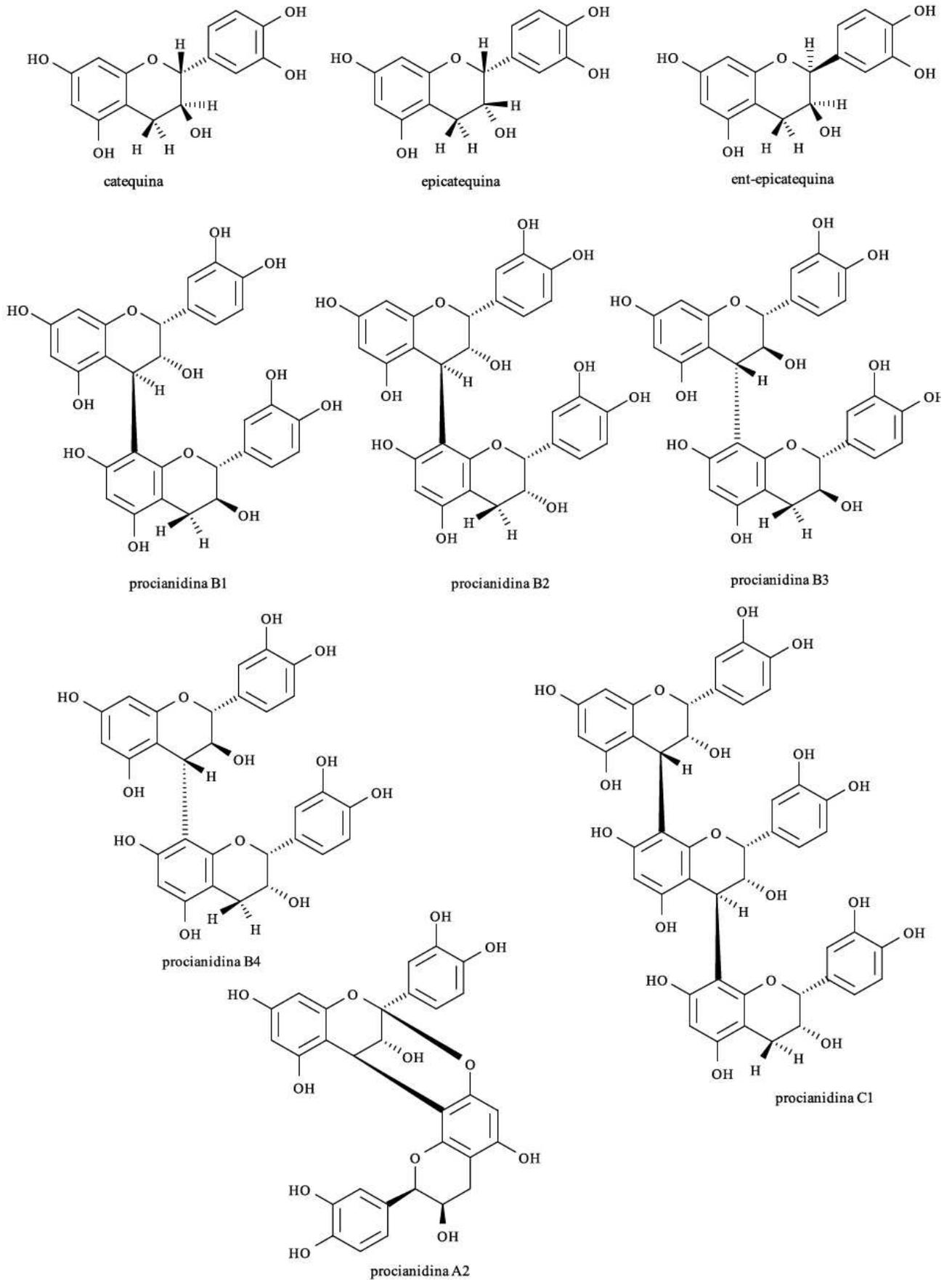


Figura 3. Estruturas químicas isoladas e identificadas no guaraná.

PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS

Certas plantas e produtos fitoterápicos, vendidos como suplementos alimentares, são medicamentos populares muitas vezes com uso abusivo e anunciados como seguros e com apelo ao natural. Como muitos suplementos alimentares, no entanto, estas substâncias são regulamentadas, porém sem estudos de segurança e podem ter efeitos clínicos estimulantes e alucinógenos, mas sítios da Internet continuam a tornar esses produtos facilmente disponíveis e acessíveis. Uma grande variedade de suplementos para perda de peso são comercializados com alegações de eficácia. A falta de dados de segurança e/ou mesmo de eficácia dos muitos ingredientes encontrados nestes produtos, mesmo os ingredientes mais frequentemente incluídos, é causa de preocupação. Uma série de eventos adversos são relatados com o uso do guaraná e incluem irritabilidade, palpitações, ansiedade e distúrbios do sistema nervoso central (PITTLER, SCHMIDT e ERNST, 2005; SHARPE et al., 2006; RICHARDSON, SLONE E MICHELS, 2007).

Preparações contendo guaraná em conjunto com outras drogas vegetais são muito utilizadas para perda de peso (ANDERSEN & FOGH, 2001), estimulante do organismo, energético, tônico e afrodisíaco (OLIVEIRA et al., 2005), efeitos psicoativos na melhora da fadiga mental e cognição (KENNEDY et al., 2004; KENNEDY et al., 2008).

Em estudo para verificar os efeitos agudos do guaraná na cognição, ansiedade e sono em voluntários normais, os resultados foram negativos, sugerindo a necessidade de estudos com tratamentos crônicos, como utilizado popularmente (GALDURÓZ E CARLINI, 1994). Já avaliando a administração crônica do guaraná sobre a cognição de voluntários normais e idosos, os resultados não causaram alterações suficientes para caracterizar qualquer manifestação clínica detectável. No entanto, duas questões podem explicar essas falhas: o tempo de tratamento com guaraná foi insuficiente, e que os testes utilizados não foram suficientemente sensíveis para detectar as alterações esperadas (GALDURÓZ E CARLINI,

1996). Segundo Ernst (2006) muitas drogas vegetais são utilizadas no tratamento de ansiedade porém a *P. cupana* não demonstra qualquer atividade em quadros de ansiedade (ERNST, 2006).

Extratos bruto e semipurificado de guaraná apresentam efeito antidepressivo com o tratamento crônico comparável ao do antidepressivo imipramina. Sugere-se que estes efeitos não podem ser relacionados com as metilxantinas presentes porque os resultados obtidos com a cafeína isoladamente são diferentes daqueles encontrados com a administração dos extratos. Assim, alguns taninos condensados, que foram isolados da fração semipurificada poderiam ser os responsáveis por esta atividade, já que podem agir no sistema nervoso central porque conseguem atravessar a barreira hemato-encefálica (JOHNSTON, BEART, 2004; FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ, 2000; OTOBONE et al., 2007; YAMAGUTI-SASAKI et al., 2007). Sugere-se que um outro mecanismo que não o de bloqueador de agonista de adenosina, adenosina ciclopentil (CPA), esteja envolvido na atividade antidepressiva do guaraná, pois a cafeína e não o guaraná apresenta este mecanismo (CAMPOS et al., 2005).

O extrato semipurificado demonstrou também capacidade antioxidante e potencial atividade antibacteriana contra *Streptococcus mutans*, atividade que pode ser utilizada na prevenção da placa dental bacteriana. Os resultados da atividade antioxidante e antibacteriana contra *S. mutans* demonstraram que as atividades são diretamente proporcionais à quantidade de polifenóis presentes no extrato (YAMAGUTI-SASAKI et al., 2007). Também foram testados *in vitro* os extratos e substâncias isoladas contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, e mesmo em concentrações de até 1000 mg/ml, não houve atividade contra esses microrganismos (ANTONELLI-USHIROBIRA et al., 2007). Trabalho clínico avaliou a atividade do extrato aquoso produzido com sementes de guaraná a 5 e 7,5%, sobre a formação de placa bacteriana dentária, comparando-o com o

gluconato de clorexidina a 0,12%, empregando-se o bochecho como forma aplicativa. A atividade antiplaca foi determinada segundo do método de Greene e Vermillion através do índice de higiene oral simplificado em indivíduos livres de cáries e doenças periodontais. Os resultados analisados comprovaram estatisticamente a eficiência dos extrativos de guaraná em relação ao controle positivo (BARBOSA & MELLO, 2004).

O guaraná apresenta as seguintes propriedades: atividade antioxidante, um possível efeito antidepressivo, efeito positivo sobre transtorno do pânico, e para produzir reversão parcial da amnésia induzida por escopolamina (FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ, 2000; OTOBONE et al., 2005; MENDES, CARLINI, 2007; KENNEDY et al., 2008; AUDI et al., 2010; RONCON et al., 2011;).

O guaraná (suspensão do pó) aumenta significativamente a capacidade física de ratos, mesmo quando submetido a uma situação estressante, como a natação forçada e após 100 e 200 dias de tratamento e é capaz de reverter parcialmente amnésia causada pela escopolamina, medido através de um teste evasão passiva em camundongos e ratos, indicando um efeito positivo sobre a memória e ausência de toxicidade do guaraná nas condições testadas (ESPINOLA et al., 1997).

O guaraná não apresenta efeitos tóxicos em ratos e camundongos após a administração aguda e crônica. A ausência de toxicidade de guaraná também foi demonstrada por exame histopatológico, nenhuma alteração foi detectada no coração, pulmão, estômago, intestinos, fígado, pâncreas, rins, bexiga e baço (MATTEI et al., 1998; OTOBONE et al., 2005; ANTONELLI-USHIROBIRA et al., 2010). Uma formulação fitoterápica contendo *Anemopaegma mirandum* (Cham.) Mart. ex DC. (catuaba), *Cola nitida* A. Chev. (nóz de cola), *Passiflora alata* Curtis (maracujá), *Paullinia cupana* Mart. (guaraná), *Ptychopetalum olacoides* Benth. (marapuama) e cloridrato de tiamina (Nerviton®) foi investigada quanto aos potenciais efeitos tóxicos e os resultados mostraram que a formulação não causou efeitos

tóxicos quando administrado por via oral em doses repetidas (MELLO, MELLO E LANGELOH, 2010).

Assim como em outras espécies, o guaraná tem sido utilizado pelo seu efeito adaptógeno e por isso muito útil em casos de dependência de drogas, particularmente para aliviar a ressaca do abuso de bebidas alcoólicas (CARLINI et al., 2006).

O guaraná foi testado para sua capacidade de induzir toxicidade *in vitro* em células de ovário de hamster chinês e células bacterianas (*Photobacterium phosphoreum*). Os efeitos citotóxicos de extratos aquosos de guaraná foram avaliados e os resultados sugerem que, *in vitro*, a concentração de guaraná é de fundamental importância na sua atividade citotóxica e doses elevadas podem ser prejudiciais para a saúde humana (SANTA MARIA et al., 1998).

O extrato de guaraná tem uma propriedade gastroprotetora e oferece benefícios terapêuticos muito melhores que a cafeína nos distúrbios gastrointestinais (CAMPOS et al., 2003). Apresenta também diversas substâncias com propriedades sabidamente quimiopreventivas e antineoplásicas, como as metilxantinas e polifenóis, e pode agir como quimiopreventivo na carcinogênese, reduzindo a expansão de células preneoplásicas, diminuindo a proliferação e aumentando a apoptose das células tumorais, consequentemente, reduzindo a área do tumor (FUKUMASU et al., 2006; FUKUMASU et al., 2008). Teve um efeito protetor contra danos no DNA induzidos por DEN (Nitrosodietilamina) em fígado de rato (FUKUMASU et al., 2006a). Exibe interessantes atividades antibacteriana e antioxidante, (MATTEI et al., 1998; BASILE et al., 2005) e pode ser utilizado como um aditivo em alimentos naturais, cosméticos e em medicamentos (MAJHENIC, SKERJET, KNEZ, 2007).

O guaraná foi colocado entre as plantas com atividade psicoanalépticas (estimulantes) com ênfase em propriedades anorexígenas ou propriedades de redução de peso. O guaraná, graças ao seu conteúdo em metilxantinas, é capaz, entre outros efeitos, de bloquear a adenosina e receptores que inibem a fosfodiesterase, que aumenta ações de noradrenalina

(CARLINI, 2003). O consumo de guaraná é capaz de induzir mudanças no metabolismo lipídico, mas as substâncias que realmente induzem às alterações relatadas parece estar envolvidas com o conteúdo de metilxantinas do extrato (LIMA et al., 2005). O extrato seco de guaraná (ESG) é rico em cafeína, a qual vem sendo utilizada em formulações tópicas destinadas à prevenção e tratamento da lipodistrofia ginóide porque causa aumento do número de vasos sanguíneos na derme (CHORILLI et al., 2004). A liberação transdérmica simultânea das principais substâncias presentes nos extratos de guaraná foi estabelecida, com taxas de penetração sendo altamente dependentes da concentração e do veículo (HEARD et al., 2006).

Há relatos de que extratos comerciais de guaraná influenciam a ligação de radiofármacos, tais como o ácido technetium-99m-dimercaptosuccínico (^{99m}Tc -DMSA), nos constituintes celulares do sangue. O mecanismo desta ação não está completamente elucidada, mas sugere-se que o extrato pode afetar os sítios de ação dos radiofármacos (FREITAS et al., 2007).

Em avaliação do efeito do extrato de guaraná nos sintomas de fadiga e de depressão induzidos pela quimioterapia em pacientes com tumores sólidos, o mesmo não se mostrou benéfico para a prevenção de fadiga ou de sintomas de depressão relacionados à quimioterapia sistêmica (MIRANDA et al., 2008).

Segundo Nicoletti et al. (2007) algumas interações medicamentosas têm sido atribuídas ao guaraná: ele potencia a ação de analgésicos e, quando administrado com anticoagulantes pode inibir a agregação de plaquetas aumentando o risco de sangramento.

CONCLUSÃO

O guaraná é uma planta brasileira de utilização mundial e tem sido amplamente utilizado nas indústrias alimentícia e farmacêutica. Tem sido atribuído ao guaraná diversos efeitos farmacológicos e suas características físicas, físico-químicas e químicas já estão

bastante elucidadas. Devido ao grande interesse industrial pelo produto, grande quantidade de estudos são publicados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSEN T; FOGH J. Weight loss and delayed gastric emptying following a South American herbal preparation in overweight patients. **J Hum Nutr Dietet**, v. 14, p. 243-250, 2001.

ANDRADE, L.; SCHENKEL, E. P.; BERGOLD, A. M. Estudo da metodologia de análise de cafeína em sementes de guaraná (*Paullinia cupana*). **Rev. Bras. Farm.**, v. 80 (1/2), p. 7-9, 1999.

ANTONELLI-USHIROBIRA, TM; KANESHIMA, EN, GABRIEL, M; AUDI, EA; MARQUES, LC; MELLO, JCP. Acute and subchronic toxicological evaluation of the semipurified extract of seeds of guaraná (*Paullinia cupana*) in rodents. **Food and Chemical Toxicology**, 48 (2010) 1817–1820.

ANTONELLI-USHIROBIRA, T.M.; YAMAGUTI E.; UEMURA 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**, v. 26, n. 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* H.B.K. var. *sorbilis* (Mart.) Ducke. **Acta Farm. Bonaerense**, v. 23, n. 3, p. 383-386, 2004.

AQUINO, S.; GONÇALEZ, E., REIS, T. A.; SABUNDJIAN, I. T.; TRINDADE, R. A.; ROSSI, M. H.; CORRÊA, B.; VILLAVICENCIO, A. L. C. H. Effect of γ -irradiation on

mycoflora of guarana (*Paullinia cupana*). **Radiation Physics and Chemistry**, v. 76 p. 1470–1473, 2007).

ARAÚJO, A.A.de S.; MERCURI, L. P.; SEIXAS, S.R.S.; STORPIRTIS S.; MATOS, J. do R. Determinação dos teores de umidade e cinzas de amostras comerciais de guaraná utilizando métodos convencionais e análise térmica. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 2, abr./jun., 2006.

AUDI, E.A., RONCON, C.M., ALMEIDA, C.B., MELLO, J.C.P. Effect of semi-purified constituent from guaraná seeds on performance of rats in elevated T maze. *European Neuropsychopharmacology* 20, S274, 2010.

BABU K.M.; CHURCH R.J.; LEWANDER W. Energy Drinks: The New Eye-Opener For Adolescents. **Clin Ped Emerg Méd**, v. 9, p. 35-42, 2008.

BARA, M.T., 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. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 2, p. 211-215, Abr./Jun. 2006.

BARBOSA, G. D. A, MELLO, J. C. P. Clinical evaluation of the guarana extract on the dental plaque control. **Rev. Paul. Odontol**, v. 26, n. 4, p. 28-30, jul.-ago, 2004.

BASILE, A.; FERRAR, L.; DEL PEZZO, M.; MELE, G.; SORBO, S.; BASSI, P.; MONTESANO, D. Antibacterial and antioxidant activities of ethanol extract from *Paullinia cupana* Mart. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102 p. 32–36, 2005.

BAUMANN, T. W.; SCHULTHESS, B. H.; HÄNNI, K. Guaraná (*Paullinia cupana*) rewards seed dispersers without intoxicating them by caffeine. **Phytochemistry**, v. 39, n. 5, p. 1063-1070, 1995.

BUERKI S.; FOREST F.; ACEVEDO-RODRÍGUEZ P., CALLMANDER M. W.; NYLANDER J.A.A.; HARRINGTON M.; ISABEL SANMARTÍN I.; KÜPFER P.,

ALVAREZ N. Plastid and nuclear DNA markers reveal intricate relationships at subfamilial and tribal levels in the soapberry family (Sapindaceae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 51, p. 238–258, 2009.

CAMARGO, M.C.R.; TFOUNI, S.A.V.; VITORINO, S.H.P.; MENEGÁRIO, T.F.; TOLEDO, M.C.F. Determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (hpas) em guaraná em pó (*Paullinia cupana*). *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 26(1): 230-234, jan.-mar. 2006.

CAMPOS AR; BARROS AIS; SANTOS FA; RAO VSN. Guarana (*Paullinia cupana* Mart.) Offers Protection Against Gastric Lesions Induced by Ethanol and Indomethacin in Rats. **Phytother. Res.**, v. 17, p. 1199–1202, 2003.

CAMPOS A. R.; , BARROS A. I. S., ALBUQUERQUE F. A. A., LEAL L. K. A. M.; RAO V.S.N. Acute effects of Guarana (*Paullinia cupana* Mart.) on mouse behaviour in forced swimming and open field tests. **Phytother. Res.**, v. 19, p. 441–443, 2005.

CARLINI, E. A. Plants and the central nervous system. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 75, p. 501–512, 2003.

CARLINI, E.A.; RODRIGUES, E.; MENDES F.R.; TABACH, R.; GIANFRATTI, B. Treatment of drug dependence with brazilian herbal medicines. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, 16(Supl.): 690-695, Dez. 2006.

CHORILLI, M.; RIBEIRO, M. C. A. P.; PIRES-DE-CAMPOS, M. S. M.; LEONARDI, G. R.; POLACOW, M. L. O. Efeito de emulsão contendo extrato seco de guaraná sobre os vasos sanguíneos da derme papilar de ratos. **Saúde Rev.**, Piracicaba, v. 6, n. 14, p. 07-12, 2004.

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

DAVID, J. P.; NASCIMENTO, J. A. P.; DAVID, J. M. Produtos fitoterápicos: uma perspectiva de negócio para a indústria, um campo pouco explorado pelos farmacêuticos.

Infarma, v. 16, n. 9-10, p. 71-76, 2004.

ERNST, E. Herbal remedies for anxiety – a systematic review of controlled clinical trials.

Phytomedicine, v. 13, p. 205–208, 2006.

ESPINOLA, E. B.; DIAS, R. F.; MATTEI, R.; CARLINI, E. A. Pharmacological activity of Guaraná (*Paullinia cupana* Mart.) in laboratory animals. **Journal of Ethnopharmacology**, v.

55, p. 223-229, 1997.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2003.

FREITAS, R. S.; MORENO, S. R. F.; LIMA-FILHO, G. L.; FONSECA, A. S.;

BERNARDO-FILHO, M. Effect of a commercial extract of *Paullinia cupana* (guarana) on the binding of ^{99m}Tc-DMSA on blood constituents: An in vivo study. **Applied Radiation and**

Isotopes v. 65, p. 528–533, 2007.

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ, Elisabeth Aparecida Audi, João Carlos Palazzo de Mello. Efeito antidepressivo do extrato da droga vegetal guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Martius) Ducke). Cl. Int. A61P 25/24; A61K 35/78. BR n. PI00066389. 28/11/2000.

FUKUMASU, H.; AVANZO, J. L.; HEIDOR, R.; SILVA, T. C.; ATROCH, A.; MORENO,

F. S.; DAGLI, M. L. Z. Protective effects of guarana (*Paullinia cupana* Mart. var. *Sorbilis*) against DEN-induced DNA damage on mouse liver. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44,

p. 862–867, 2006.

FUKUMASU, AVANZO, J.L.; NAGAMINE, M.K.; BARBUTO, J.A.; RAO, K.V.; DAGLI,

M.L.Z. *Paullinia cupana* Mart var. *sorbilis*, guaraná, reduces cell proliferation and increases

apoptosis of B16/F10 melanoma lung metastases in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** v. 41, p. 305-310, 2008.

FUKUMASU, H.; SILVA, T. C.; AVANZO, J. L.; LIMA, C. E.; MACKOWIAK, I. I.; ATROCH, A.; SPINOSA, H. S.; MORENO, F. S.; DAGLI, M. L. Z. Chemopreventive effects of *Paullinia cupana* Mart. *Var. sorbilis*, the guaraná, on mouse hepatocarcinogenesis. **Cancer Letters**, v. 233, p. 158-164, 2006.

GALDURÓZ, JCF; CARLINI, E de A. Acute effects of the *Paullinia cupana*, “Guaraná” on the cognition of normal volunteers. **São Paulo Medical Journal**, v. 112, n. 3, p. 607-611, 1994.

GALDURÓZ, JCF; CARLINI, E de A. The effects of long-term administration of guarana on the cognition of normal, elderly volunteers. **Sao Paulo Medical Journal**, v.114, n.1, p. 1073-1078, 1996.

GOBBO NETO, L. ; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

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.

HENMAN, A. R. Guaraná (*Paullinina cupana* var. *sorbilis*): ecological and social perspectives on an economic plant of the central amazon basin. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 6, p. 311-338, 1982.

HERCULANO, A. C. M.; MATOS, W. L. Levantamento das espécies de Sapindáceas arbóreas no estado do Rio de Janeiro. **Saúde & Ambiente em Revista**, Duque de Caxias, v. 3, n. 1, p. 76-85, jan-jun, 2008.

ITO, L. A. Desenvolvimento de metodologia analítica por eletroforese capilar para separação e identificação de cafeína e flavan-3-ol em extrato de *Paullini cupana* var. *sorbilis* (Mart.)

DUCKE – SAPINDACEAE. Dissertação, 139 fls. 2011.

JOHNSTON, G. A. R.; BEART, P. M. Flavonoids: some wisdom of sage?. **British Journal of Pharmacology**, v. 142, p. 809-810, 2004.

KENNEDY, D. O.; HASKELL, C. F.; WESNES, K. A.; SCHOLEY, A. B. Improved cognitive performance in human volunteers following administration of guaraná (*Paullinia cupana*) extract: comparison and interaction with *Panax ginseng*. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 79, p. 401–411, 2004.

KENNEDY, D. O.; HASKELL, C. F.; ROBERTSON, B.; REAY, J.; BREWSTER-MAUND, J. C.; LUEDEMANN, J.; MAGGINI, S.; RUF, M.; ZANGARA, A.; SCHOLEY, A. B. Improved cognitive performance and mental fatigue following a multi-vitamin and mineral supplement with added guaraná (*Paullinia cupana*). **Appetite**, v. 50, p. 506–513, 2008.

KLEIN, T., LONGHINI, R., MELLO, J.C.P. Development of an analytical method using reversed-phase HPLC-PDA for a semipurified extract of *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (guaraná). *Talanta*, v. 88, p. 502–506, 2012..

KOFINK, M., PAPAGIANNPOULOS M.; GALENSA R. (-)-Catechin in Cocoa and chocolate: Occurrence and Analysis of an Atypical Flavan-3-ol Enantiomer. **Molecules** , 12(7), 1274-1288, 2007.

LIMA, W. P.; CARNEVALI JR, L. C.; EDER, R.; ROSA, L. F. B. P. C.; BACCHI, E. M.; SEELAENDERA, M. C. L. Lipid metabolism in trained rats: Effect of guaraná (*Paullinia cupana* Mart.) supplementation. **Clinical Nutrition**, v. 24, p. 1019–1028, 2005.

- MAJHENIC, L.; MOJCA KERGET, M.; KNEZ, E. Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. **Food Chemistry**, v. 104, p. 1258–1268, 2007.
- MANACH, C.; WILLIAMSON, G.; MORAND, C.; SCALBERT, A.; RÉMÉSY, C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *American Journal of Clinical Nutrition* 81, 230–242, 2005.
- MARX, F.; MAIA, J. G. Analysis of guaraná (*Paullinia cupara* var, *sorbilis*). III. Identification and determination of guaraná beverages by HPLC analysis of caffeine and theophylline. **Química Nova**, v. 13, n. 4, 1990.
- MATTEI, R.; DIAS, R. F.; ESPINOLA, E. B.; CARLINI, E. A.; BARROS, S. B. M. Guaraná (*Paullinia cupana*): toxic behavioral effects in laboratory animals and antioxidant activity in vitro. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 60, p. 111-116, 1998.
- MELLO, JRB; MELLO, FB; LANGELOH, A. Toxicidade Pré-Clinica de Fitoterápico com *Anemopaegma mirandum*, *Cola nitida*, *Passiflora alata*, *Paullinia cupana*, *Ptychopetalum olacoides* e Tiamina. **Latin American Journal of Pharmacy**, 29 (1): 57-63, 2010.
- MENDES, F. R.; CARLINI, E. A. Brazilian plants as possible adaptogens: An ethnopharmacological survey of books edited in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, p. 493–500, 2007.
- MENZEL, C. M. Fruits of tropical climates Fruits of the sapindaceae. **Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition**, p. 2786-2790, 2003.
- MIGLIATO, K. F.; MOREIRA, R. R. D.; MELLO, J. C. P.; SACRAMENTO, L. V. S.; CORRÊA, M. A.; SALGADO, H. R. N. Controle de qualidade do fruto de *Syzygium cumini* (L.) Skeels. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 94-101, 2007.

MIRANDA, V. C.; TRUFELLI D. C.; FÊDE A. B. S.; MARTINS F.D.; SAAD L. S., OLIVEIRA V.; TRINDADE T. Z. C.; RIECHELMANN R.; GIGLIO A. D. Guarana (*Paullinia cupana*) for chemotherapy-related fatigue. **Einstein**, v. 6, n. 2, p. 195-199, 2008.

MORAES, M. L. L.; MICKE, G. A.; FUJYIA, N. M.; TAVARES, M. F. M. Separação e análise de metilxantinas em extratos de guaraná e erva mate por eletroforese capilar. **Revista Analytica**, junho/julho, n. 5, 2003.

NICOLETTI, M. A.; OLIVEIRA-JUNIOR, M. A.; BERTASSO, C. C.; COPOROSSO, P. Y.; TAVARES, A. P. L. Principais interações no uso de medicamentos fitoterápicos. **Infarma**, v. 19, n. 1/2, p. 32-40, 2007.

OLIVEIRA, C.H.; MORAES, M.E.A.; MORAES, M.O.; BEZERRA, F.A.F.; ABIB, E.; DE NUCCI, G. Clinical toxicology study of an herbal medicinal extract of *Paullinia cupana*, *Trichilia catigua*, *Ptychopetalum olacoides* and *Zingiber of.cinale* (Catuama[®]) in healthy volunteers. **Phytother. Res.**, v.19, p.54–57, 2005.

OTOBONE, F. J.; SANCHES, A. C.; NAGAE, R. L.; MARTINS, J. V. C.; OBICI, S.; MELLO, J. C. P.; AUDI, E. A. Effect of crude extract and its semi purified constituents from guaraná seeds (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.)) Lucke on cognitive performance in morris water maze in rats. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, p. 723-728, 2005.

OTOBONE, F. J.; SANCHES, A. C. C.; MAGAE, R. L.; MARTINS, J. V. C.; SELA, V. R.; MELLO, J. C. P.; AUDI, E. A. Effect off liophilized extracts from guaraná seeds [*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke] on behavioral profiles in rats. **Phitoterapy Research**, v. 21, p. 531-535, 2007.

PAGLIARUSSI RS; BASTOS JK; FREITAS, LAP. Fluid Bed Drying of Guarana (*Paullinia cupana* HBK) Extract: Effect of Process Factors on Caffeine Content. **AAPS PharmSciTech**, v. 7, n. 2, p. E1-E7, 2006.

PELOZO, M. I. G.; CARDOSO, M. L. C.; MELLO, J. C. P. Spectrophotometric determination of tannins and caffeine in preparations from *Paullinia cupana* var. *sorbilis*. **Braz. arch. biol. technol.**, v.51, n.3, p. 447-451, Maio/Junho, 2008.

PITTLER M. H., SCHMIDT. K.; ERNST E. Adverse events of herbal food supplements for body weight reduction: systematic review. **The International Association for the Study of Obesity. Obesity Reviews**, v. 6, p. 93–111, 2005.

RICHARDSON, W.H.; SLONE, C.M.; MICHELS, J.E. Herbal drugs of abuse: an emerging problem. **Emerg Med Clin N Am**, v. 25, p. 435–457, 2007.

RONCON, C.M.; DE ALMEIDA, C.B.; KLEIN, T.; MELLO, J.C.P.; AUDI, E.A. Anxiolytic effects of a semipurified constituent of guaraná seeds on rats in the elevated T-maze test. *Planta Medica* 77, 236-241, 2011.

SANSONE, F.; PICERNO, P.; MENCHERINI, T.; VILLECO, F.; D'URSI, A.M.; AQUINO, R.P.; LAURO, M.R. Flavonoid microparticles by spray-drying: influence of enhancers of the dissolution rate properties and stability. *Journal of Food Engineering* 103, 188-196, 2011.

SANTA MARIA, A.; LOPEZ, A.; DIAZ, M. M.; MUNHOZ-MINGARRO, D.; POZULEO, J. M. Evaluation of the toxicity of guarana with *in vitro* bioassays. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 39, p. 164–167, 1998.

SANTOS S.C.; MELLO J.C.P. Taninos. In: Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G. Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. Orgs. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6. ed. Porto alegre: Editora da UFRGS; 2007.

SHARPE, P.A.; GRANNER, M.L.; CONWAY, J.M.; AINSWORTH, B.E.; DOBRE, M. Availability of weight-loss supplements: results of an audit of retail outlets in a southeastern city. **Journal of the American Dietetic Association**, p. 2045-2051, 2006.

SHOFIELD, P.; MBUGUA, D.M.; PELL, A. N. Analysis of condensed tannins: a review. **Animal Feed Science and Technology**, v.91, 21-40, 2001.

SMITH, N.; ATROCH, A. L. Guarana's Journey from Regional Tonic to Aphrodisiac and Global Energy Drink. **eCAM**; 1- 4, 2007.

SOMBRA, L. L.; GÓMEZ, M. R.; OLSINA, R.; LUIS D. 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.

SPOLADORE, D. S.; BOAVENTURA, M. A. M.; SÁES, L. A. Teor de cafeína em sementes matrizes do guaranazeiro. **Bragantia**, Campinas, v. 46, n. 2, p. 425-429, 1987.

TFOUNI, S. A. V.; CAMARGO, M. C. R.; VITORINO, S. H. P. MENEGÁRIO, T. F.; TOLEDO, M. C. F. Contribution of guaraná powder (*Paullinia cupana*) as a source of caffeine in the diet. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 20, n. 1, p.63-68, jan/fev, 2007.

USHIROBIRA, T. M. A.; YAMAGUTI, E.; UEMURA, L. M.; AUDI, E. A.; MELLO, J. C. P. de. Avaliação físico-química de sementes de guaraná secas por diferentes métodos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, n. 1, p. 15-20, 2004.

USHIROBIRA, T. M. A.; YAMAGUTI, E.; UEMURA, L. M.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P.; MELLO, J. C. P. Chemical and microbiological study of extract from seeds of guraraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*). **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 26, p. 5-9, 2007.

YAMAGUTI-SASAKI, E.; ITO, L.A.; CANTELI, V.C.D.; USHIROBIRA, T.M.A.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B.P.; NAKAMURA, C.V.; MELLO, J.C.P. Antioxidant capacity and *in vitro* prevention of dental plaque formation by extracts and condensed tannins of *Paullinia cupana*. **Molecules**, v. 12, p. 1950-1963, 2007.

Capítulo III

Development of an analytical method using reversed-phase HPLC-PDA for a semipurified extract of *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (guaraná)

O capítulo III trata do desenvolvimento de um método analítico para quantificação dos marcadores químicos catequina e epicatequina em extrato semipurificado de guaraná (EPA) e a validação deste método analítico para posterior padronização química do extrato.

Development of an analytical method using reversed-phase HPLC-PDA for a semipurified extract of *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (guaraná)

Traudi Klein, Renata Longhini, João Carlos Palazzo de Mello*

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Departamento de Farmácia, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, Maringá, PR, BR-87020-900, Brazil

Talanta, v. 88, p. 502–506, 2012.

*Corresponding author. Tel.: +55-44-3011-4816; fax: +55-44-3011-5050

E-mail address: mello@uem.br (J.C.P. de Mello)

ABSTRACT

The Neotropical plant 'guaraná' has been widely used in medicine, cosmetics, and industry because of its versatile biological activities. These effects are mainly attributed to the presence of polyphenols. An efficient, precise, and reliable method was developed for quantification of the polyphenols catechin and epicatechin in guaraná extract solution, using HPLC-PDA detection. The ideal conditions for the analysis of a semipurified extract of guaraná (EPA), using solutions of 0.05% TFA-water (phase A) and 0.05% TFA in acetonitrile:methanol (75:25, v v⁻¹) (phase B) as mobile phases were established. Gradient reversed-phase chromatography was performed using a guard cartridge (C18, 4.6 x 20 mm, 4 µm) and column (C18, 250 x 4.6 mm, 4 µm), flow of 0.5 mL min⁻¹ and detection at 280 nm. The main validation parameters of the method were also determined. The method was linear over a range of 18.75-300 µg mL⁻¹ for catechin and epicatechin, with detection limits of 0.70 and 0.88 µg mL⁻¹ and quantification limits of 2.13 and 2.67 µg mL⁻¹, respectively. The method also showed consistent mean recoveries of 91.3±3.8%, 2.14 RSD and 93.4±3.1, 2.74 RSD of catechin and epicatechin respectively. The relative standard deviations were relatively low: intra-day (0.72% and 0.66% for catechin and epicatechin, respectively) and inter-day (0.93% and 0.75% for catechin and epicatechin, respectively). The semipurified extract showed catechin, epicatechin, and caffeine contents of 180.75, 278.87, and 300.87 µg mg⁻¹, respectively. The results demonstrated the efficiency, precision, accuracy, and robustness of the proposed method. The solutions remained stable for a sufficient time (one week) to complete the analytical process.

Key words: *Paullinia cupana*; HPLC-PDA; Analytical validation; Polyphenols.

1. Introduction

The guaraná plant (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke, Sapindaceae) is widely distributed in the Amazon region and also grows in northeastern Brazil, including the state of Bahia. Its seeds, used in popular medicine, contain large amounts of methylxanthines including caffeine, theophyllin and theobromin, saponins, and polyphenols, especially tannins [1,2]. Guaraná extract is used as a stimulant of the central nervous system, in cases of physical and mental stress, and as an antidiarrheal, diuretic, and antineuralgic [1,3]. The antidepressive effect has been reported to be comparable to that of the tricyclic antidepressant imipramine, and with a beneficial effect on cognition, without altering locomotor activity [4-8]. Guaraná extract also shows low toxicity, with antioxidant and anti-amnesiac effects [5,6,9-11], potential effect as a chemoprophylactic in carcinogenesis [9], and potential antibactericidal activity against *Streptococcus mutans*, a cause of bacterial dental plaque [3].

Chemical assay of a semipurified fraction of guaraná (EPA) showed the presence of caffeine, epicatechin, catechin, *ent*-epicatechin and procyanidins B1, B2, B3, B4, A2 and C1 [2,3]. This fraction showed an antidepressant effect on animals that received chronic treatment. This activity could not be related to the methylxanthines present, because when caffeine is tested in isolation, the effects differ from those of the EPA fraction. This suggests that the activity results from the presence of other constituents, and the condensed tannins may be the responsible agents; condensed tannins can cross the blood-brain barrier and act on the central nervous system [2,5,6,12]. Previous studies found that the EPA fraction of guaraná caused no toxicity in rats at the smallest dose evaluated (30 mg kg⁻¹) [13].

The potential for using guaraná in a wide range of medicinal applications justifies the interest in the quality control and standardization of its preparations. Capillary electrophoresis [14,15], mass spectrometry, and high-performance liquid chromatography (HPLC) [16,17]

have been used to analyze the polyphenols, but the analytical procedures were complex, with long analysis times and dependent on the use of several polyphenols, analytical standards, and expensive reagents. Some analytical methods have employed HPLC to analyze *Paullinia cupana*, but most of them describe the separation of methylxanthines [14,18-20]. Polyphenols, mainly tannins, have been isolated from other plants, but the method is often time-consuming (30 to 36 min [21]; 50 min [22]; 55 to 106 min [23]).

The aim of the present study was to develop and validate a reversed-phase HPLC-photodiode array (PDA) method for the separation and quantification of the catechin and epicatechin constituents in semipurified extract of guaraná. The main validation parameters of the method were also determined.

2. Experimental

2.1 Chemicals and reagents

Methanol and acetonitrile (J.T. Baker; HPLC grade), water filtered through a Milli-Q apparatus (Millipore), and trifluoroacetic acid (TFA) (J.T. Baker) were used as the mobile phase. Analytical-grade standards of catechin, epicatechin, and caffeine (Sigma) were used as external standards. Procyanidins B1 and B2 were isolated and identified by Ushirobira et al. [2] and Yamaguti-Sasaki et al. [3]. Acetone and ethyl acetate (Merck; analytical grade) were also used.

2.2 Apparatus

High performance liquid chromatography analyses were performed using a Thermo HPLC equipped with pumps and an integral degasser (Finnigan Surveyor LC Pump Plus), PDA spectrophotometric detector module (Finnigan Surveyor PDA Plus Detector), controller software (Chromquest) and autosampler (Finnigan Surveyor Autosampler Plus) equipped with a 10 μ L loop and 10 μ L injection. Chromatographic separation was accomplished using a Phenomenex[®] Synergi POLAR – RP 80A stainless-steel analytical column (250 X 4.6 mm, 4 μ m) and a Phenomenex[®] C18 guard cartridge system (4 μ m, 4.6 x 20 mm). The mobile phase used was a gradient system of 0.05% TFA-water (phase A) and 0.05% TFA-acetonitrile:methanol (75:25, v v⁻¹) (phase B), previously degassed using an ultrasonic bath. The gradient system was established and demonstrated in the Results and Discussion sections. Gradient separation was performed at a flow rate of 0.5 mL min⁻¹. Another HPLC analysis was carried out using a different column, a Waters X Bridge[™] C18 (100 x 4.6 mm, 5 μ m) and a Waters X Bridge[™] C18 guard cartridge system (5 μ m, 4.6 x 20 mm).

For the interlaboratory HPLC assay, a different apparatus was used, a Gilson HPLC system consisting of a Model 321 pump, a Model 156 variable-wavelength UV/Vis detector, a Rheodyne manual injection valve with a 10 μ L loop, Model 184 degasser, a Model 831 thermostatted column compartment, and Unipoint LC system software.

2.3 Preparation of the EPA extractive solution

Guaraná samples obtained in the municipality of Alta Floresta, state of Mato Grosso, Brazil, were used to prepare the acetone:water (70:30) extractive solution (ES), by turbo extraction (Ultra-Turrax UTC115KT, IKA Works, Wilmington, NC, USA). After the organic solvent was removed, the remaining solid material was lyophilized (EBPC; patent pending PI0006638-9). The EBPC (crude extract) was partitioned with ethyl acetate, resulting in an

ethyl-acetate fraction (EPA) [4,13]. The EPA was extracted with solid-phase extraction (SPE). A 2.00 mg portion of EPA was diluted in 1 mL of 20% methanol and was passed through the SPE cartridge and diluted in 25 mL of 20% methanol. A 10 μ L aliquot was analyzed by HPLC.

2.4 Method validation

For validation of the analytical method, the guidelines established by the ICH (International Conference on the Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use) and by Brazilian regulation RE 899/2003 of the National Health Surveillance Agency (ANVISA) were employed [24,25].

2.4.1 Linearity

Linearity was determined by the calibration curves obtained from the HPLC analyses of the standard solutions of catechin and epicatechin. The range (interval between the upper and lower concentrations of analyte in the sample) of the appropriate amount of samples was determined. The slope and other statistics of the calibration curves were calculated by linear regression and analysis of variance (ANOVA).

The catechin and epicatechin standards were dissolved in 20% methanol to give concentrations of 18.75, 37.5, 75.0, 150, and 300 μ g mL⁻¹. The solutions were filtered through an FHLP01300 20 μ m membrane filter (Millipore). Evaluation of each point was conducted in five replicates, and the calibration curve was fitted by linear regression.

2.4.2 Limit of detection and limit of quantification

The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were calculated based on the standard deviation (SD) and the slope (S) of the calibration curve based on equations (1) and (2).

$$LOD = (3.3 \times SD) / S \quad \text{Equation (1)}$$

$$LOQ = (10 \times SD) / S \quad \text{Equation (2)}$$

2.4.3 Precision

The precision of the method was determined following ICH guidelines. Precision was evaluated at three levels: repeatability, intermediate precision, and reproducibility. The standard deviation (SD) and relative standard deviation (RSD) of six injections at 100% of the test concentration were evaluated and analyzed intra-day and inter-day, and with different analysts and different apparatus.

2.4.4 Accuracy

The accuracy was determined by recovery analyses, adding measured amounts of catechin (100, 50, and 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$) and epicatechin (100, 50, and 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$) to EPA extractive solution samples. The recovery experiments were performed in triplicate. The recovery data were determined by dividing the value obtained for the sample prepared with the added standard, by the amount added, and then multiplying by 100% [24].

2.4.5 Robustness

The robustness was determined for variations in flow rates, for 0.495 mL min^{-1} and 0.505 mL min^{-1} . The Tukey test of ANOVA was performed to evaluate whether the flow variations altered the results of the HPLC analysis.

2.4.6 Stability

The stability of the EPA extractive solutions was determined over a period of four weeks. A 2.00 mg portion of EPA was diluted in 1 mL of 20% methanol. This solution was passed through the SPE cartridge and diluted in 25 mL of 20% methanol. The samples were stored at room temperature, exposed to light. A 10 μ L aliquot was analyzed by HPLC.

2.5 EPA extractive solution quantification

The catechin, epicatechin and caffeine calibration curves were utilized to quantify the EPA extractive solutions. The EPA extractive solutions were analyzed by HPLC in six replicates. The catechin, epicatechin, and caffeine peaks were quantified by linear regression of the standards.

3. Results and discussion

In this study, the same mobile phase, column, and other chromatographic conditions were employed throughout. The chromatograms were obtained from several different mobile phases and flows tested (Table 1), in order to establish the ideal conditions for the analysis of the EPA extractive solution. All analyses were performed at 210 and 280 nm. The standard peaks and the EPA multiple peaks were analyzed in the wavelength range of 200-400 nm. The spectra were observed, and the 280 nm wavelength was employed in all subsequent analyses. Different gradient systems and analysis times were tested. System G showed the best performance in the separation of EPA multiple peaks, with a possible shorter analysis time.

Trifluoroacetic acid (TFA) increased the definition of the peaks, compared with acetic and phosphoric acids. System C showed good separation and peak definition. Acetonitrile is

an expensive solvent, and we tested mixtures with acetonitrile and methanol. System G gave the best results in the HPLC analysis.

The mobile phases of system G were: Phase A, water plus 0.05% TFA; Phase B, methanol:acetonitrile (25:75) plus 0.05% TFA. The gradient system of the HPLC analysis was established as: 0 min, 80:20 (A:B); 20 min, 74:26 (A:B); 21 min, 80:20 (A:B); 24 min, 80:20 (A:B). The EPA chromatogram obtained at the 280 nm wavelength and 0.5 mL min^{-1} is shown in Fig. 1.

Insert Table 1

Insert Fig. 1

Evaluation of the EPA by HPLC-PDA was indispensable to define certain parameters. By this means, the UV spectra of the catechin and epicatechin peaks of the EPA fraction were obtained (data not shown). Comparison of these spectra indicated that these compounds showed two bands that were very similar to the profile found for the catechin and epicatechin standards.

The Waters X BridgeTM C18 column (100 x 4.6 mm, 5 μm) was tested in an attempt to decrease the time required and the volume of solvent used during the analysis. However, under conditions C, D, E, F, G, and H (Table 1) it was not possible to obtain separation of catechin and epicatechin, and therefore this column was not used for the subsequent analyses.

For the validation of an analytical method, the ICH guidelines recommend that tests for specificity, linearity, accuracy, precision, LOD, and LOQ of the method be performed [24].

The linearity of the HPLC method, catechin and epicatechin at five concentration levels was investigated. The results are presented in Table 2.

Insert Table 2

The calibration curves for catechin and epicatechin were linear in the range 18.75–300 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The representative linear equations for catechin and epicatechin were $y=141240+62438x$ ($n=5$; $r^2=0.9980$; $\text{RSD}=2.21\%$) and $y=-153220+69637x$ ($n=5$; $r^2=0.9918$; $\text{RSD}=4.53\%$), respectively. According to the Analytical Methods Committee (AMC), a value of regression coefficient close to unity is not necessarily the outcome of a linear relationship, and in consequence the test for the lack of fit should be applied. This test evaluates the variance of the residual values [26]. The ANOVA for catechin and epicatechin linearity is presented in Table 3. The F value for lack of fit was smaller than the tabulated F value for the 95% confidence level ($\alpha=0.05$), and therefore, according to the ANOVA test, the linear regression showed no lack of fit.

The epicatechin RSD% of the slope was 4.53%. This value is within the limit set by ICH and ANVISA, which is up to 5%. The negative b value was in the 95% confidence interval of the calibration curve by the ANOVA test. These results (RSD% and negative b value) indicate that the reproducibility of the method and compound purity are within acceptable limits. The intercept (b value) confidence interval of the calibration curve of epicatechin was -334848 to 28401.69. The value obtained in the experiments was within the confidence interval (b value was -153220). Similarly to epicatechin, the RSD% of the slope and the b values of the calibration curves of catechin and caffeine were within the limits established by the validation guidelines.

Insert Table 3

The values of LOD, taken as the lowest absolute concentration of analyte in a sample which can be detected but not necessarily quantified as an exact value under the stated experimental conditions, were $0.70 \mu\text{g mL}^{-1}$ for catechin and $0.88 \mu\text{g mL}^{-1}$ for epicatechin. The values of LOQ, taken as the lowest amount of analyte in a sample which can be quantitatively determined with suitable precision and accuracy under the stated experimental conditions, were $2.13 \mu\text{g mL}^{-1}$ for catechin and $2.67 \mu\text{g mL}^{-1}$ for epicatechin.

The repeatability and intermediate precision were determined by evaluation of the precision and the SD and RSD of six determinations at 100% of the test concentration. Repeatability expresses the precision under the same operating conditions over a short interval of time. Intermediate precision, expressed as inter-laboratory variations with different analysts and different apparatus, was evaluated. The results are shown in Table 4. The data were evaluated by one-way ANOVA. Statistical comparison of the results was performed using the *P*-value of the *F*-test. Since the *P*-value of the *F*-test was always greater than 0.05, there was no statistically significant difference between the mean results obtained from one time of day to another at the 95% confidence level. This procedure was performed to detect any other problems that would be encountered in a reproducibility study. The variations in ambient factors that are expected to occur in practice were simulated, and the results confirmed the precision and reproducibility of the method [27].

Insert Table 4

The accuracy of the HPLC method for the analysis of recovery assay was determined by the preparation of a simulated sample containing a known quantity of catechin and

epicatechin. The recovery of an added standard solution at three levels of concentration (100, 50, and 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$) was performed ($91.3\pm 3.8\%$, 2.14 RSD and 93.4 ± 3.1 , 2.74 RSD of catechin and epicatechin, respectively). The results refer to the mean of three assays, and they were in good agreement with the results required for complex matrices (80–120%) [24].

The robustness should be evaluated during the development of the HPLC method, and it should demonstrate the reliability of analysis with respect to deliberate variations in the parameters of the methods [24]. The Tukey test evaluates whether a difference exists among the different levels of a factor. At the 5% level, there were no significant differences in the area of the curve and the retention time of catechin and epicatechin when the flow of the mobile phase was varied, from 0.500 mL min^{-1} to 0.495 and 0.505 mL min^{-1} . Therefore, the method proved to be robust for the substances analyzed, under the conditions evaluated.

To demonstrate the stability of the working solutions during the analysis, the EPA extractive solutions were analyzed over a period of four weeks while they were stored at room temperature (22 ± 3 °C) with exposure to natural light. The results are shown in Fig. 2. The retention times and peak areas of the drugs remained almost unchanged, and no significant degradation was observed during the course of one week, suggesting that these solutions remained stable for a sufficient time to complete the analytical process.

Insert Fig. 2

For quantification of the EPA extractive solution, the calibration curves of catechin, epicatechin, and caffeine were analyzed. The calibration curves of catechin and epicatechin are shown in Table 2.

The calibration curve of caffeine was linear in the range 3.125–100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The representative linear equation for caffeine was $y=165590+239600x$ ($n=5$; $r^2=0.9930$;

RSD=4.37%) (Table 2). The ANOVA for caffeine linearity is given in Table 3. These results showed that the curve was linear and there was no lack of fit in the linear regression (Table 3).

The quantification of the EPA extractive solution demonstrated that it contained 14.46 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of catechin (180.75 $\mu\text{g catechin mg}^{-1}$ of EPA), 22.31 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of epicatechin (278.87 $\mu\text{g epicatechin mg}^{-1}$ of EPA), and 24.07 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of caffeine (300.87 $\mu\text{g caffeine mg}^{-1}$ of EPA).

4. Conclusion

A reversed-phase HPLC-PDA method was developed to determine the amount of catechin and epicatechin in the *Paullinia cupana* EPA semipurified extract. Because of the complexity of the extract and in order to eliminate column-blocking compounds, a cleaning step with solid-phase extraction was included in the sample preparation protocol.

The method was validated according to the ICH guidelines and Brazilian regulations. In this study, the HPLC-PDA method proved to be simple, sensitive, accurate, linear, precise, reproducible, repeatable, specific, and with robust stability. These results indicate that this method is suitable for the determination of catechin and epicatechin in *Paullinia cupana* semipurified extracts.

Acknowledgements

The authors thank the Brazilian agencies CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), CNPq, COMCAP/FINEP, and INCT for their financial support.

CAPES and Fundação Araucária granted fellowships to T. Klein and R. Longhini. Thanks are due to Dr. Janet W. Reid, JWR Associates, Trumansburg, NY, for English revision.

References

- [1] A.R. Henman, *J. Ethnopharmacol.* 6 (1982) 311-338.
- [2] T.M.A. Ushirobira, E. Yamaguti, L.M. Uemura, C.V. Nakamura, B.P. Dias Filho, J.C.P. Mello, *Lat. Am. J. Pharm.* 26 (2007) 5-9.
- [3] E. Yamaguti-Sasaki, L.A. Ito, V.C.D. Canteli, T.M.A. Ushirobira, T. Ueda-Nakamura, B.P. Dias Filho, C.V. Nakamura, J.C.P. Mello, *Molecules* 12 (2007) 1950-1963.
- [4] E.A. Audi, J.C.P. Mello, Fundação Universidade Estadual de Maringá, BR Patent no. PI00066389, Cl. Int. A61P 25/24; A61K 35/78 (2000).
- [5] F.J. Otobone, A.C.C. Sanches, R.L. Nagae, J.V.C. Martins, S. Obici, J.C.P. Mello, E.A. Audi, *Braz. Arch. Biol. Technol.* 48 (2005) 723-728.
- [6] F.J. Otobone, A.C.C. Sanches, R.L. Nagae, J.V.C. Martins, V.R. Sela, J.C.P. Mello, E.A. Audi, *Phytother. Res.* 21 (2007) 531-535.
- [7] C.M. Roncon, C.B. de Almeida, T. Klein, J.C.P. Mello, E.A. Audi, *Planta Med.* 77 (2011) 236-241.
- [8] E.A. Audi, C.M. Roncon, C.B. Almeida, J.C.P. Mello, *J. Eur. Coll. Neuropsychopharmacol.* 20 (2010) S274.
- [9] E.B. Espinola, R.F. Dias, R. Mattei, E. Carlini, *J. Ethnopharmacol.* 55 (1997) 223-229.
- [10] R. Mattei, R.F. Dias, E.B. Espinola, E.A. Carlini, S.B.M. Barros, *J. Ethnopharmacol.* 60 (1998) 111-116.
- [11] H. Fukumasu, T.C. Silva, J.L. Avanzo, C.E. Lima, I.I. Mackowiak, A. Atroch, H.S. Spinosa, F.S. Moreno, M.L.Z. Dagli, *Cancer Lett.* 233 (2006) 158-164.

- [12] G.A.R. Johnston, P.M. Beart, *Brit. J. Pharmacol.* 142 (2004) 809-810.
- [13] T.M. Antonelli-Ushirobira, E.N. Kaneshima, M. Gabriel, E.A. Audi, L.C. Marques, J.C.P. Mello, *Food Chem. Toxicol.* 48 (2010) 1817–1820.
- [14] L.L. Sombra, M.R. Gómez, R. Olsina, L.D. Martínez, M.F. Silva, *J. Pharmacol. Biomed. Anal.* 36 (2005) 989–994.
- [15] M. Kofink, M. Papagiannopoulos, R. Galensa, *Eur. Food Res. Technol.* 225 (2007) 569–577.
- [16] Y. Shen, C. Han, Y. Jiang, X. Zhou, Z. Zhu, X. Lei, *Talanta* 84 (2011) 1026-1031.
- [17] L. Dhooghe, K. Mesia, E. Kohtala, L. Tona, L. Pieters, A.J. Vlietinck, S. Apers, *Talanta* 76 (2008) 462–468.
- [18] F. Marx, J.G. Maia, *Quím. Nova* 13 (1990) 285-286.
- [19] M.L. Athayde, G.C. Coelho, E.P. Schenkel, *Phytochemistry* 55 (2000) 853–857.
- [20] S.A.V. Tfouni, M.C.R. Camargo, S.H.P. Vitorino, T.F. Menegário, M.C.F. Toledo, *Rev. Nutr.* 20 (2007) 63–68.
- [21] S.T. Saito, A. Welzel, E.S. Suyenaga, F. Bueno, *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 26 (2006) 394-400.
- [22] M.J. Simirgiotis, G. Schmeda-Hirschmann, *J. Food Compos. Anal.* 23 (2010) 545–553.
- [23] A. Romani, M. Campo, P. Pinelli, *Food Chem.* 130 (2012) 214–221.
- [24] International Conference on Harmonisation, ICH Topic Q2 (R1) Validation of analytical procedures: text and methodology. Available from: <http://www.ich.org>. 2005.
- [25] Brazil, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, RE 899/2003-ANVISA, 29 May 2003.
- [26] G. Hadad, S. Emara, W.M.M. Mahmoud, *Talanta* 79 (2009) 1360–1367.
- [27] J.A. van Leeuwen, L.M.C. Buydens, B.G.M. Vandeginste, G. Kateman, P.J. Schoenmakers, M. Mulholland, *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 10 (1991) 337-34.

Table 1. Mobile phases and flows tested in separation of EPA extractive solutions

System	Phase A	Phase B	Flow (mL min ⁻¹)
A	Water + 5% acetic acid	Methanol + 5% acetic acid	0.8
B	Water + 0.5% phosphoric acid	Methanol + 0.5% phosphoric acid	0.8
C	Water + 0.05% TFA	Acetonitrile + 0.05% TFA	0.5 and 0.8
D	Water + 0.05% TFA	Methanol/acetonitrile (50/50) + 0.05% TFA	0.5
E	Water + 0.05% TFA	Methanol/acetonitrile (40/60) + 0.05% TFA	0.5
F	Water + 0.05% TFA	Methanol/acetonitrile (30/70) + 0.05% TFA	0.5
G	Water + 0.05% TFA	Methanol/acetonitrile (25/75) + 0.05% TFA	0.5
H	Water + 0.05% TFA	Methanol/acetonitrile (75/25) + 0.05% TFA	0.5

TFA = trifluoroacetic acid

Table 2. Curve parameter summary and back-calculation calibration curve concentrations for catechin, epicatechin, and caffeine

	Catechin	Epicatechin	Caffeine
Linear range ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	300 – 18.75	300 – 18.75	50 - 3.125
Detection limit ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0.70	0.88	0.13
Quantification limit ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	2.13	2.67	0.39
Regression data*			
<i>N</i>	5	5	5
Slope (<i>a</i>)	62438	69637	239600
Standard deviation of slope	1385.35	3152.6	9388.28
Relative standard deviation of slope (%)	2.21	4.53	4.37
Intercept (<i>b</i>)	141240	-153220	165590
Correlation coefficient (r^2)	0.9980	0.9918	0.9930

* $y = ax + b$, where x is the concentration of the compound and y is the peak area.

Table 3. ANOVA results for linearity of catechin, epicatechin, and caffeine. (SS: sums of squares; df: degrees of freedom; MS: mean squares; F: F value of the test; Ftab: fixed F value)

Catechin					
	SS	df	MS	F	Ftab
Model	3.9404×10^{14}	1	3.9404×10^{14}	19098.60	4.098
Residual	7.8401×10^{11}	38	2.0631×10^{10}	Linear	
Lack of fit	1.1604×10^{11}	2	5.8021×10^{10}	3.127043	3.259
Pure error	6.6796×10^{11}	36	1.8554×10^{10}	No lack of fit	
Epicatechin					
Model	4.2450×10^{14}	1	4.2450×10^{14}	4091.133	4.130
Residual	3.5278×10^{12}	34	1.0376×10^{11}	Linear	
Lack of fit	1.3037×10^{11}	2	6.5186×10^{10}	0.613969	3.295
Pure error	3.3975×10^{12}	32	1.0617×10^{11}	No lack of fit	
Caffeine					
Model	8.3685×10^{14}	1	8.3685×10^{14}	6976.483	4.038
Residual	5.8777×10^{12}	49	1.1995×10^{11}	Linear	
Lack of fit	4.1577×10^{11}	3	1.3859×10^{11}	1.167205	2.807
Pure error	5.4619×10^{12}	46	1.1873×10^{11}	No lack of fit	

Table 4. Repeatability and intermediate precision of EPA extract solution

	RSD%			
	Intra-day	Inter-day	Different analyst	Different apparatus
Catechin	0.72	0.93	0.19	1.52
Epicatechin	0.66	0.75	0.66	1.95

RSD% = relative standard deviation

Fig. 1 Chromatogram of EPA extractive solution. Procyanidin B1 (12.24 min), catechin (15.32 min), procyanidin B2 (17.08 min), epicatechin (17.72 min), and caffeine (19.90 min).

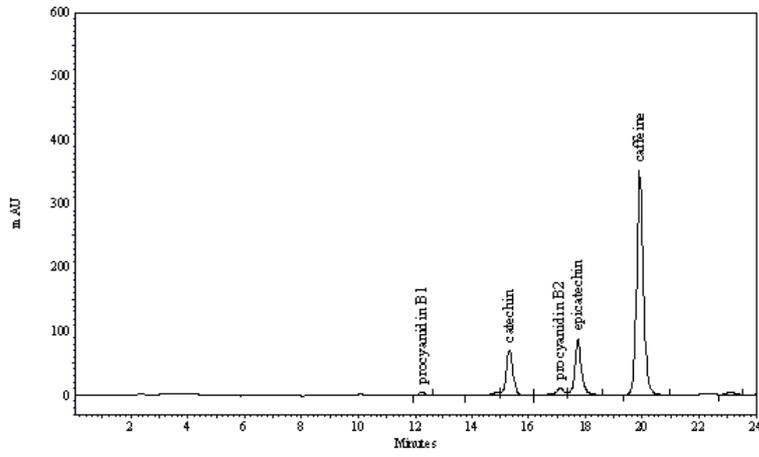
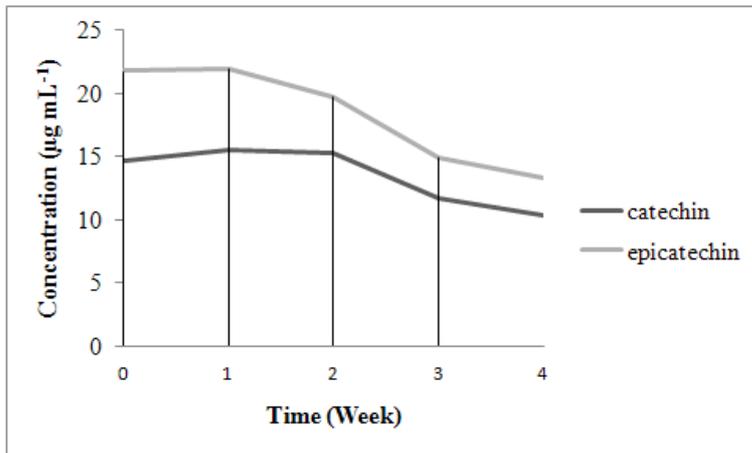


Fig. 2 Four-week evaluation of the stability of the EPA extractive solution.



Capítulo IV

Production of microparticles by spray drying from *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Guaraná) semipurified extract: development and characterization

O capítulo IV apresenta o desenvolvimento e caracterização de micropartículas contendo extrato semipurificado de guaraná (EPA). As micropartículas foram obtidas por secagem por atomização e caracterizadas por diferentes técnicas.

Production of microparticles by spray drying from *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Guaraná) semipurified extract: development and characterization

Traudi Klein, Renata Longhini, Marcos Luciano Bruschi, João Carlos Palazzo de Mello

Departamento de Farmácia, Universidade Estadual de Maringá, Avenida Colombo, 5790, BR-87020-900, Maringá, PR, Brazil

Abstract

Guaraná is well-known for its dietary and pharmaceutical potential and the semipurified extract of Guaraná (EPA) show antidepressant and panicolytic effects. However, their low solubility, bioavailability and stability limit their use as components for pharmaceutical agents. For drug delivery, EPA in a micro/nanoparticle form is desirable for their optimized stability. In this study, EPA microparticles produced by spray drying process using a combination of maltodextrin (MD) and arabic gum (AG) as coating polymer. Raw materials and microparticles produced were all characterized by particle size analysis, differential scanning calorimetry (DSC), thermogravimetric analysis (TGA), and imaged by scanning electron microscopy. The drug content (HPLC) and antioxidant activity (*DPPH* test) were also evaluated. *In vitro* dissolution tests, using a flow cell dissolution equipment, were carried out to investigate the influence of formulative parameters on EPA release from the microparticles. The spray drying technique and the process conditions selected have given satisfying encapsulation efficiency and product yield. The microencapsulation have improved the technological characteristics of the powders and have preserved the antioxidant properties. This spray drying technique can be used as an efficient and economic approach to produce EPA microparticles.

1. Introduction

The guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke, Sapindaceae) is a Brazilian plant and its seeds are used in popular medicine as a stimulant of the central nervous system, in cases of physical and mental stress, and as an antidiarrheic, diuretic, and antineuralgic (Henman, 1982; Yamaguti-Sasaki et al., 2007). Contain high amounts of methylxanthines including caffeine, theophyllin and theobromin, besides saponins, and polyphenols, especially, tannins (Henman, 1982; Ushirobira et al., 2007). . The antidepressant effect has been evaluated with promising effects and with a beneficial effect on cognition, without altering locomotor activity and showing panicolytic effect (Audi and Mello, 2000; Otobone et al., 2005; Otobone et al. 2007; Audi et al., 2010; Roncon et al., 2011). Low toxicity (Espinola et al., 1997; Mattei et al., 1998; Otobone et al., 2005; Otobone et al., 2007), action as a chemoprophylactic in carcinogenesis (Espinola et al., 1997), and important activity against *Streptococcus mutans*, (Yamaguti-Sasaki et al., 2007) have also demonstrated.

Chemical assay of a semipurified extract of guaraná (EPA) showed the presence of caffeine, epicatechin, catechin, *ent*-epicatechin and procyanidins B1, B2, B3, B4, A2, and C1 (Ushirobira et al., 2007; Yamaguti-Sasaki et al., 2007). EPA showed an antidepressant effect on animals and the condensed tannins previously isolated from this species, may be the responsible agents; condensed tannins can cross the blood-brain barrier and act on the central nervous system (Johnston and Beart, 2004; Otobone et al., 2005; Fukumasu et al., 2006; Otobone et al., 2007; Ushirobira et al., 2007;). The EPA caused no toxicity in rats at the smallest dose evaluated (30 mg kg⁻¹) (Antonelli-Ushirobira et al., 2010). The high potential for using guaraná in a wide range of medicinal applications justifies the interest in the development of a pharmaceutical form.

Polyphenols are easy degradable because of their sensibility to environmental factors such as light, heat and oxygen. The microencapsulation, depending on the polymers and

technology used, may stabilize these labile compounds and extend their shelf-life. From an industrial perspective, microencapsulated powders would be easy to handle and to use in food and pharmaceutical processing keeping their initial flavonoid content, bioactivity, and safety in case of prolonged storage. In microsystems, stabilization occurs because the wall/coating material acts as a physical and permeable barrier to oxygen and small molecules, for this reason the shelf-life of the encapsulated drugs is consequently prolonged (Manach et al., 2005; Sansone et al., 2011). Among the preparation methods of microparticles, spray-drying is widely used in pharmaceutical and biochemical fields and in food industry due to large availability of equipments and easiness of industrialization. It is also a mild “one-step” processing operation to move from a liquid feed into a powder product. Since the fast solvent evaporation keeps droplets temperature far below the drying air temperature, spray-drying is strongly recommended for heat sensitive materials such as polyphenols (Sansone et al., 2011).

Since the EPA semipurified extract have some labile chemical compounds, the microparticles can increase the stability of EPA. The influence of formulative parameters on yield of the process and microparticle properties such as morphology, size, thermal behavior and, dissolution/release rate was investigated. Last one was evaluated either in term of EPA content and antioxidant activity.

The aim of the present study was develop EPA microparticles by spray-drying and study the influence of various MD:AG (maltodextrin: arabic gum)ratios and various solids percentage in a dispersion on their properties.

2. Materials and methods

2.1 Materials

Arabic gum (Synth), maltodextrin (Aldrich), methanol (J.T. Baker), acetonitrile (J.T. Baker), trifluoroacetic acid (TFA) (J. T. Baker), ultrapure water obtained from Milli-Q

(Millipore) apparatus were used. Arabic gum and maltodextrin were tested previously for pharmacopoeial assay.

2.2 Preparation of the EPA semipurified extract

Guaraná seeds samples obtained in the municipality of Alta Floresta, state of Mato Grosso, Brazil, were used to prepare the acetone:water (70:30) 10% extractive solution (ES), by turbo extraction (Ultra-turrax UTC115KT, Ika Works, Wilmington, NC, USA). After the organic solvent was removed, the remaining solid material was lyophilized (EBPC; patent pending PI0006638-9). The EBPC (crude extract) was partitioned with ethyl acetate, resulting in an ethyl-acetate fraction (EPA) (Audi and Mello, 2000; Antonelli-Ushirobira et al., 2010).

2.3 Preparation of EPA microparticles

EPA microparticles were prepared by spray-drying technique. The dispersions of EPA/AG/MD in some proportions were spray-dried using a laboratory spray-dryer (Mini Spray Dryer BÜCHI B-191, Switzerland). The inlet temperature was 190 °C, aspiration of 80%, pressure established of 2 Bar, and pump% of 6%. The outlet temperature was 120 to 130 °C.

2.4 Design of the microencapsulation experiments to optimize the conditions

It was select a mixture of arabic gum (AG) and maltodextrin (MD) as the microencapsulation wall material and designed a series of experiments to optimize the process conditions (Zhang et al., 2007). The main factors selected were (1) the content of AG in the mixed wall material (X1), (2) the content of total solids in the dispersion before spray-drying (X2). Details of the experiments are described in Table 1.

Table 1. Factors and levels of microencapsulation experiment to optimize the conditions.

Level	Factor	
	X1 (%)	X2 (%)
1	30	10
2	40	20
3	50	30

2.5 Microparticles processing technology

Considering the total amount of solids in the dispersion before spray drying was tested first 10% of EPA on different proportions of X1 and X2. With these results, after characterizations, it was choose the two better results and increased 20% the percentage of EPA in total amount of solids in dispersion before spray drying.

The total amount of liquid used to prepare the dispersions, 10% of them is alcohol to solubilize the EPA. The rest is water to disperse the proportions of AG/MD.

The EPA solution and the AG/MD dispersions were stirred separately for 20 min. Then the EPA solution was added to the AG/MD dispersion and stirred for about five minutes and spray dried.

2.6 Yield of microparticle powder

The total powder obtained after spray dryer technique was weighed and the percentage over the initial amount of solids in the dispersion is the yield of microparticle powder.

2.7 Moisture content of spray dried powders

To estimate the moisture content of spray-dried EPA microparticles, an aliquot of powders were dried at 105 °C for 30 min in infrared balance to remove the residual moisture content.

2.8 Particle size analysis and morphology

Scanning electron microscopy (SEM) (SHIMADZU SS-550) was used to visualize spray-dried particles morphology and to determine particle size. The particles obtained from the spray drier were fixed and the SEM images were recorded. The samples were fixed in a double-sided tape on a metallic support on equipment and coated with gold. Accelerating voltage was 15 kV and the samples were observed in 2000X increase.

2.9 Analysis of encapsulation efficiency

The total amount of EPA from microparticles was assessed by HPLC. The EPA was extract from microparticles with a portion of water e dissolved in methanol to a 20% of methanol final solution. The samples in 20% of methanol were extract with solid phase extraction prior to analysis due the presence of solid residue. The EPA was measured according to catechin and epicatechin content, using a HPLC method proposed from Klein et al. (2012). The HPLC system consist a Thermo HPLC equipped with pumps and an integral degasser (Finnigan Surveyor LC Pump Plus), PDA spectrophotometric detector module (Finnigan Surveyor PDA Plus Detector), controller software (Chromquest), and autosampler (Finnigan Surveyor Autosampler Plus) equipped with a 10 μ L loop, and 10 μ L injection. Chromatographic separation was accomplished using a Phenomenex® Synergi POLAR – RP 80A stainless-steel analytical column (250 X 4.6 mm, 4 μ m) and a Phenomenex® C18 guard cartridge system (4.6 x 20 mm, 4 μ m). The mobile phase used was a gradient system of 0.05% TFA-water (phase A) and 0.05% TFA-acetonitrile:methanol (75:25, v/v) (phase B), previously degassed using an ultrasonic bath. Gradient separation was performed at a flow rate of 0.5 mL min⁻¹, and the detection was performed at 280 nm.

2.10 Thermal analysis

EPA, AG, MD and the microparticles formulations were analyzed by differential scanning calorimetry (DSC) and thermogravimetric analysis (TGA) on a calibrated Netzsch STA 409 PG/4/G Luxx equipment. Thermograms were recorded by placing accurately given quantities of each sample in a platinum pot in analysis atmosphere with constant flow of nitrogen (N₂) at 50 mL min⁻¹. The samples were heated from ambient temperature to 500 °C at a heat rate of 10 °C min⁻¹.

2.11 DPPH radical scavenging activity

The DPPH radical scavenging activity was determined according Chassot et al., 2011. Tests were carried out in triplicate. Trolox® were used as positive control or standard. Data are presented as IC₅₀ (µg/ml)

2.12 *In vitro* dissolution tests

In vitro dissolution assay of EPA from the microparticles were carried out on a SOTAX® AT 7 Smart Apparatus, and the detection by HPLC of catechin and epicatechin was employed (Klein et al., 2012). All the dissolution tests were made in triplicate, only the main values were reported (standard deviation < 5%). The medium was water at 37 °C, flow at 8 mL/min and samples were collected at 5, 10, 15, 30, 45 and 60 min. The 22,6 mm cell was used and the microparticles were placed between layers of glass spheres. The sink conditions were determined and observed.

3 Results and discussion

3.1 Microparticle powder characterization

The microparticles formulations, details and results of the microparticles powder characterizations are described in Table 2.

Table 2. Details and results of microparticles powders characterizations experiments.

Sample	% AG	% Solids	Yield %	Moisture %	% Encapsulation	
					Catechin	Epicatechin
1	30	10	62.39	5.60	99.17	97.94
2	40	10	57.62	7.44	85.06	89.02
3	50	10	58.59	5.27	87.14	91.30
4	30	20	45.88	6.10	92.94	89.60
5	40	20	57.50	6.24	81.53	90.72
6	50	20	55.70	6.00	97.92	108.34
7	30	30	37.19	5.66	88.31	91.40
8	40	30	36.66	5.26	81.67	90.63
9	50	30	34.70	6.10	81.53	82.07
10	100	10	42.12	6.03	87.07	89.20
11	0	10	51.90	6.03	84.02	86.77
12*	30	10	60.00	5.95	95.60	84.80
13*	50	10	55.54	5.73	96.33	84.15

*EPA percentage increased to 20% in total solids.

For statistical analysis, applying the analysis of variance (ANOVA) we found $p < 5\%$ for the variable yield. Therefore, there is at least one sample that shows a yield different from the others, to determine which one (s) is (are) different (s) applied the test for multiple comparisons. Samples with 10 and 20% solids are equivalent with respect to the yield of the samples, showing higher values than the samples with 30% solids.

For the variable catechin encapsulation content, with $p > 5\%$, there is no sample that shows catechin encapsulation a content different from the others. No significant difference in content encapsulation catechin of the samples, considering the % GA in each sample. No significant difference in catechin encapsulation content of the samples, considering the percentage of solids in each sample.

For the variable epicatechin encapsulation content the results were $p > 5\%$, so the conditions to epicatechin are the same as catechin.

Thus, we chose 10% as a solid percentage in the dispersion reference in the production of microparticles and the formulations with 30% solids were discarded from subsequent

characterizations. The solid percentage of 20% was initially an option on the production of microparticles, but even the yield of the microparticles to be equivalent to the microparticles produced with 10% solids, in practice the dispersion is very viscous and difficult to spray dry.

The percentage of 10% solid was choice, we chose to test the extreme concentration of AG% to better characterize such formulations (30 and 50 %AG). Observing that the concentration of EPA in the initial formulation was only 10%, it was decided to increase this concentration to 20% (samples 12 and 13) only in the formulations that we obtained better results (samples 1 and 3).

3.2 Particle size analysis and morphology

The SEM micrographs were utilized to particle size determinations with the size determination of 800 microparticles (software Image Pro Plus). The results are in Table 3.

The particle size of microparticles was very similar to all formulations. Only samples 6 and 9 demonstrates larger particle size probably due to the higher content of AG combined with higher percentage of solids in the initial dispersion. These results, with mean diameter around 4.5 μm , indicates the arrangements of both polymers and EPA in micrometric particles in which the drug is homogeneously distributed (Sansone et al., 2011).

To morphology microparticles analysis the SEM micrographs are also used. Figure 1 shows the morphology of samples 1, 3, 12, and 13. These formulations were chosen because demonstrated better results in characterizations tests and were used to dissolution tests.

All samples analyzed displayed the complete absence of crystals and aggregates. These results confirm the interaction and solubilisation of EPA in AG:MD microparticles (Sansone et al. 2011). The photomicrographs of samples 12 and 13 showed small and well formed microparticles, spherical in shape and samples 1 and 3 the photomicrographs revealed a more irregular shape and the presence of partially collapsed particles. These studies may

revealed that EPA quantity had a significant influence on the microparticles, which alters the morphology so Weerakody et al. (2008) observed with chitosan microspheres for encapsulation of α -lipoic acid.

Table 3. Particle size of microparticles formulations.

Sample	Particle size (μm) \pm SD	Size interval (μm)
1	4.22 \pm 1.79	1.31 – 12.46
2	4.72 \pm 1.98	1.64 – 14.45
3	4.92 \pm 2.15	1.39 – 17.39
4	4.81 \pm 2.53	1.05 – 18.20
5	4.97 \pm 2.10	1.14 – 15.75
6	6.71 \pm 3.41	1.03 – 20.48
7	4.74 \pm 2.27	1.05 – 15.75
8	4.48 \pm 2.16	1.35 – 16.48
9	7.51 \pm 4.03	1.01 – 30.46
10	5.64 \pm 2.37	1.85 – 15.50
11	5.78 \pm 2.17	1.24 – 14.98
12	4.34 \pm 1.97	1.36 – 13.67
13	4.67 \pm 1.85	1.43 – 13.32

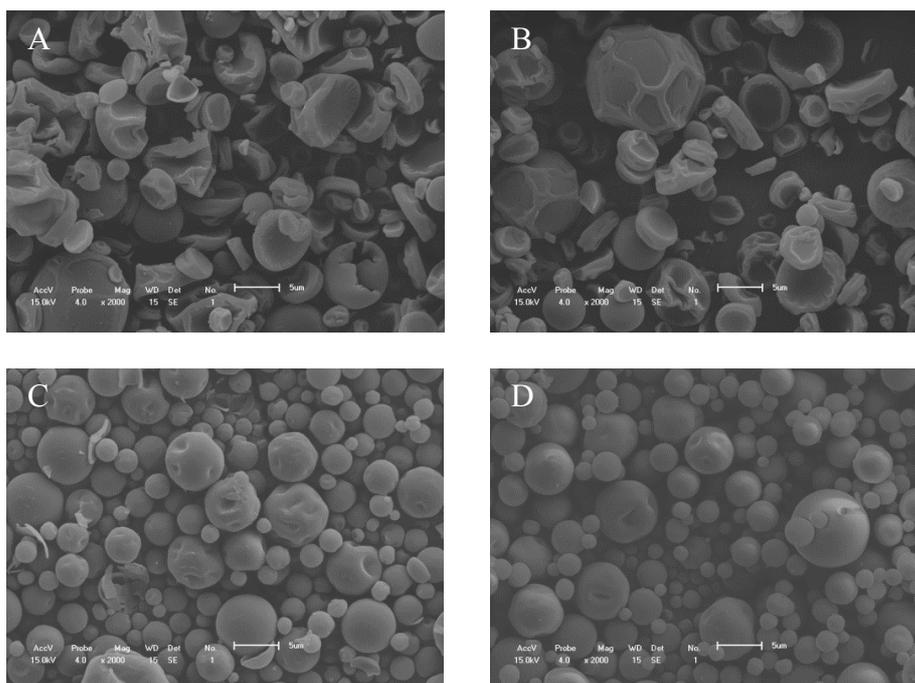


Figure 1. SEM photomicrographs of the microparticles (2000X) A: sample 1; B: sample 3; C: sample 12 and D: sample 13.

3.3 Thermal analysis

The structural interactions of the EPA with the polymers were studied by differential scanning calorimetry (DSC) and thermogravimetric analysis (TGA) (Weerakody et al., 2008).

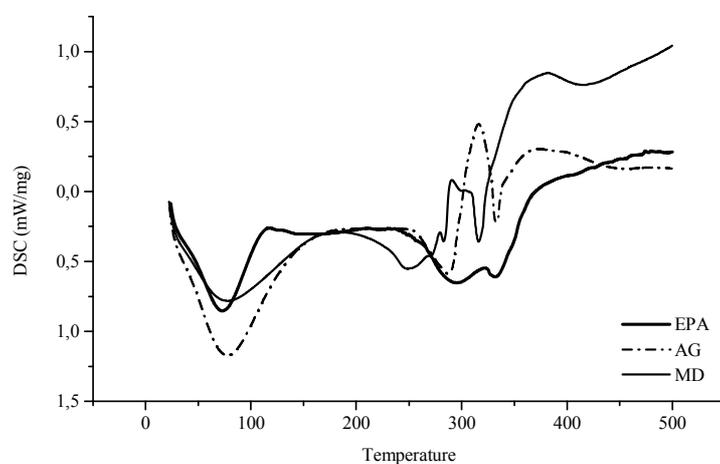


Figure 2. DSC curves for microparticles for samples EPA, AG and MD.

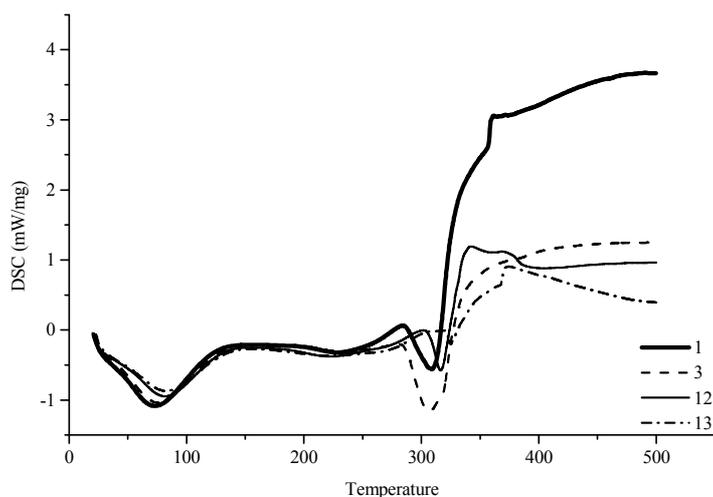


Figure 3. DSC curves for EPA microparticles for samples 1, 3, 12 and 13.

Overall, it is possible to verify two thermal events for both EPA and to GA, MD, and microparticles in the DSC curves (Figures 2 and 3). The first endothermic event is between room temperature and 150 °C, depending on the sample, and corresponds to loss of adsorption water. The difference of some °C up or down can be related to the binding mode of water in different samples, characteristic of each substance, requiring more or less energy to release it. As observed by Borghetti et al. (2006) for samples of quercetin from different suppliers had different temperatures of loss water caused by differences in morphology and particle size. The second endothermic event observed for all samples corresponds to the melting point, with possible degradation of these compounds, due to high temperatures involved in this process (over 240 °C).

These results can be confirmed by the TGA curve analysis, where you can observe at these temperatures a mass loss, probably related to degradation of these substances (Table 4 and Figure 4).

Based on the results of DSC curves is possible verify an interaction between EPA and AG: MD in the microparticles, because in the second endothermic event there is a mixture of profiles of single substances.

Analyzing the data of TGA (Figure 4 and Table 4), we observe two characteristic mass loss, both to EPA as to GA, MD, and microparticle. The first mass loss corresponds to adsorption water that begins almost at room temperature and goes up to 120 °C. These mass losses are around 5 to 12% loss of total mass. The second loss corresponds to melting with degradation discussed above, and progresses to a structural collapse.

The results of TGA curves is possible to realize that the profile curves of the microparticles is similar to the adjuvants used in drying, including the mass losses. This is probably due to the higher proportion of adjuvants compared to EPA, which is present in a proportion of 10 and 20%.

Table 4. Thermogravimetric analysis characteristics of microparticles.

Sample	Decompositon stage	
	First	Second
EPA		
Temperature interval (°C)	33-159	192-500
Mass losses (%)	6.53	49.27
AG		
Temperature interval (°C)	23-180	216-500
Mass losses (%)	13.11	62.48
MD		
Temperature interval (°C)	22-189	219-500
Mass losses (%)	8.80	69.53
1		
Temperature interval (°C)	21-118	199-500
Mass losses (%)	9.30	74.48
3		
Temperature interval (°C)	22-138	211-500
Mass losses (%)	9.37	68.51
12		
Temperature interval (°C)	20-131	192-500
Mass losses (%)	7.74	65.45
13		
Temperature interval (°C)	21-127	178-500
Mass losses (%)	7.02	65.40

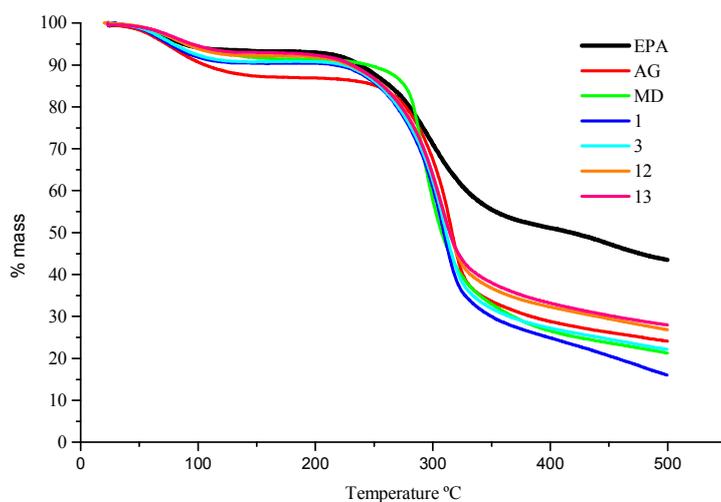


Figure 4. TGA curves for EPA, AG, MD, samples 1, 3, 12 and 13.

3.4 DPPH radical scavenging activity

The IC_{50} express the amount of EPA microparticles necessary to scavenge 50% of free radical in the medium and shows the antioxidant activity. The Figure 5 show the results of antioxidant activity of semipurified extract EPA, the positive control, Trolox, and the formulations 1, 3, 12, and 13.

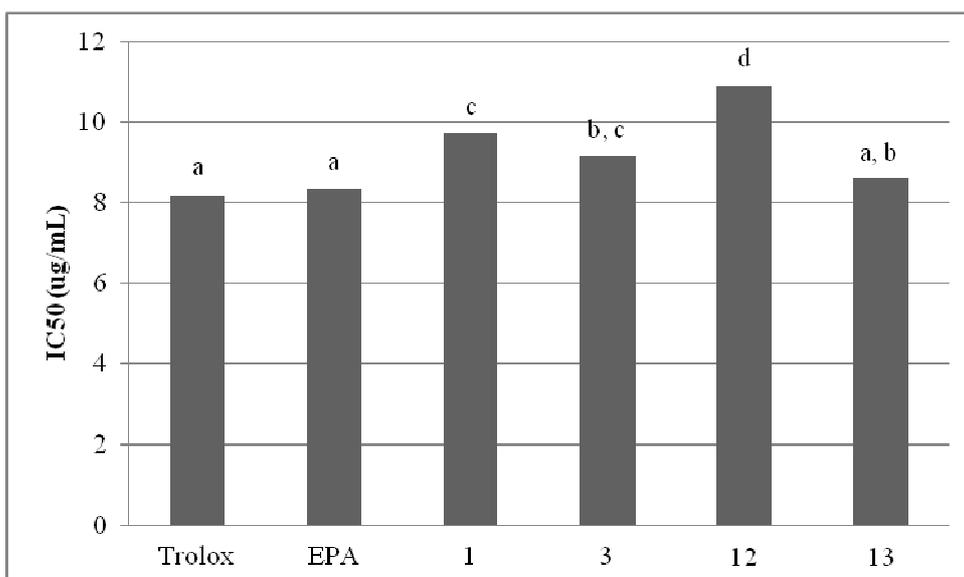


Figure 5. Antioxidant activity of semipurified extract EPA, the positive control, Trolox, and the formulations 1, 3, 12, and 13 (a, b, c, and d: same letters are the same statistically values).

Is expected that EPA lost some antioxidant activity after spray dryer process (Fu et al., 2011). It was observed that in Fig. 5. Samples 1, 3, and 12 demonstrated smaller antioxidant activities as Trolox (positive control) and EPA. Only sample 13 demonstrated antioxidant activity like a control and EPA. Then, it may suggest that microparticles can protect the EPA from temperature of the process and sample 13 demonstrated the better result.

This study demonstrated significant retention of antioxidant activity of EPA after the microparticle production.

3.5 *In vitro* dissolution tests

At first, to evaluate the dissolution/release profile of EPA from microparticles, their solubility in medium has been assessed. The solubility values of EPA resulted 0.92 mg mL^{-1} . Then, the sink conditions, which describe a dissolution system sufficiently dilute so that the dissolution process is not impeded by saturation of the solution were evaluate. The dissolution profiles of EPA from the microparticles are reported in Fig. 3.

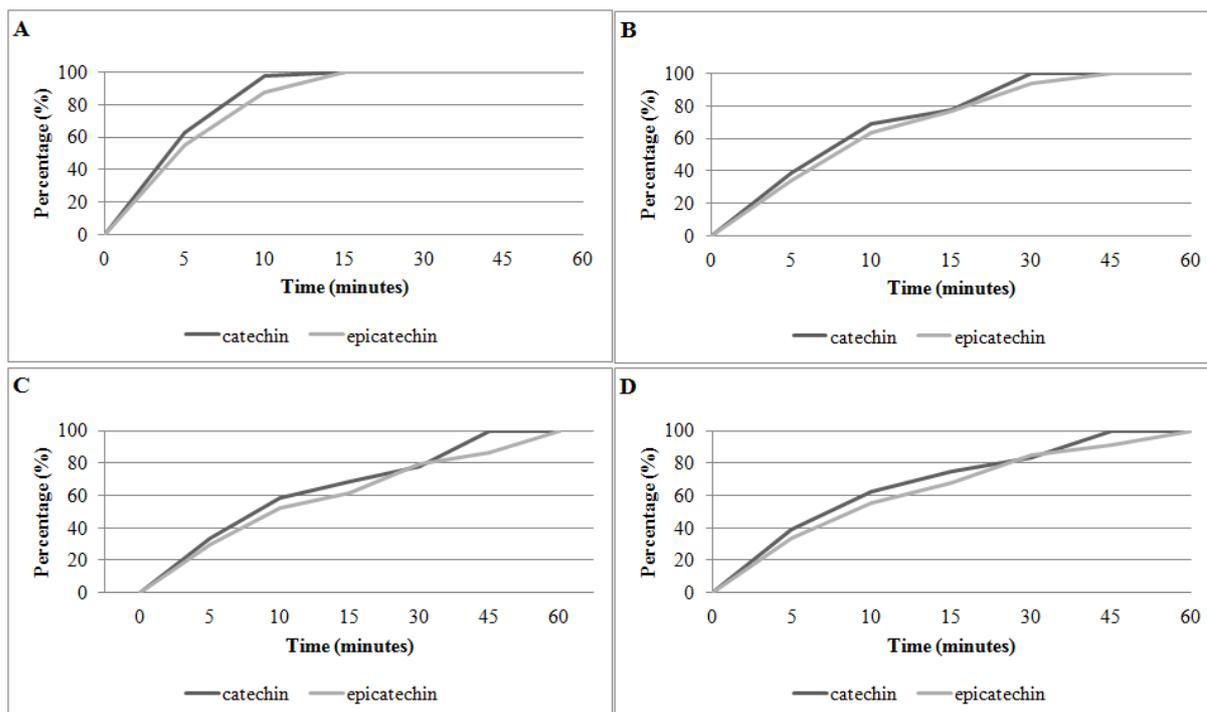


Figure 6. Dissolution profile of samples 1 (A), 3 (B), 12 (C) and 13 (D).

All formulations evaluate in dissolution test start the release at the beginning of the test and have complete dissolution within 60 min. Among the compounds tested only sample 1 has a different profile, releasing all the content in the first 15 min. All formulations release the total content of EPA suggesting that no interactions occur between the polymers and EPA able to retain the active compounds in the polymeric mixture.

4 Conclusions

This study investigated the use of spray drying technique to produce microparticles of semipurified extract of guaraná (EPA). We had successfully generated EPA microparticles with antioxidant properties in micrometer size. This study also demonstrated the feasibility to produce EPA microparticles using AG:MD polymers to one-step process using our spray drying system. This study demonstrated that spray drying is a viable and rapid approach to

produce antioxidant microparticle. This technique shows great potential as an efficient and economic process for the production of EPA microparticles for drug delivery.

References

- Antonelli-Ushirobira T.M., Kaneshima, E.N., Gabriel, M., Audi, E.A., Marques, L.C., Mello, J.C.P. 2010. Acute and subchronic toxicological evaluation of the semipurified extract of seeds of guaraná (*Paullinia cupana*) in rodents. *Food Chemical Toxicology* 48, 1817–1820.
- Audi, E.A., Mello, J.C.P. 2000. Efeito antidepressivo do extrato da droga vegetal guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Martius) Ducke). Fundação Universidade Estadual de Maringá, BR Patent no. PI00066389, Cl. Int. A61P 25/24; A61K 35/78 (2000).
- Audi, E.A., Roncon, C.M., Almeida, C.B., Mello, J.C.P. 2010. Effect of semi-purified constituent from guaraná seeds on performance of rats in elevated T maze. *European Neuropsychopharmacology* 20, S274.
- Borghetti, G.S., Costa, I.M., Petrovick, P.R., Ferreira, V.P., Bassani, V.L. Characterization of different samples of quercetin in solid state: indication of polymorphism occurrence. *Pharmazie*, 61 (9), 802-804, 2006.
- Chassot, J.M., Longhini, R., Gazarini, L., Mello, J.C.P., Oliveira, R.M.W. 2011. Preclinical evaluation of *Trichilia catigua* extracts on the central nervous system of mice. *Journal of Ethnopharmacology* 137, 1143-1148.
- Espinola, E.B., Dias, R.F., Mattei, R., Carlini, E. 1997. Pharmacological activity of Guarana (*Paullinia cupana* Mart.) in laboratory animals. *Journal of Ethnopharmacology* 55, 223-229.
- Fu, N., Zhou, Z., Jones, T.B., Tan, T.T.Y., Wu, W.D., Lin, S.X., Chen, X. D., Chan, P.P.Y. 2011. Production of monodisperse epigallocatechin gallate (EGCG) microparticles by spray

drying for high antioxidant activity retention. *International Journal of Pharmaceutics* 413, 155-166.

Fukumasu, H., Silva, T.C., Avanzo, J.L., Lima, C.E., Mackowiak, I.I., Atroch, A., Spinosa, H.S., Moreno, F.S., Dagli, M.L.Z. 2006. Chemopreventive effects of *Paullinia cupana* Mart var. *sorbilis*, the guaraná, on mouse hepatocarcinogenesis. *Cancer Letters* 233, 158-164.

Henman, A.R. 1982. Guaraná (*Paullinia cupana* var. *Sorbilis*): ecological and social perspectives on an economic plant of the central amazon basin. *Journal Ethnopharmacology* 6, 311-338.

Johnston, G.A.R., Beart, P.M. 2004. Flavonoids: some of the wisdom of sage? *British Journal of Pharmacology* 142, 809-810.

Klein, T., Longhini, R., Mello, J.C.P. 2011. Development of an analytical method using reversed-phase HPLC-PDA for a semipurified extract of *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (guaraná). *Talanta*, 88, 502– 506, 2012.

Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., Rémésy, C., 2005. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *American Journal of Clinical Nutrition* 81, 230–242.

Mattei, R., Dias, R.F., Espinola, E.B., Carlini, E.A., Barros, S.B.M. 1998. Guarana (*Paullinia cupana*): toxic behavioral effects in laboratory animals and antioxidant activity in vitro. *Journal of Ethnopharmacology* 60, 111-116.

Otobone, F.J., Sanches, A.C.C., Nagaе, R.L., Martins, J.V.C., Obici, S., Mello, J.C.P., Audi, E.A. 2005. Effect of crude extract and its semi purified constituents from guaraná seeds (*Paullinia cupana* Var. *sorbilis* (Mart.) Lucke) on cognitive performance in morris water maze in rats. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 48, 723-728.

- Otobone, F.J., Sanches, A.C.C, Nagae, R.L., Martins, J.V.C., Sela, V.R., Mello, J.C.P., Audi, E.A. 2007. Effect of lyophilized extracts from Guarná seedes [*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke] on behavioral profiles in rats. *Phytotherapy Research* 21, 531-535.
- Roncon, C.M., de Almeida, C.B., Klein, T., Mello, J.C.P., Audi, E.A. 2011. Anxiolytic effects of a semipurified constituent of guaraná seeds on rats in the elevated T-maze test. *Planta Medica* 77, 236-241.
- Sansone, F., Picerno, P., Mencherini, T., Villeco, F., D'Ursi, A.M., Aquino, R.P., Lauro, M.R. 2011. Flavonoid microparticles by spray-drying: influence of enhancers of the dissolution rate properties and stability. *Journal of Food Engineering* 103, 188-196.
- Ushirobira, T.M.A., Yamaguti, E., Uemura, L.M., Nakamura, C.V., Dias Filho, B.P., Mello, J.C.P. 2007. Chemical and microbiological study of extract from seeds of guarana (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*). *Latin America Journal of Pharmacy* 26, 5-9.
- Yamaguti-Sasaki, E., Ito, L.A., Canteli, V.C.D., Ushirobira, T.M.A., Ueda-Nakamura T., Dias Filho, B.P., Nakamura C.V., Mello J.C.P. 2007. Antioxidant capacity and *in vitro* prevention of dental plaque formation by extracts and condensed tannins of *Paullinia cupana*. *Molecules* 12, 1950-1963.
- Weerakody, R., Fagan, P., Kosaraju, S. 2008. Chitosan microspheres for encapsulation of α -lipoic acid. *International Journal of Pharmaceutics* 357, 213-218.
- Zhang, L., Mou, D., Du, Y. 2007. Procyanidins: extraction and microencapsulation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87, 2192-2197.

Capítulo V

Desenvolvimento de comprimidos de extrato semipurificado de guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke)

O capítulo V apresenta o desenvolvimento de comprimidos de EPA a partir das micropartículas obtidas e discutidas no capítulo anterior. Os comprimidos obtidos foram caracterizados por diferentes técnicas para provar que atendem as exigências farmacopeicas.

Desenvolvimento de comprimidos de extrato semipurificado de guaraná (*Paullinia cupana* var. *Sorbilis* (MART.) DUCKE)

Traudi Klein, Renata Longhini, Marcos Luciano Bruschi, João Carlos Palazzo de Mello

Departamento de Farmácia, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil.

Resumo. O estudo teve por objetivo demonstrar a viabilidade tecnológica da produção de comprimidos de extrato semipurificado de guaraná, empregando processo de compressão direta (CD). Goma arábica e maltodextrina foram utilizadas na produção de micropartículas com o extrato a fim de proteger o mesmo de fatores ambientais e tecnológicos como temperatura e umidade. A celulose microcristalina e a lactose foram utilizadas como excipientes no desenvolvimento das formulações de comprimidos, visando investigar as propriedades de compressibilidade, desintegração, coesão e lubrificação. Usando metodologias previstas em Farmacopéias, foram realizados ensaios tecnológicos e físico-químicos. Os resultados evidenciaram que a mistura dos pós apresentou características de fluxo e compressibilidade adequadas para compressão direta. A formulação contendo 200 mg de micropartículas, 170 mg de celulose microscristalina e 10 mg de lactose foi eleita a mais adequada por apresentar melhores características nos testes de controle de qualidade.

Palavras-chave: *Paullinia cupana*, guaraná, celulose microcristalina, lactose, micropartículas, comprimidos, compressão direta.

1 Introdução

O desenvolvimento de uma forma farmacêutica engloba várias etapas, entre elas, estudos de pré formulação e formulação propriamente ditos, os quais consistem na caracterização física, química, físico-química e biológica de todas as matérias primas, incluindo o fármaco, usado na elaboração do produto, assim como das características anatômicas e fisiológicas da via de administração e absorção e, finalmente, a elaboração da forma farmacêutica (Le Hir, 1997; Ansel et al., 2000).

A compressão direta (CD) é o processo ideal para produção, em escala industrial, de comprimidos, e adequada para aquelas substâncias que possuem fluxo livre, propriedades de coesão e que possibilitam ser compactadas diretamente, sem necessidade de granulação úmida ou seca (Prista et al., 1995). É reduzido o número de fármacos que podem ser comprimidos sem granulação prévia (Prista et al., 1995; Ansel et al., 2000; Yuan & Wu, 2001). Atualmente, o uso de excipientes especiais tem proporcionado garantia de sucesso na CD de algumas formulações. Nesse processo, os excipientes utilizados devem ser materiais com propriedades de fluidez e compressibilidade (Palacios, 2000).

As vantagens da CD incluem: rapidez, facilidade de obtenção e redução de perdas de princípio ativo, além de poder ser empregadas para substâncias instáveis frente à umidade e à temperatura elevada, diminuindo riscos de contaminação, aumentando a capacidade produtiva e gerando economia ao setor produtivo (Prista et al., 1995; Ansel et al., 2000; Palacios, 2000). A CD, através dos alimentadores forçados, promove a deaeração sobre os pós volumosos e leves, tornando-os mais densos, permitindo assim que fluam uniforme e completamente para as cavidades da matriz. A deaeração também elimina o aprisionamento de ar no interior da matriz reduzindo assim a formação de *capping* ou rachaduras nos comprimidos (Ansel et al., 2000).

Estudos avaliaram as propriedades farmacológicas do extrato bruto liofilizado (EBPC) da *P. cupana* (guaraná) e frações semipurificadas (EPA e EPB) após administração aguda ou crônica pela via oral em ratos. O trabalho utilizou técnicas de controle, padronizando os extratos e verificou o efeito antidepressivo com o tratamento crônico de EBPC e EPA comparável ao do antidepressivo imipramina. A fração semipurificada EPB não demonstrou efeito antidepressivo (Audi e Mello, 2000).

Otobone et al. (2005) avaliaram os extratos citados acima sobre o comportamento cognitivo em ratos submetidos ao teste do labirinto aquático de Morris. O extrato bruto e uma das frações semipurificadas (EPA) demonstraram efeitos benéficos sobre a cognição. A cafeína, quando administrada isoladamente, demonstrou efeitos diferentes dos encontrados com os extratos o que sugere que os efeitos são devidos a outras substâncias presentes no extrato ao invés da cafeína. Os animais tratados cronicamente com os extratos tiveram a mesma evolução ponderal e sobrevida o que sugere baixa toxicidade dos extratos.

Otobone et al. (2007) avaliaram os efeitos ansiolíticos, antidepressivos e estimulantes do extrato bruto e frações semipurificadas (EPA, EPB), utilizando os testes PMT (*plus maze test*), FST (*forced swimming test*) e OFT (*open field test*), respectivamente. Os resultados com uma das frações semipurificadas (EPB) sugere que esta fração não contém componentes responsáveis pelos efeitos observados com o extrato bruto e a outra fração semipurificada (EPA). A fração semipurificada EPA, contém o(s) componente(s) responsável pelo efeito antiimobilidade, sugerindo um efeito antidepressivo como o observado com EBPC. Estes componentes não podem ser relacionados com a cafeína porque os resultados obtidos com esta substância isoladamente são diferentes daqueles encontrados com a administração dos extratos. Assim, taninos condensados, que foram isolados da fração EPA por Yamaguti-Sasaki et al. (2007), poderiam ser os responsáveis por esta atividade. Flavonóides, incluindo

taninos condensados, podem agir no sistema nervoso central porque conseguem atravessar a barreira hemato-encefálica (JOHNSTON, BEART, 2004).

Roncon et al. (2011) demonstraram que o EPA é ativo por via oral e produz efeitos panicolíticos em ratos submetidos ao teste ETM (*elevated T maze model*). Os sistemas neurotransmissores serotoninérgicos e dopaminérgicos estão envolvidos neste efeito. Assim, EPA pode ser muito útil no tratamento de transtornos de humor tais como transtorno do pânico (RONCON et al., 2011).

A partir desses resultados, outros estudos ainda devem ser realizados com intuito de identificar as substâncias responsáveis por estas ações farmacológicas e os mecanismos envolvidos, assim como uma forma farmacêutica deve ser desenvolvida para facilitar a administração da fração semipurificada, promissora como fitomedicamento no tratamento da depressão.

Assim, o objetivo do trabalho foi desenvolver comprimidos de EPA no intuito de conseguir uma forma farmacêutica sólida para administração oral de extrato semipurificado de guaraná (EPA).

2 Materiais e métodos

2.1 Materiais

Os materiais utilizados foram: celulose microcristalina, lactose, goma arábica (Synth), maltodextrina (Aldrich), acetonitrila (J.T. Baker), metanol (J.T. Baker), água ultrapura Milli-Q, ácido trifluoroacético (J.T. Baker), acetona (J.T. Baker), acetato de etila (J.T. Baker).

2.2 Métodos

2.1.1 Preparação do extrato semipurificado de guaraná

Sementes de guaraná foram obtidas do município de Alta Floresta, MT, Brasil e usadas para preparar uma solução extrativa acetona:água (70:30) a 10% (p/v) por turbo extração (Ultra-turrax UTC115KT, Ika Works, Wilmington, NC, USA). Após a remoção do solvente orgânico o material foi liofilizado e obtido o extrato bruto (EBPC). EBPC foi particionado com acetato de etila, resultando em uma fração acetato de etila (EPA) (Audi e Mello, 2000; Antonelli-Ushirobira et al 2010).

2.2.2 Preparação das micropartículas de EPA

As micropartículas contendo extrato semipurificado de guaraná (EPA) foram produzidas em equipamento *spray dryer* (Mini Spray Dryer BÜCHI B-191) com temperatura de entrada de 190 °C, aspiração de 80%, pressão de 2 bar e bombeamento de 6%. Foi preparada uma dispersão com 10% de sólidos em água de uma mistura de goma arábica e maltodextrina (50:50) correspondendo a 80% dos sólidos totais e EPA a 20%. Inicialmente a mistura de polímeros (goma arábica e maltodextrina) foi dispersa em água e o EPA em etanol 10%. Agitou-se separadamente a mistura polimérica e o EPA por 20 min. Após, a solução de EPA foi adicionada à dispersão polimérica e agitada por 5 min em temperatura ambiente e nebulizada no *spray dryer*.

2.2.3 Desenvolvimento das formulações

A mistura dos componentes da formulação de comprimidos foi realizada em gral de vidro observando diluição geométrica dos pós. Para a escolha da formulação adequada foram testadas as misturas apresentadas na tabela 1.

A dose de EPA para adulto normal de 70 kg para garantia do efeito antidepressivo é de 80 µg de EPA por dia. Esse valor foi obtido pela transposição de doses considerando a superfície corporal dos ratos utilizados no ensaio farmacológico e a superfície corporal de um

humano adulto de 70 kg. Assim, para formulação 1 temos 80 µg de EPA em 400 mg de micropartículas. Para as outras formulações não foi possível a utilização de 400 mg de micropartículas e a dose foi dividida em dois comprimidos cada qual com 40 µg de EPA.

Tabela 1. Composição das formulações testadas no desenvolvimento da formulação.

Formulação	Micropartículas (mg)	Celulose microcristalina	Lactose
1	400	0	0
2	200	25	75
3	200	90	10
4	200	140	10
5	200	170	10

Cada formulação foi testada inicialmente quanto a dureza e friabilidade. As que não apresentaram características adequadas nestes testes foram descartadas dos estudos subsequentes.

2.2.4 Determinação das densidades bruta e de compactação

Estes ensaios seguiram metodologia proposta por Guo et al. (1985) e Cardoso (2002) e foram realizados com o pó de micropartículas de EPA. Amostra de aproximadamente 10 g de pó (Ma) foi colocada em proveta previamente pesada. A densidade de compactação foi determinada com auxílio de volúmetro de compactação (ERWEKA® SVM 12). O pó foi submetido a 1250 quedas, segundo norma DIN 53194. As densidades bruta (db) e de compactação (dc) foram calculadas pelas equações (1) e (2):

$$db = \frac{Ma}{Vb} \quad \text{Equação (1)}$$

$$dc = \frac{Mc}{Vc} \quad \text{Equação (2)}$$

Onde: Vb: volume bruto; Vc: volume compactado.

2.2.5 Determinação do fator de Hausner, índice de compressibilidade e compactabilidade

A amostra utilizada no experimento anterior foi usada para determinação do fator de Hausner, índice de compressibilidade e compactabilidade, conforme metodologia referendada por Guo et al. (1985) e Cardoso (2002). O fator de Hausner foi determinado através do quociente entre as densidades de compactação e bruta, conforme equação (3):

$$FH = \frac{dc}{db} \quad \text{Equação (3)}$$

O índice de compressibilidade (IC) foi determinado segundo equação (4):

$$IC = \left(\frac{dc - db}{dc} \right) \times 100 \quad \text{Equação (4)}$$

Onde: dc: densidade de compactação (g/mL); db: densidade bruta (g/mL);

A compactabilidade (C) foi calculada através da diferença entre os volumes após 10 (V10) e 500 quedas (V500) em volume de compactação, conforme a equação (5), utilizando-se aproximadamente 10 g de pó; os resultados foram extrapolados para massa de 100,0 g, obtendo-se os volumes (mL) após 10 e 500 quedas.

$$C = V10 - V500 \quad \text{Equação (5)}$$

2.2.6 Fabricação dos comprimidos

Os comprimidos foram produzidos por compressão direta em máquina de compressão (FELLK mod. Compact 10, Brasil), usando punção de 10 mm. Amostras dos diferentes lotes foram conduzidas individualmente à câmara de compressão. Para cada formulação, foi

ajustada a força de compressão conforme propriedades do respectivo material. Os comprimidos foram acondicionados em frascos de vidro âmbar devidamente identificados para posterior análise e comparação físico-química.

2.2.7 Aspecto

Foram observados os caracteres visuais da forma farmacêutica obtida em relação à forma geométrica, ao aspecto à coloração e à presença de partículas ou material estranho à formulação.

2.2.8 Peso médio

Aplicou-se a metodologia prevista na Farmacopeia Brasileira (2010), usando faixa de tolerância de 5% para comprimidos com peso médio acima de 250,0 mg. Foram pesados, individualmente, 20 comprimidos determinando-se assim o peso médio. Segundo a Farmacopéia Brasileira (2010): “Pode-se tolerar não mais que duas unidades fora dos limites especificados, em relação ao peso médio, porém nenhuma poderá estar acima do dobro das percentagens indicadas”.

2.2.9 Dureza

A determinação da dureza dos comprimidos, em análise, foi realizada em durômetro ERWEKA[®], o qual mede o grau de força necessária para quebrá-los. Utilizaram-se 20 comprimidos de cada formulação (Farmacopeia Brasileira, 2010).

2.2.10 Friabilidade

Segundo procedimento previsto na Farmacopeia Brasileira (2010), pesaram-se, exatamente, 20 unidades as quais foram submetidas à ação de um friabilômetro (ÉTICA[®]).

Após 100 rotações, durante 5 min, os comprimidos foram novamente pesados. A diferença entre o peso inicial e final representou a friabilidade, em função da percentagem de pó perdido. O valor aceitável deve ser inferior a 1,5% do peso estabelecido.

2.2.11 Doseamento

O doseamento dos comprimidos foi realizado para a formulação final, em triplicata, seguindo metodologia por CLAE desenvolvida por Klein et al. (2012), na quantificação de marcadores químicos do extrato de guaraná, catequina e epicatequina.

2.2.12 Desintegração

A desintegração foi conduzida seguindo metodologia estabelecida pela Farmacopéia Brasileira (2010), usando desintegrador (ETICA[®]). O limite de tempo estabelecido, neste ensaio, para os comprimidos produzidos foi de 30 min.

2.2.13 Dissolução

A dissolução foi realizada em equipamento de célula de fluxo (SOTAX[®] AT 7 mod. Smart) utilizando como meio de dissolução água destilada, temperatura do meio de 37 °C e fluxo de 8 mL/min. O ensaio foi realizado para formulação 5 em triplicata em células de 22,6 mm para comprimidos.

3 Resultados e discussão

A tabela 2 apresenta os resultados dos ensaios tecnológicos realizados com o pó de micropartículas contendo o extrato semipurificado EPA.

Tabela 2. Resultados dos ensaios tecnológicos realizados com o pó de micropartículas de EPA.

Amostra	db (g/mL)	dc (g/mL)	FH	IC	C
Micropartículas de EPA	0,33	0,42	1,28	22,18	7,33

Os pós em geral que apresentam fator de *Hausner* (FH) inferior a 1,25, índice de compressibilidade (IC) inferior a 18% e índice de compactabilidade (C) inferior a 20 ml são facilmente compressíveis. O pó de micropartículas de EPA apresentou características de fluxo de pó não facilmente compressível, o que era de esperar para produtos naturais. Em face a esta dificuldade, foram utilizados outros adjuvantes farmacotécnicos (celulose microcristalina e lactose para compressão direta) para auxiliar na compressão e obtenção de comprimidos de EPA.

A formulação 1, com 100% de micropartículas e nenhum outro adjuvante farmacotécnico apresentou dureza de 55 N mas não teve característica desejável no teste de friabilidade.

A formulação 2 não foi adequada e os comprimidos demonstraram falta de coesão entre as partículas. A formulação 3 apresentou dureza de 493 N mas não resistiu ao teste de friabilidade. A formulação 4 demonstrou dureza de 491 N e perda de 10,08% no teste de friabilidade.

Com a formulação 5 conseguiu-se características adequadas de qualidade para os comprimidos e os resultados dos testes estão na tabela 3.

Tabela 3. Resultados dos testes físicos e físico-químicos realizados com os comprimidos da formulação 5.

Comprimidos	Peso médio (g)	Dureza (N)	Friabilidade (%)	Desintegração (min)	Doseamento (%)	
					Catequina	Epicatequina
Formulação 5	0,3821	116	0,28	25	92,56	89,43

O peso médio dos comprimidos foi adequado, levando-se em consideração que todos estavam dentro da faixa de tolerância de $\pm 5\%$, especificada pela Farmacopeia Brasileira (2010).

Segundo Ansel et al. (2000), os comprimidos devem ser suficientemente duros de modo a resistir à quebra durante a embalagem, o transporte ou a manipulação convencional, sendo, contudo, habilitados para dissolver ou desintegrar apropriadamente depois de administrados; ou para serem partidos com os dedos, quando se fizer necessário tomar uma dose parcial. Friabilidade é a falta de resistência dos comprimidos à abrasão, quando submetidos a ação mecânica de aparelhagem específica. A friabilidade determinada para os comprimidos testados foi inferior a 1,5%, o que garantiu que os mesmos foram produzidos com adequadas características de coesão entre as partículas para resistir ao impacto da manipulação e do transporte.

Em relação ao teor de princípio ativo, todas as formulações apresentaram-se dentro dos limites previstos pela Farmacopeia Brasileira, garantindo a dose estabelecida.

O tempo de desintegração determina se um comprimido se desintegra dentro do limite de tempo especificado. O limite de tempo estabelecido como critério geral para o teste de desintegração de comprimidos é de 30 min, a menos que outra especificação se encontre na monografia do medicamento (Farmacopeia brasileira, 2010). Quanto à desintegração, a formulação apresentou-se dentro do limite estabelecido (30 min).

No que diz respeito ao aspecto dos comprimidos, estes se apresentaram com as seguintes características: coloração levemente amarelada, circulares, planos e isentos de material estranho (Figura 1).



Figura 1. Imagem dos comprimidos produzidos a partir da formulação 5.

A figura 2 demonstra o perfil de dissolução dos comprimidos da formulação 5. Observa-se que todo conteúdo de EPA dos comprimidos é liberado ao longo de 120 min e que as interações entre EPA e os polímeros utilizados na composição das micropartículas, e os adjuvantes farmacotécnicos utilizados na formulação dos comprimidos não prejudicam a liberação dos ativos, já que todo conteúdo de EPA, quantificados com base nos marcadores químicos catequina e epicatequina, é liberado no meio de dissolução.

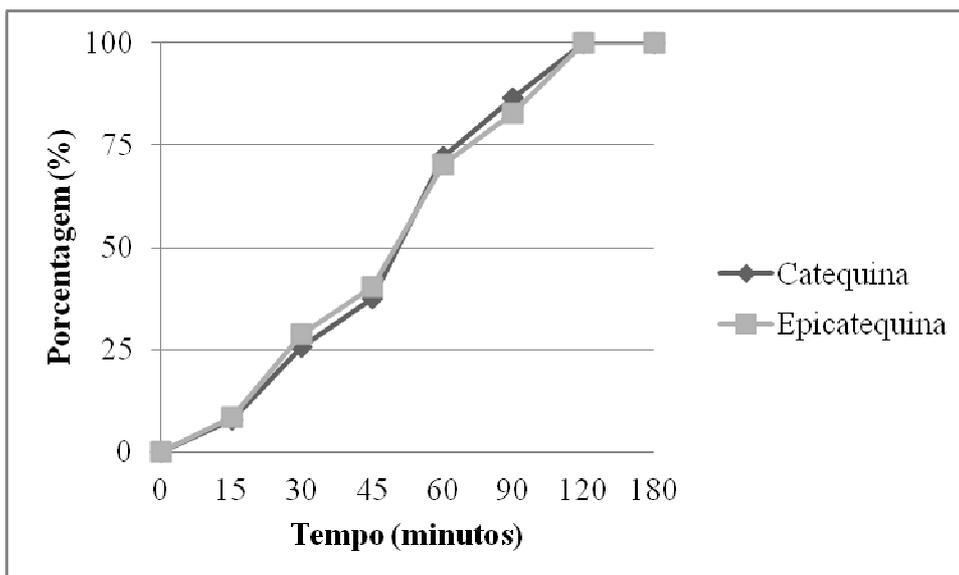


Figura 2. Perfil de dissolução dos comprimidos da formulação 5 com base nos marcadores catequina e epicatequina.

Assim, a formulação 5 foi adequada para comprimidos contendo EPA para produção e consumo. A perspectiva é de realizar estudos de estabilidade para estes comprimidos a fim de saber se são estáveis a fatores ambientais e estabelecer prazo de validade.

Conclusão

Foram obtidos comprimidos de extrato semipurificado de guaraná (EPA) com características de qualidade que atendem as especificações farmacopeicas e portanto adequados e seguros para administração e utilização por via oral.

Referências bibliográficas

ANTONELLI-USHIROBIRA, TM; KANESHIMA, EN, GABRIEL, M; AUDI, EA; MARQUES, LC; MELLO, JCP. Acute and subchronic toxicological evaluation of the semipurified extract of seeds of guaraná (*Paullinia cupana*) in rodents. **Food and Chemical Toxicology**, 48, 1817–1820, 2010.

ANSEL, H. C. et al. Farmacotécnica: formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos. 6. ed. São Paulo: Premier, 2000.

AUDI, E. A.; MELLO, J. C. P. Efeito antidepressivo do extrato da droga vegetal guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Martius) Ducke). **FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ**, Cl. Int. A61P 25/24; A61K 35/78. BR n. PI00066389. 28/11/2000.

CARDOSO, M. L. C. Desenvolvimento de metodologias analítica e tecnológica na obtenção de extratos secos nebulizados de *Heteropteris aphrodisiaca* O. Madi. - *Malpighiaceae*. 2002. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de São Paulo, Araraquara, 2002.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 5. ed. Fiocruz: Brasília, 2010.

GUO, A. et al. A simple relationship between particle shape effects and density, flow rate and hausner ratio. *Powder Technology*, Lousanne, v. 43, p. 279-284, 1985.

KLEIN, T. et al. Development of an analytical method using reversed-phase HPLC-PDA for a semipurified extract of *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (guaraná). *Talanta*, 88, 502– 506, 2012.

LE HIR, A. Noções de Farmácia Galênica. 6. ed. São Paulo: Andrei, 1997.

OTOBONE, F. J.; SANCHES, A. C.; NAGAE, R. L.; MARTINS, J. V. C.; OBICI, S.; MELLO, J. C. P.; AUDI, E. A. Effect of crude extract and its semi purifies constituents from guaraná seeds (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.)) Lucke on cognitive performance in morris water maze in rats. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, p. 723-728, 2005.

OTOBONE, F. J.; SANCHES, A. C. C.; MAGAE, R. L.; MARTINS, J. V. C.; SELA, V. R.; MELLO, J. C. P.; AUDI, E. A. Effect off liophilized extracts from guaraná seeds [*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke] on behavioral profiles in rats. **Phitoterapy Research**, v. 21, p. 531-535, 2007.

PALACIOS, A. Realidade em granulação e compressão direta. A Fórmula, São Paulo, n. 1, p. 12-13, 2000.

PRISTA, L. N. et al. Tecnologia Farmacêutica. 5. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1995.

RONCON, C.M., DE ALMEIDA, C.B., KLEIN, T., MELLO, J.C.P., AUDI, E.A.. Anxiolytic effects of a semipurified constituent of guaraná seeds on rats in the elevated T-maze test. **Planta Medica** 77, 236-241, 2011.

YAMAGUTI-SASAKI, E.; ITO, L. A.; CANTELI, V. C. D.; USHIROBIRA, T. M. A.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B. P.; NAKAMURA, C. V.; MELLO, J. C. P. Antioxidant capacity and *in vitro* prevention of dental plaque formation by extracts and condensed tannins of *Paullinia cupana*. **Molecules**, v. 12, p. 1950-1963, 2007.

YUAN, J.; WU, S. H. W. Um estudo de viabilidade usando acetato de celulose e acetato butirato de celulose. Pharmaceutical Technology, São Paulo, v. 5, n. 2, p. 34-37, 2001.

DISCUSSÃO

O guaraná é um arbusto originário da Amazônia, cultivado principalmente no município de Maués, AM, no estado de Mato Grosso e na Bahia e seus benefícios estão presentes também nas ações de cultivo sustentável e desenvolvimento das comunidades extrativistas, para as quais representa uma grande oportunidade de progresso sócio-econômico. Tem grande apelo comercial devido ao grande consumo no mundo todo de bebidas refrigerantes e energéticas obtidas a partir das suas sementes. Uma grande importância também se observa no consumo de fitoterápicos, nutracêuticos, extratos e cosméticos preparados a partir do guaraná.

O guaraná tem sido estudado há tempos devido às suas qualidades terapêuticas e tem demonstrado ser um promissor medicamento antidepressivo. Aliado aos efeitos benéficos desta droga frente à depressão, um mal cada vez mais presente na vida de populações de todo o mundo, temos o fato de o desenvolvimento de fitomedicamentos (FTM) à base de plantas medicinais brasileiras estimularem o desenvolvimento da indústria nacional de medicamentos.

Observando a necessidade do mercado e a falta de especificação dos fitomedicamentos disponíveis, torna-se importante o desenvolvimento de um fitomedicamento padronizado de guaraná, com qualidade e eficácia garantidas no tratamento da depressão.

Os FTM podem ser tão eficazes quanto os medicamentos produzidos com ativos oriundos de síntese química, por isso a transformação de uma planta num medicamento deve priorizar a preservação da integridade química dos princípios ativos e por consequência, a ação farmacológica do vegetal, garantindo a constância da ação biológica desejada (KLEIN et al., 2009).

Atualmente, a padronização de fitoterápicos é realizada com base no teor de uma substância marcadora presente no extrato, indicando que se a mesma estiver presente em quantidade apropriada também os demais componentes estarão igualmente representados. Os

diferentes métodos existentes para a padronização físico-química de fitoterápicos incluem, entre outros, técnicas cromatográficas como a cromatografia líquida de alta eficiência. De acordo com o Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos, Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003 (BRASIL, 2003), a validação de processo analítico deve garantir, através de evidências experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. (KLEIN et al., 2009).

Este trabalho demonstrou um método analítico por CLAE capaz de quantificar os marcadores químicos envolvidos na validação e padronização do extrato semipurificado (EPA) de guaraná. Este método, aplicado para os marcadores químicos catequina e epicatequina, demonstrou-se exato, preciso e reprodutível, atendendo a todos os parâmetros da legislação vigente (KLEIN et al., 2012).

Os ativos vegetais de maneira geral apresentam como grande desvantagem de uso a instabilidade química de suas moléculas. Para contornar este problema diversas técnicas podem ser utilizadas. Neste trabalho desenvolveram-se micropartículas de EPA com intuito de proteger este ativo vegetal de fatores ambientais como temperatura e umidade. O método utilizado para preparação das micropartículas foi secagem por atomização (*spray dryer*). As micropartículas, na ordem de micrometros, foram obtidas com características adequadas para posterior formulação e obtenção de comprimidos de EPA.

Dentre as formas farmacêuticas destinadas à administração pela via oral, os comprimidos têm sido o sistema de liberação de fármacos preferido para obtenção de efeito sistêmico. Dentre as vantagens em relação ao seu uso estão a grande precisão de dosagem, a baixa variabilidade do conteúdo, a facilidade de identificação visual, manuseio e administração e a grande aceitação por parte dos pacientes, além de proporcionarem maior estabilidade, se comparadas às formas líquidas ou semi-sólidas (BANKER, ANDERSON, 2001).

Os comprimidos de EPA foram desenvolvidos e caracterizados por testes físicos e físico-químicos e pelo perfil de dissolução. Estes se mostraram adequados para produção e ingestão do EPA na forma de comprimidos. Estudos de estabilidade são necessários para que o produto desenvolvido neste trabalho possa ser empregado em ensaios clínicos, como se pretende, para a finalidade farmacológica a que se destina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDREATINI, R. Uso de fitoterápicos em psiquiatria. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, v. 22, n. 3, p. 104-105, 2000.

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN JR, A. Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos. 6. ed. São Paulo: Premier, 2000.

ANSELMO, G. C. S.; MATA, M. E. R. M. C.; ARRUDA, P. C.; SOUSA, M. C. Determinação da higroscopicidade do cajá em pó por meio da secagem por Atomização. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*, v. 6, n. 2, 2006.

BANKER, G. S.; ANDERSON, N. R. Comprimidos. In: LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. Teoria e prática na indústria farmacêutica. 6 ed. Lisboa: Editora Fundação Calouste Gulbenkian, v. 2, p. 509-597, 2001.

BRASIL. ANVISA/MS, 2004. Resolução - RDC nº 48, de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Disponível em <www.anvisa.org.br>. Acesso em 30 de agosto 2008.

BRASIL. ANVISA/MS. Resolução – RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Disponível em <www.anvisa.org.br>. Acesso em 30 de abril 2007.

CASTRO, W. V.; OLIVEIRA, M. A.; NUNAN, E. A.; CAMPOS, L. M. M. Avaliação da qualidade e perfil de dissolução de comprimidos gastro-resistentes de diclofenaco sódico 50 mg comercializados no Brasil. *Revista Brasileira de Farmácia*, v. 86, n. 1, p. 45-50, 2005.

DAVID, J. P.; NASCIMENTO, J. A. P.; DAVID, J. M. Produtos fitoterápicos: uma perspectiva de negócio para a indústria, um campo pouco explorado pelos farmacêuticos. *Infarma*, v. 16, n. 9-10, p. 71-76, 2004.

ESPINOLA, E. B.; DIAS, R. F.; MATTEI, R.; CARLINI, E. A. Pharmacological activity of Guaraná (*Paullinia cupana* Mart.) in laboratory animals. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 55, p. 223-229, 1997.

ESTEVES, B. N. 2006. 86 f. Influência do processo de secagem por pulverização mecânica (*spray dryer*) no tamanho de partícula e densidade aparente do café solúvel. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Escola Politécnica da Universidade de São Paulo – USP, 2006.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2003.

FRANÇA, S. C. Abordagens biotecnológicas para a obtenção de substâncias ativas. In: SIMÕES, C. M. O.; SHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 3 ed. UFSC/UFRGS, 2001.

FUKUMASU, H.; SILVA, T. C.; AVANZO, J. L.; LIMA, C. E.; MACKOWIAK, I. I.; ATROCH, A.; SPINOSA, H. S.; MORENO, F. S.; DAGLI, M. L. Z. Chemopreventive

effects of *Paullinia cupana* Mart. *Var. sorbilis*, the guaraná, on mouse hepatocarcinogenesis. *Cancer Letters*, v. 233, p. 158-164, 2006.

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ, Elisabeth Aparecida Audi, João Carlos Palazzo de Mello. Efeito antidepressivo do extrato da droga vegetal guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Martius) Ducke). Cl. Int. A61P 25/24; A61K 35/78. BR n. PI00066389. 28/11/2000.

GIL, E. S.; ORLANDO, R. M.; MATIAS, R.; SERRANO, S. H. P. Controle físico-químico de qualidade de medicamentos. 1. ed. Campo Grande: Editora Uniderp, 2005.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Tratado de fisiologia médica. 9. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1997.

HENMAN, A. R. Guaraná (*Paullinina cupana* var. *sorbilis*): ecological and social perspectives on an economic plant of the central amazon basin. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 6, p. 311-338, 1982.

JOHNSTON, G. A. R.; BEART, P. M. Flavonoids: some wisdom of sage?. *British Journal of Pharmacology*, v. 142, p. 809-810, 2004.

KLEIN, T.; LONGHINI, R.; BRUSCHI, M. L.; MELLO, J. C. P. Fitoterápicos: um mercado promissor. *Rev Ciênc Farm Básica Apl.*, 30 (3), 241-248, 2009.

KLEIN, T., LONGHINI, R., MELLO, J.C.P. Development of an analytical method using reversed-phase HPLC-PDA for a semipurified extract of *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (guaraná). *Talanta*, 88, 502– 506, 2012.

KLEINEBUDDE, P. Roll compaction/dry granulation: pharmaceutical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 58, n. 2, p. 317-326, 2004.

LACHMAN, L., LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. Teoria e prática na indústria farmacêutica. 6. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, v. 1, 2001.

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

MARTINELLO, T. 2005. 153 f. Desenvolvimento de comprimidos de paracetamol de 500 mg fabricados por compressão direta utilizando o planejamento estatístico de mistura. Dissertação (Mestrado em Produção e Controle Farmacêuticos) – Universidade de São Paulo – USP, 2005.

MATTEI, R.; DIAS, R. F.; ESPINOLA, E. B.; CARLINI, E. A.; BARROS, S. B. M. Guaraná (*Paullinia cupana*): toxic behavioral effects in laboratory animals and antioxidant activity *in vitro*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 60, p. 111-116, 1998.

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

NICOLETTI, M. A.; OLIVEIRA-JUNIOR, M. A.; BERTASSO, C. C.; COPOROSSO, P. Y.; TAVARES, A. P. L. Principais interações no uso de medicamentos fitoterápicos. *Infarma*, v. 19, n. 1/2, p. 32-40, 2007.

OTOBONE, F. J.; SANCHES, A. C.; NAGAE, R. L.; MARTINS, J. V. C.; OBICI, S.; MELLO, J. C. P.; AUDI, E. A. Effect of crude extract and its semi purified constituents from guaraná seeds (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.)) Lucke on cognitive performance in morris water maze in rats. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 48, p. 723-728, 2005.

OTOBONE, F. J.; SANCHES, A. C. C.; MAGAE, R. L.; MARTINS, J. V. C.; SELA, V. R.; MELLO, J. C. P.; AUDI, E. A. Effect of lyophilized extracts from guaraná seeds [*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke] on behavioral profiles in rats. *Phytoterapy Research*, v. 21, p. 531-535, 2007.

PALACIOS, A. Realidade em granulação e compressão direta. *A Fórmula*, n. 1, p. 12-13, 2000.

PRISTA, L. N.; ALVES, A. C.; MORGADO, R. *Tecnologia Farmacêutica*. 4. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, v. 3, 1995.

RONCON, C.M., DE ALMEIDA, C.B., KLEIN, T., MELLO, J.C.P., AUDI, E.A.. Anxiolytic effects of a semipurified constituent of guaraná seeds on rats in the elevated T-maze test. *Planta Medica* 77, 236-241, 2011.

SEITZ, J. A.; MEHTA, S. P.; YEAGER, J. L. Revestimento de comprimidos. In: LACHMAN, L., LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. Teoria e prática na indústria farmacêutica. 6. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, v. 1, 2001.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 3. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC, 2001.

SONAGLIO, D.; ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P. R.; BASSANI, V. L. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 3. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC, 2007.

TERASHITA, K.; IMAMURA, K. Preparation of antipyretic analgesic by direct compression and its evaluation. *Chem. Pharm. Bull.*, v. 50, n. 12, p. 1542-1549, 2002.

USHIROBIRA, T. M. A.; YAMAGUTI, E.; UEMURA, L. M.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P.; MELLO, J. C. P. Chemical and microbiological study of extract from seeds of guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*). *Acta Farmaceutica Bonaerense*, v. 26, p. 5-9, 2007.

YAMAGUTI-SASAKI, E.; ITO, L. A.; CANTELI, V. C. D.; USHIROBIRA, T. M. A.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B. P.; NAKAMURA, C. V.; MELLO, J. C. P. Antioxidant capacity and *in vitro* prevention of dental plaque formation by extracts and condensed tannins of *Paullinia cupana*. *Molecules*, v. 12, p. 1950-1963, 2007.

WANCZINSKI, B. J.; FELIPE, D. F.; CARDOSO, M. L. C.; CAVALCANTI, O. A. Desenvolvimento de comprimidos de AAS 500 mg: influência do Amido 1500[®] na compressão direta. *Acta Scientiarum*, Maringá, v. 24, n. 3, p. 649-655, 2002.

WU, J. S.; HO, H.O.; SHEU, M. T. A statistical design to evaluate the influence of manufacturing factors on the material properties and functionalities of microcrystalline cellulose. *Eur. J. Pharm. Sci.*, v. 12, p. 417-425, 2001.

ANEXO I

Effect of Semi-purified Constituent from Guaraná Seeds [*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke] on Performance of Rats in Elevated T maze

Camila Marroni Roncon, Camila Biesdorf de Almeida, Traudi Klein, João Carlos Palazzo de Mello, Elisabeth Aparecida Audi.

Planta Medica 77 (3), 236-41, 2011.

Abstract: The objective of this study was to investigate the effects of chronic administration of a semi-purified extract (Purified Extract A – PEA; 4, 8, or 16 mg/kg) of *Paullinia cupana* (guaraná) seeds on rats submitted to the elevated T-maze (ETM) model of generalized anxiety and panic disorders. The selective serotonin (5-HT) reuptake inhibitor (SSRI) paroxetine (PAR; 3mg/kg), was used as a positive control. To evaluate possible serotonergic and dopaminergic neurotransmission involvement in the action of PEA during the ETM test, ineffective doses of metergoline (MET; 5-HT_{2A/2C} antagonist receptor) or sulpiride (SUL; dopaminergic receptor antagonist) were acutely administered together with the PEA. The locomotion of the rats was assessed in a circular arena following each drug treatment. Both PEA (8 and 16 mg/kg) and PAR (3 mg/kg) increased one-way escape latencies from the open arm of the ETM, indicating a panicolytic effect compared to the control group. MET, in higher doses (1, 2 or 3mg/kg), produced a panicolytic effect in the ETMtest, whereas SUL did not (10, 20 or 40mg/kg). The panicolytic effect produced by PEA (8mg/kg) was blocked by both MET (2mg/kg) and SUL (20 mg/kg), whereas the panicolytic effect produced by PAR (3mg/kg) was blocked only by MET (2 mg/kg). These results show that chronic treatment

with PEA produces a panicolytic effect during the ETM test, and that the dopaminergic and the serotonergic neurotransmission systems are involved in this effect.

ANEXO II

1. Determinação do teor de taninos totais (GLASL, 1983)

Foi pesado exatamente cerca de 0,750 g de droga pulverizada, transferida para um erlenmeyer com 150 ml de água deixando-se durante 30 min em banho-maria à temperatura de 85 °C. Após resfriamento em água corrente, o conteúdo foi transferido para um balão volumétrico de 250 ml, completando-se o volume com água. Cerca de 80 ml do extrato foram filtrados, desprezando-se os primeiros 20 ml. O filtrado obtido foi denominado Solução-Mãe (SM). Para a determinação de polifenóis totais (PT), 5 ml da SM foram diluídos com água em balão volumétrico de 25 ml. Dois mililitros dessa solução foram transferidos com 1 ml de solução de ácido fosfotúngstico R (Reagente fenólico de Folin-Ciocalteu 2 *N*) e 10 ml de água para um balão volumétrico de 25 ml, completando-se o volume com solução de carbonato de sódio 14,06%. Após 15 min da adição da última solução mediu-se a absorvância a 691 nm, empregando-se a água como branco. Para determinações de polifenóis não adsorventes (PNA), 10 ml da SM foram transferidos com 0,100 g de pó-depele R para um béquer e agitados durante 60 min. Após, a solução foi filtrada e 5 ml do filtrado foi diluído com água para 25 ml em balão volumétrico. Dois mililitros dessa solução foram transferidos com 1 ml de solução de ácido fosfotúngstico R (Reagente fenólico de Folin-Ciocalteu 2 *N*) e 10 ml de água para um balão volumétrico de 25 ml, completando-se o volume com solução de carbonato de sódio 14,06%. Após 15 min da adição da última solução mediu-se a absorvância a 691 nm, empregando-se a água como branco. Foram realizadas três determinações.

Os resultados estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1. Determinação do teor de taninos totais para sementes de guaraná.

Amostra	Peso amostra (g)	Abs Polifenóis totais	PT (%)	Abs PNA	PNA (%)	TT (%)	Média	Desvio padrão	CV%
1	0,7510	0,388	8,07	0,186	3,86	4,20	4,12	0,1089	2,64
2	0,7508	0,386	8,03	0,183	3,81	4,21			
3	0,7508	0,370	7,70	0,178	3,70	4,00			
4	0,7500	0,373	7,77	0,181	3,77	4,00			
5	0,7503	0,389	8,10	0,186	3,87	4,23			
6	0,7527	0,406	8,42	0,211	4,38	4,04			
7	0,7516	0,425	8,83	0,202	4,19	4,22			

O teor de constituintes químicos de um vegetal pode variar consideravelmente com a época e local de coleta, formas de cultivo, condições climáticas, entre outros. Assim, sugere-se a determinação do limite mínimo aceitável através de um estudo científico sistemático. Dessa forma, o doseamento de composto ou grupos químicos torna-se um parâmetro importante de qualidade.

O método utilizado foi a clássica reação de Folin-Ciocalteu, um método espectrofotométrico que determina a intensidade da coloração azul formada pela redução do ácido fosfotúngstico com compostos fenólicos. Esta técnica baseia-se na associação dos taninos às proteínas, o que o torna mais específico, além de apresentar maior sensibilidade e robustez que os métodos gravimétricos para determinação de taninos. O resultado de 4,12% de taninos totais para as sementes totais de guaraná está de acordo com o exigido pela farmacopéia brasileira que exige no mínimo 4% de taninos totais.

2. Rendimento obtido na preparação dos extratos

A tabela 2 apresenta os resultados de rendimento obtidos na produção do extrato semipurificado de guaraná (EPA).

Tabela 2. Rendimentos na produção de EPA.

	Rendimento (%)		Média
Extrato bruto	16,71	18,35	17,53
EPA	8,17	10,30	9,23
Fração aquosa	4,11	5,79	4,95

3. Determinação da granulometria dos pós (HELMAN, 1982)

Foi empregada a técnica de análise granulométrica por tamisação. Foram utilizados tamises com malha de abertura: 0,84; 0,50; 0,42; 0,35; 0,21 e 0,18 mm e o coletor. Pesaram-se 25,0 g do vegetal moído que foram colocados no conjunto de tamises. O conjunto foi tamisado durante 20 min a 70 vibrações por minuto. Após a tamisação, procedeu-se à pesagem, determinando-se a quantidade de material retido em cada peneira. O resultado é fornecido sob forma tabelar, apresentando-se classe granulométrica (CG; mm); intervalo de abertura de malha (Δm ; mm); dimensão granulométrica média (\bar{m} ; mm); fração retida percentual (F; %); fração resíduo percentual (R; %) e fração passagem percentual (P; %). Esses dados possibilitaram o cálculo do diâmetro médio de partícula (d_{50}) pelo ponto de cruzamento das curvas de passagem e retenção. Além disso, esse resultado foi comparado ao diâmetro médio calculado pela equação (ANSEL et al., 2005):

$$d_{50} = \frac{\bar{m} \cdot \sum R(\%)}{100}$$

A tabela 3 apresenta os resultados das pesagens do pós após a tamisação.

Tabela 3. Granulometria do pó de guaraná.

Abertura de malha do tamis (mm)	Média	Desvio padrão	CV%
1,41	3,31	0,7565	22,78
0,84	26,13	1,2698	4,86
0,42	35,99	0,7599	2,11
0,35	5,26	0,4348	8,26
0,21	10,44	0,2662	2,55
Fundo	18,13	0,9242	5,09

O resultado obtido para a granulometria do pós das sementes de guaraná foi de diâmetro médio das partículas de 0,4577 mm.

A distribuição granulométrica é um fator importante na obtenção de um extrato, já que um maior ou menor rendimento na extração está intimamente relacionado com a área de superfície e dimensões das partículas em contato com o líquido extrator

4. Determinação da perda por dessecação.

Cerca de 5 g da droga vegetal cominuída foi exatamente pesada em papel alumínio previamente tarado e colocado em balança de secagem por infravermelho por 15 min a temperatura de 110 °C. Após resfriamento em dessecador, o material foi pesado. Este procedimento foi repetido até peso constante. Os resultados são expressos em perda de massa percentual, pela média de, no mínimo, cinco determinações.

Tabela 4. Perda por dessecação do pó de guaraná (5 g droga, 15 min, 110 °C).

Amostra	Perda por dessecação (%)	Média	Desvio padrão	CV%
1	8,0	7,84	0,1673	2,13
2	7,8			
3	8,0			
4	7,6			
5	7,8			

A presença de água em excesso, em drogas vegetais, promove o crescimento de fungos, bactérias ou insetos e hidrólise de constituintes. Por essa razão, limites de água são descritos para drogas vegetais, especialmente para aquelas que facilmente absorvem água ou aquelas nas quais a deterioração é promovida pela presença de água em excesso, visto que este fato impede o armazenamento por tempo prolongado. Este parâmetro é fundamental para determinar a estabilidade da droga frente ao período de armazenamento.

A farmacopéia brasileira permite no máximo 9,5% de umidade para as sementes de guaraná, portanto nosso material está de acordo com sua monografia específica.

5. Determinação do teor de resíduo seco (DEUTSCHES, 1986)

Cerca de 20,0 g da solução extrativa foram exatamente pesadas em pesa-filtro previamente tarado e evaporadas até secura em banho de água, sob agitação casual. O pesa-filtro foi colocado em estufa por 3 h à temperatura de aproximadamente 105 °C, resfriado em dessecador, pesado e recolocado em estufa por mais 30 min. Este procedimento foi repetido até peso constante. O resultado é expresso em relação a 100,0 g do extrato, pela média de, no mínimo, cinco determinações. As soluções extrativas analisadas foram: (A) Solução acetona:água (7:3, v/v) e (B) água. Todas as soluções foram preparadas em turbolizador (15 min/40 °C) na proporção de 10% (p/v) da droga vegetal moída.

Tabela 5. Teor de extrativos do pó de guaraná.

Solvente	Teor de extrativos (%)					Média	Desvio padrão	CV%
Água	5,27	5,25	5,19	5,09	5,51	5,26	0,1553	2,95
Acetona:água 7:3	5,58	5,14	5,07	5,10	4,98	5,17	0,2329	4,49

A determinação do teor de resíduo seco, além de um dado complementar de controle de qualidade, uma vez que determina quantitativamente as substâncias totais extraíveis de certa droga vegetal, contribui para a escolha do melhor líquido extrator, pois possibilita a utilização de diferentes soluções extrativas. Embora a água consiga extrair quantidade um pouco superior de substâncias que a mistura acetona:água, sabemos que para extração dos compostos que nos interessam, no caso polifenóis, a mistura acetona:água é mais adequada que somente água como líquido extrator.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANSEL, H.C.; POPOVICH, N.G.; ALLEN JR., L.V. *Pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems*. 8. ed, Baltimore: Ed. Lippincott Williams & Wilkins, 738 p., 2005.

DEUTSCHES Arzneibuch. 9. ed., Stuttgart: Wissenschaftliche, 1986.

GLASL, H. Zur Photometrie in der Drogenstandardisierung. 3. Gehaltsbestimmung von Gerbstoffdrogen. *Deutsche Apotheker Zeitung*, v. 123, p. 1979-1983, 1983.

HELMAN, J. *Farmacotecnica teorica y practica*. 3 ed. Mexico: Continental, 1982.