



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA E FARMACOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO TECNOLÓGICA DE
EXTRATOS E DO GRANULADO DE *Paullinia cupana* H.B.K. var.
sorbilis (Mart.) Ducke (GUARANÁ)**

MARIA INEZ DE GODOY PELOZO

MARINGÁ

2005

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO TECNOLÓGICA DE
EXTRATOS E DO GRANULADO DE *Paullinia cupana* H.B.K. var.
sorbilis (Mart.) Ducke (GUARANÁ)**

MARIA INEZ DE GODOY PELOZO

ORIENTADOR: Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello

CO-ORIENTADORA: Prof^a Dra. Mara Lane Carvalho Cardoso

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração: Produtos Naturais Biologicamente Ativos, da Universidade Estadual de Maringá, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

MARINGÁ

2005

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

P392d Pelozo, Maria Inez de Godoy.

Desenvolvimento e caracterização tecnológica de extratos e do granulado de *Paullinia cupana* H.B.K. var. *sorbilis* (Mart.) Ducke (Guaraná) / Maria Inez de Godoy Pelozo. – Maringá, 2005.

75f. : il. + anexos no final da obra.

Orientador: João Carlos Palazzo de Mello.

Co-orientador: Mara Lane Carvalho Cardoso.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual de Maringá, 2005.

Inclui bibliografia.

1. Matéria médica vegetal – Teses. 2. Tecnologia farmacêutica – Controle de qualidade – Teses. 3. Fitoterapia – Teses. I. Mello, João Carlos Palazzo de. II. Cardoso, Mara Lane Carvalho III. Universidade Estadual de Maringá. IV. Título.

CDU 615.32


Marlova Santurio David CRB 9/1107

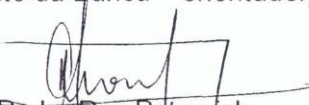


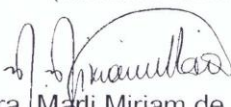
Fundação Universidade Estadual de Maringá
Departamento de Farmácia e Farmacologia
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

ATA DO EXAME DE DISSERTAÇÃO DA PÓS-GRADUANDA MARIA INÊZ DE GODOY PELOZO, REALIZADA NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ, NO DIA TRÊS DO MÊS DE JUNHO DO ANO DE DOIS MIL E CINCO.

No terceiro dia do mês de junho do ano de dois mil e cinco, às nove horas, no Bloco K-80, Sala 12, realizou-se o exame de dissertação “Desenvolvimento e caracterização tecnológica de extratos e do granulado de *Paullinia cupana* H.B.K. var. *sorbilis* (Mart.) Ducke (Guaraná)”, da pós-graduanda Maria Inez de Godoy Pelozo, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração Produtos Naturais Biologicamente Ativos. A Banca Examinadora esteve constituída pelos professores Dr. João Carlos Palazzo de Mello (presidente/orientador), Dr. Pedro Ros Petrovick (membro convidado) e Dra. Marli Miriam de Souza Lima (membro convidado). Concluídos os trabalhos de apresentação e argüição, a pós-graduanda foi aprovada, obtendo o título de mestre. E para constar, foi lavrada a presente ata que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.


Dr. João Carlos Palazzo de Mello
(Presidente da Banca – orientador)


Dr. Pedro Ros Petrovick
(Membro convidado)


Dra. Marli Miriam de Souza Lima
(Membro convidado)

Dedico este trabalho aos meus queridos pais, exemplo de amor e caráter; e ao Albino, pelo apoio e estímulo incondicionais.

AGRADECIMENTOS

Às secretárias do departamento de farmacologia e farmácia, Helena e Sônia, pela amizade, pelo ombro receptivo e pela paciência de Jó.

À dona Nair, aquela senhora do cafezinho e do abraço gostoso.

Aos técnicos dos laboratórios, especialmente, Leocir, Admir, Cláudio, Lucílio e Nina, sem eles, como e onde achar?

Aos professores do departamento, sem exceção, que dispensaram seu precioso tempo quando solicitados, mas em especial, Isabel, Arildo, Marli Miriam e Selma.

À bibliotecária Marlene pelas indispensáveis orientações.

A todos os colegas, fundamentais para o meu aprimoramento em todos os sentidos, mas em especial, Gisely, Fátima, Andréia, Tânia e Lúcia.

Aos queridos João Carlos e Mara Lane, cujas orientações e convicções foram e continuarão sendo fundamentais, não somente para o desenvolvimento deste, mas de futuros trabalhos.

“A única finalidade da educação deve consistir em preparar indivíduos que pensem e ajam como indivíduos – independentes e livres”.

(Albert Einstein)

“Não se pode ensinar alguma coisa a alguém; pode-se apenas auxiliar a descobrir por si mesmo.”

(Galileu-Galilei)

RESUMO

As sementes de *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (guaraná), planta nativa da região amazônica, são empregadas popularmente como estimulante das funções cerebrais, afrodisíaco, tônico, diurético, sedativo, entre outros fins. Análises químicas e físico-químicas das sementes demonstraram a presença de cafeína, teobromina e teofilina, taninos condensados (flavan-3-ol e procianidinas), saponinas, açúcares, gordura, resina, minerais, óleos essenciais e fixos. Técnicas analíticas foram padronizadas para o controle de qualidade do extrato bruto (EBPC), da fração semipurificada (EPA) e do granulado (GRA) obtidos das sementes torradas e moídas do guaraná. O método analítico quantitativo empregado para determinação de teores de metilxantinas e polifenóis totais apresentou linearidade, especificidade, sensibilidade, exatidão e precisão. A droga vegetal (DV) utilizada preencheu os requisitos preconizados pela Farmacopéia Brasileira. O rendimento obtido de EBPC foi de 14,86 % e 5,83 % de fração EPA. O teor de extrativos foi de 26,83 % \pm 0,96 e resíduo seco de 23,71 % \pm 1,38. Os teores de taninos totais encontrados foram de: 4,42 % \pm 0,10 para a DV; 17,17 % \pm 0,69 para EBPC; 17,53 % \pm 0,37 para EPA e 11,84 % \pm 0,23 para o GRA. Os teores de metilxantinas foram: 6,93 % \pm 0,11 para DV; 28,01 % \pm 0,71 para EBPC; 34,95 % \pm 0,99 para EPA e 25,88 % \pm 0,12 para o GRA. Testes tecnológicos preliminares do granulado demonstraram facilidade de liberação dos marcadores, cafeína e taninos, bem como, condições favoráveis para processo de envase e/ou compressão.

Palavras-chave: Controle de qualidade de extratos, Granulado, Metilxantinas, *Paullinia cupana*, Polifenóis totais.

ABSTRACT

Development and technological characterization of extracts and of the granulated of *Paullinia cupana* H.B.K. var. *sorbilis* (Mart.) Ducke (Guaraná)

Seeds from *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (guaraná), a plant native to Amazonia, are popularly used as a brain-function stimulant, aphrodisiac, tonic, diuretic, and sedative, among others. Chemical and physic-chemical analyses demonstrated the presence of caffeine, theobromine, theophylline, condensed tannins (flavan-3-ol and procyanidins), saponins, fats, resin, sugars, minerals, fixed and essential oils in these seeds. Analytical techniques were standardized to control the quality of the crude (EBPC), semi-purified (EPA), and granular (GRA) extracts obtained from dried and crushed guaraná seeds (DV). The quantitative analytical method used to determine the total contents of methylxanthines and polyphenols showed linearity, specificity, sensitivity, accuracy and precision. The plant drug (DV) satisfied the requirements established by the Brazilian Pharmacopeia. The yields from the EBPC and the EPA were 14.86 % and 5.83 % respectively. The contents of the extracts and the dry residue were 26,83 % \pm 0.96 and 23.71% \pm 1.38 respectively. The total tannin contents were 4.42 % \pm 0.10 for the DV, 17.17 % \pm 0.69 for the EBPC, 17.53 % \pm 0.37 for the EPA and 11.84 % \pm 0.23 for the GRA. The methylxanthine contents were 6.93 % \pm 0.11 for the DV, 28.01 % \pm 0.71 for the EBPC, 34.95 % \pm 0.99 for the EPA and 25.88 % \pm 0.12 for the GRA. Preliminary technological tests of the granulated form (GRA) showed that the marker substances were easily released, and that this form is suitable for packaging or compressing.

Keywords: Granules, Methylxanthines, *Paullinia cupana*, Quality control of extracts, Total polyphenols

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Sementes de <i>Paullinia cupana</i> var. <i>sorbilis</i>	18
2	Esquema geral de granulação.....	25
3	Curvas de retenção e de passagem da matéria-prima vegetal de <i>Paullinia cupana</i>	45
4	Curvas de retenção e passagem do granulado da fração semi-purificada de <i>Paullinia cupana</i>	52
5	Evolução da perda por dessecação do granulado obtido da fração semi-purificada de <i>Paullinia cupana</i> nos tempos: 05/07/2004(1), 23/08/2004(2) e 10/02/2005(3).....	53
6	Perfil de dissolução do granulado de <i>Paullinia cupana</i>	56
7	Relação entre percentual de polifenóis totais cedido e não cedido do granulado.....	56
8	Curva de calibração do pirogalol (740 nm).....	59
9	Curva de calibração do pirogalol (691 nm).....	60
10	Curva de calibração da cafeína.....	62
11	Espectro de varredura da fração semi-purificada.....	64
12	Espectro de varredura do granulado	64
13	Curva de calibração da fração semi-purificada.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	Análise granulométrica por tamisação da droga vegetal.....	45
2	Determinação do resíduo seco das sementes de <i>Paullinia cupana</i>	46
3	Caracterização do pó das sementes de <i>Paullinia cupana</i> var. <i>sorbilis</i> ..	48
4	Caracterização do extrato bruto EBPC e da fração EPA obtidos das sementes de <i>Paullinia cupana</i> var. <i>sorbilis</i>	50
5	Análise granulométrica por tamisação do granulado obtido da fração EPA.....	52
6	Caracterização do granulado obtido da fração EPA das sementes de <i>Paullinia cupana</i> var. <i>sorbilis</i>	54
7	Comparação das características tecnológicas do granulado de <i>Paullinia cupana</i> e do granulado do PSN de <i>Phyllanthus niruri</i> L.....	55
8	Teores de polifenóis totais obtidos da dissolução do granulado de <i>Paullinia cupana</i> var <i>sorbilis</i>	55
9	Caracterização físico-química e tecnológica dos adjuvantes farmacêuticos.....	57
10	Valores de absorvância obtidos da curva de calibração de pirogalol (740 nm).....	59
11	Valores de absorvância obtidos da curva de calibração de pirogalol (691 nm).....	59
12	Valores experimentais obtidos do teste de recuperação do pirogalol na fração EPA.....	61
13	Valores de absorvância obtidos da curva de calibração da cafeína.....	62
14	Valores experimentais obtidos do teste de recuperação da cafeína na fração EPA.....	63
15	Valores de absorvância obtidos da curva de calibração da fração EPA	65
16	Valores experimentais obtidos do teste de recuperação da fração EPA no granulado	66
17	Índices obtidos na validação dos métodos de quantificação de cafeína e polifenóis totais.....	66

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma	Página
1 Preparação dos extratos e do granulado a partir das sementes secas de <i>Paullinia cupana</i> var. <i>sorbilis</i>	49

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AMBEV	Companhia de Bebidas das Américas
C	Compactabilidade
CV	Coefficiente de variação
db	Densidade bruta
dc	Densidade de compactação
DIN	Deutsches Institute für Normung
EBPC	Extrato bruto de sementes de <i>Paullinia cupana</i>
ED	Eficiência de dissolução
EPA	Fração semipurificada de <i>Paullinia cupana</i>
FAD	Fração residual aderida
FAQ	Fração aquosa
FD	Fator de diluição
FH	Fator de Hausner
GRA	Granulado
IC	Índice de compressibilidade
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
PNA	Polifenóis não adsorventes
PPD	Perda por dessecação
PSN	Produto seco nebulizado
PT	Polifenóis totais
RS	Resíduo seco
SM	Solução mãe
TE	Teor de extrativo
TT	Taninos totais

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	ASPECTOS GERAIS.....	17
2.2	ASPECTOS QUÍMICOS.....	19
2.3	ASPECTOS FARMACOLÓGICOS E TOXICOLÓGICOS.....	19
2.4	ASPECTOS TECNOLÓGICOS.....	21
2.4.1	Métodos Extrativos	21
2.4.2	Métodos de Secagem	22
2.4.3	Métodos de Granulação	24
2.4.4	Métodos Analíticos Quantitativos	26
3	OBJETIVOS	29
4	MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1	MATERIAL.....	30
4.1.1	Matérias-primas	30
4.1.2	Aparelhos e equipamentos	30
4.1.3	Reagentes, solventes, soluções e outras matérias-primas	31
4.1.4	Substâncias de referência	32
4.2	MÉTODOS.....	33
4.2.1	Caracterização da matéria prima vegetal	33
4.2.1.1	Análise granulométrica da droga vegetal	33
4.2.1.2	Determinação da perda por dessecação	33
4.2.1.3	Determinação do teor de extrativos	33
4.2.1.4	Determinação do teor de cinzas totais	34
4.2.1.5	Determinação do teor de taninos totais	32
4.2.1.6	Determinação do teor de metilxantinas.....	33
4.2.2	Obtenção e caracterização dos extratos EBPC e fração EPA	36
4.2.2.1	Obtenção dos extratos.....	36
4.2.2.2	Análise em cromatografia em camada delgada.....	36
4.2.2.3	Determinação do resíduo seco	37
4.2.2.4	Determinação da perda por dessecação.....	37
4.2.2.5	Determinação do pH.....	37

4.2.2.6	Determinação do teor de taninos totais.....	37
4.2.2.7	Determinação do teor de metilxantinas.....	37
4.2.3	Obtenção e caracterização do granulado.....	38
4.2.3.1	Obtenção do granulado.....	38
4.2.3.2	Análise granulométrica.....	38
4.2.3.3	Determinação da perda por dessecação.....	38
4.2.3.4	Determinação do teor de taninos totais.....	38
4.2.3.5	Determinação do teor de metilxantinas.....	38
4.2.3.6	Determinação do pH.....	39
4.2.3.7	Determinação das densidades bruta e de compactação.....	39
4.2.3.8	Determinação do fator de Hausner e índice de compactabilidade e compressibilidade.....	39
4.2.3.9	Perfil de dissolução.....	40
4.2.4	Caracterização dos Adjuvantes Farmacêuticos.....	40
4.2.4.1	Determinação do pH.....	40
4.2.4.2	Determinação da perda por dessecação.....	40
4.2.4.3	Determinação das densidades bruta e de compactação.....	40
4.2.4.4	Determinação do fator de Hausner e índice de compactabilidade e compressibilidade.....	41
4.2.5	Validação do método espectrofotométrico para determinação do teor de polifenóis totais e cafeína na fração EPA e no granulado de <i>Paullinia cupana</i>.....	41
4.2.5.1	Curva de calibração do pirogalol e teste de recuperação.....	41
4.2.5.2	Curva de calibração da cafeína e teste de recuperação	42
4.2.5.3	Curva de calibração da fração EPA e teste de recuperação.....	42
4.2.6	Métodos Estatísticos.....	43
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
5.1	CARACTERIZAÇÃO DA DROGA VEGETAL.....	44
5.2	CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS.....	48
5.3	CARACTERIZAÇÃO DO GRANULADO.....	50
5.4	CARACTERIZAÇÃO DOS ADJUVANTES USADOS NOS PROCESSOS DE OBTENÇÃO DO GRANULADO.....	57

5.5	VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS ANALÍTICOS QUANTITATIVOS EMPREGADOS NO CONTROLE DE QUALIDADE.....	58
5.5.1	Determinação do teor de Polifenóis Totais.....	58
5.5.1.1	Curva de calibração do pirogalol.....	58
5.5.1.2	Teste de recuperação.....	61
5.5.2	Determinação do teor de Metilxantinas.....	61
5.5.2.1	Curva de calibração da cafeína.....	62
5.5.2.2	Teste de recuperação.....	63
5.5.3	Curva de calibração da fração EPA.....	63
6	CONCLUSÕES.....	67
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68
	ANEXOS.....	76

1 INTRODUÇÃO

O uso popular de plantas para fins terapêuticos é uma prática antiga que tem sido incrementada por diversas razões: quer seja pelo difícil acesso da população aos serviços de saúde e medicamentos de um modo geral, ou ainda, pela crença de que produtos naturais representam uma terapêutica de melhores resultados e poucos efeitos adversos (CALIXTO, 2000).

Embora algumas plantas de uso medicinal possuam comprovação de seu efeito farmacológico, poucos parâmetros se têm a respeito de especificações técnicas que definam sua qualidade. Este fato tem sido percebido pela comunidade científica e se reflete em estímulos, de iniciativas, provindos de órgãos governamentais ou não, que contribuem para comprovar a eficácia, a ausência de efeitos tóxicos, o atendimento às especificações, ou seja, a qualidade dos fitoterápicos atualmente disponíveis no mercado (MCT- Chamada CNPq-08/2001).

No início da década passada, a Organização Mundial da Saúde (OMS) já apontava um roteiro básico para analisar a qualidade de plantas medicinais (WHO, 1992). Atualmente, a importância do tema é referenciada na RDC 48 de 16/03/2004 - ANVISA, com o estabelecimento de requisitos indispensáveis para o registro de fitoterápicos (BRASIL, 2004)

O controle da qualidade da matéria-prima (droga vegetal), dos produtos intermediários (derivado de droga vegetal), bem como dos produtos tecnologicamente acabados (fitoterápico), é decisivo na garantia da eficácia e segurança do tratamento, refletindo no binômio custo-benefício.

Neste contexto, o guaraná, objeto deste estudo, consta de monografia na quarta edição da Farmacopéia Brasileira com especificações para o controle da qualidade do pó de suas sementes.

Entre as drogas vegetais da biodiversidade brasileira, o guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) é empregado popularmente como estimulante das funções cerebrais, afrodisíaco, tônico, diurético, febrífugo, sedativo, assim como no tratamento da enxaqueca, blenorragia, epilepsia, flatulência, entre outros (CORRÊA, 1984).

O Brasil é, praticamente, o único produtor de guaraná no mundo. Sua produção tem se expandido da Amazônia brasileira para os estados do Pará, Acre, Rondônia e, nos últimos anos, para o Mato Grosso e Bahia (SUFRAMA, 2003).

Em 1980, a produção era de 440 toneladas e hoje é estimada em torno de 4.300 toneladas/ano (TEIXEIRA, 1983; SUFRAMA, 2003). No entanto, devido à sua significativa

exploração econômica, a produção não atende a demanda o que torna constante o risco de adulterações.

A grande importância econômica do guaraná está relacionada com o uso em bebidas. Somente a AMBEV (titular das marcas Antartica e Brahma) absorve 70 % do guaraná em sementes anualmente produzido em Maués, AM. O restante de toda a produção é destinado à indústria de fitofármacos (30 %) e à exportação, principalmente para o Japão e Estados Unidos (SUFRAMA, 2003).

O guaraná, cuja produção e comercialização são regulamentadas pela portaria 70/82 do Ministério da Agricultura (BRASIL, 1982), foi escolhido para estudo de sequenciamento genético, coordenado pelo prof. Spartco Astolfi da Universidade Federal do Amazonas. (MCT/CNPq, 2001), corroborando a importância econômica deste vegetal.

Assim sendo, embora já existam especificações para a qualidade da droga vegetal em monografias, como na Farmacopéia brasileira (2003), denota-se a necessidade de padronização de métodos de controle de qualidade que possam comprovar a qualidade dos produtos intermediários permitindo a obtenção de um produto final seguro e eficaz.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ASPECTOS GERAIS

O guaraná (*Paullinia cupana*) pertence à família Sapindaceae. Típico da região amazônica, é conhecido pelos índios como “uaraná”. Sua utilização, para diversos fins, pelas tribos indígenas Maués e Mandacarus, remonta à época anterior ao descobrimento do Brasil (HENMAN, 1982).

São descritas duas variedades desta espécie: variedade *sorbilis*, considerado o guaraná verdadeiro do Brasil, crescendo no baixo Amazonas, e *typica*, do alto Orenoco, chamado de cupana e yoco na Colômbia e Venezuela (CORREA, 1984).

O guaranazeiro floresce nos meses mais secos e o amadurecimento de seus frutos ocorre dois a três meses depois. A colheita é feita, em média, durante cinco vezes ao ano, manualmente, coletando-se somente os frutos abertos de 2 em 2 dias ou cortando-se os cachos inteiros que já apresentam mais da metade dos frutos abertos e com coloração avermelhada, como pode ser observado na figura 1 (SUFRAMA, 2003).

Os índios Maués preparam a pasta de guaraná retirando as partes moles dos frutos maduros (figura 1) que dispõem em pequenas camadas, em local limpo, para secarem rapidamente, sem fermentar. Em forno próprio as sementes são torradas em calor regular e freqüentemente remexidas. Depois de torradas, as sementes são transferidas para um saco onde recebem vigorosas batidas, para separação do tegumento. As sementes limpas são transferidas para pilão de madeira, previamente aquecido, e reduzidas a pó fino. Ao pó adiciona-se água para formar a pasta que é moldada em cilindros, pães ou figuras de aspectos variados. Então, com as rasas desta pasta são preparadas bebidas estimulantes para serem utilizadas em ocasiões de festas ou combates (CORREA, 1984).

Além das aplicações citadas, outras utilizações já foram relatadas na literatura como: no tratamento da disenteria, arteriosclerose, nevralgia, leucorréia, enxaqueca, epilepsia, flatulência, entre outras (CORRÊA, 1984; DUKE, 1985; HENMAN, 1982).

Efeitos no sistema nervoso central, tais como, hiper-excitação, tremor, ansiedade, irritabilidade, insônia e hipertermia, têm sido relatados devido a altas doses de guaraná (CASTLEMAN, 1991; DUKE, 1985). Disúria é outro efeito frequentemente produzido pelo uso do guaraná (DUKE, 1985). O guaraná é contra-indicado para pacientes com hipertensão e problemas cardíacos (GRIEVE, 1967).

O guaraná tem sido indicado como suplemento alimentar, incorporado aos produtos dietéticos, associado à soja ou à espirulina, usado como supressor do apetite (CRELLIN; PHILPOTT, 1990).

O guaraná está disponível para a indústria alimentícia na forma de pó, extrato, tintura ou xarope, flexibilizando, desta maneira, sua formulação. O xarope, em particular, se presta à utilização em bebidas alcoólicas e é usado como flavorizante em licores na América Latina (DUKE, 1985). Os extratos têm sido utilizados como flavorizantes em algumas preparações farmacêuticas (BRIGGS, 1992).



Figura 1 - Frutos maduros do guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*)

Foto: João Carlos Palazzo de Mello

2.2 ASPECTOS QUÍMICOS

A primeira análise química de *Paullinia cupana* de que há conhecimento foi publicada em 1826 por Theodor von Martius, o qual retirou das sementes uma substância branca, amarga, cristalizada em agulhas e que possuía notável ação fisiológica. A este composto denominou de guaranina (CAGNO, 1942).

Em 1840, Berthemot e Deschastelus, após análises mais detalhadas, concluíram que a guaranina nada mais era do que a cafeína, haja vista as referidas substâncias apresentarem as mesmas características, inclusive, ponto de fusão (BEMPONG et al., 1993).

Estudos com técnicas modernas de análise mostraram que o composto predominante no guaraná é, de fato, a cafeína (HENNAN, 1982; CORRÊA, 1984; BEMPONG et al., 1993; CARLSON; THOMPSON, 1998). A cafeína foi encontrada nas sementes, flores, folhas, troncos e raízes de *Paullinia cupana*, enquanto que a teobromina foi encontrada nas flores, folhas e tronco e a teofilina não foi detectada nestas partes (CORRÊA, 1984). Entretanto, teobromina e teofilina foram observadas nas sementes do guaraná (MARAVALHAS, 1965; CARLSON; THOMPSON, 1998).

Outras substâncias descritas para o guaraná são: taninos, saponinas (CARLSON; THOMPSON, 1998; MARX, 1990), polissacarídeos, dissacarídeos, gordura, resina, substâncias mucosas, minerais, água, óleos essenciais, ácido nicotínico, colina e alcalóides (LIST; HORHAMMER, 1977). Glicose, frutose e sacarose estão presentes no arilo da semente (BAUMANN et al., 1995).

Entre os taninos foram encontrados os condensados (proantocianidinas) e precursores de taninos (prototaninos), não sendo detectados taninos hidrolisáveis (NIERENSTEIN, 1922; MARX, 1990; ANDRADE, 1996; CARLSON; THOMPSON, 1998; USHIROBIRA, 2003).

Quanto aos óleos essenciais, vários componentes foram identificados, entre eles: metilbenzenos, monoterpenos e sesquiterpenos cíclicos, metoxifenilpropenos e derivados dos alquilfenóis (BENONI et al., 1996).

2.3 ASPECTOS FARMACOLÓGICOS E TOXICOLÓGICOS

A cafeína, principal responsável pelas atividades farmacológicas do guaraná, é um estimulante suave e é o psicoativo mais amplamente utilizado no mundo. Aumenta a excreção de nor-epinefrina e a atividade neural em numerosas áreas cerebrais. É absorvida no trato

gastrointestinal, sendo rapidamente distribuída por todos os tecidos, podendo atravessar com facilidade a barreira placentária. Muitos dos efeitos da cafeína parecem ocorrer por antagonismo competitivo dos receptores de adenosina, que é um neuromodulador que influencia várias funções no sistema nervoso central. Pessoas que ingerem cafeína, ou bebidas que a contenha, geralmente experimentam menos letargia, menos fadiga e um fluxo de pensamento mais claro e mais rápido. Entretanto, tarefas que exijam coordenação muscular delicada (movimentos finos), ou habilidade aritmética podem ser adversamente afetadas. Se a dose é aumentada, são observados sinais de progressiva estimulação do sistema nervoso central, incluindo nervosismo ou ansiedade, inquietude, insônia, tremores e hiperestesia. Em doses ainda maiores surgem convulsões generalizadas e em foco (BLOOM, 1996; O'BRIEN, 1996).

Os efeitos sobre a agregação plaquetária do extrato aquoso de *Paullinia cupana* e suas frações foram estudados *in vivo* e *in vitro*. Este estudo mostrou que o extrato aquoso do guaraná tem ação anti-agregante e desagregante sobre plaquetas (BYDLOWSKI et al., 1988).

Outro estudo demonstrou que o extrato aquoso diminui a formação de tromboxana, fato este que poderia explicar, de certa forma, a atividade inibitória da agregação plaquetária, citada anteriormente. Este extrato foi fracionado por cromatografia em camada delgada na tentativa de identificação da substância ativa. Ácido nicotínico e xantinas, principalmente a cafeína, parecem ser parcialmente responsáveis pelos efeitos observados, porém há evidências da presença de outros compostos com a mesma atividade antiplaquetária que ainda não foram identificados (BYDLOWSKI et al., 1991).

Extratos aquosos de amostras comerciais de guaraná foram analisados quanto às atividades genotóxica e mutagênica em células bacterianas. Os extratos mostraram-se genotóxicos por indução lisogênica em *Escherichia coli* e capazes de induzir mutagênese em *Salmonella typhimurium*. Porém a adição de catalase, super-óxido dismutase ou tiouréia à fração microsomal S9 neutralizou a atividade genotóxica do guaraná, sugerindo que espécies reativas de oxigênio exercem um papel essencial na genotoxicidade dos extratos aquosos (FONSECA et al., 1994).

Galduróz e Carlini (1994) verificaram os efeitos agudos do guaraná sobre cognição, ansiedade e sono em voluntários normais com idade entre 20 e 35 anos utilizando teste duplo cego. Não houve qualquer diferença significativa entre os grupos que receberam placebo, cafeína ou guaraná. Em estudo posterior, os mesmos autores, em 1996, verificaram o efeito da administração crônica (150 dias) do guaraná em voluntários idosos sob os mesmos parâmetros

comportamentais e, tanto o guaraná como a cafeína, não produziram alterações significativas em relação ao controle.

A administração oral crônica de uma suspensão de guaraná produziu um aumento significativo na performance física de camundongos submetidos ao nado forçado. Este efeito não foi verificado com a cafeína ou controle. Também se observou uma reversão parcial da amnésia provocada pela escopolamina com a administração aguda e crônica de guaraná ou de cafeína, indicando um efeito positivo na aquisição de memória (ESPÍNOLA et al., 1997).

Mattei et al. (1998) demonstraram efeito antioxidante do pó das sementes do guaraná, inibindo o processo de peroxidação lipídica em baixas concentrações e ausência de toxicidade ao examinar cortes histopatológicos em ratos.

Ushirobira (2003) relatou atividade antioxidante e uma possível hepatotoxicidade subcrônica em ratos, em testes realizados com uma fração semipurificada das sementes do guaraná.

Testes de indução de toxicidade de extrato aquoso de guaraná em células bacterianas e células de ovário de hamster chinês sugeriram que a concentração tem importância crítica na citotoxicidade e altas doses podem ser nocivas para a saúde humana (SANTA MARIA et al., 1998).

O extrato aquoso do guaraná aumentou o nível de glicose no sangue de camundongos, diminuiu o nível de glicogênio hepático e suprimiu a hipoglicemia induzida por exercícios indicando a existência de um mecanismo de supressão da hipoglicemia às custas de glicogênio (MIURA et al., 1998).

Mais recentemente, Audi et al. (2004) avaliaram a atividade farmacológica de duas frações de extrato das sementes de guaraná (EBPC e EPA) sobre ratos, onde observaram um decréscimo do tempo de imobilidade similar ao uso da imipramina, empregada como droga de referência. Os resultados obtidos neste estudo indicam que o uso crônico destes extratos mostra um efeito antidepressivo.

2.4 ASPECTOS TECNOLÓGICOS

2.4.1 Métodos extrativos

A escolha dos métodos e os meios extrativos dependem da solubilidade e da estabilidade das substâncias que se deseja extrair. Geralmente utilizam-se misturas hidroetanólicas em proporções variadas (VOIGT, 1993).

Os alcalóides, geralmente presentes na forma de sais, podem ser extraídos com solventes hidrófilos ou com solventes lipófilos (éter, clorofórmio, cloreto de metileno), transformando o sal em forma básica. Se estes estiverem ligados a taninos ou ácidos cujos sais sejam dificilmente solúveis, pode-se torná-los solúveis, adicionando um excesso de ácido adequado (SONAGLIO et al., 2001).

Têm sido relatados para o guaraná, principalmente para extração da cafeína, o uso de solventes orgânicos, como: éter etílico e clorofórmio em soxhlet (SIMÃO et al., 1984), solução aquosa ácida aquecida sob refluxo por 15 min (BELLIARDO et al., 1985), clorofórmio e solução alcalina com agitação constante (CHAAR, 1990), mistura de diclorometano e metanol (BEMPONG et al., 1993), etanol e dióxido de carbono supercrítico (SALDANA et al., 2002), entre outros.

Os taninos são facilmente solúveis em água, acetona e acetato de etila. Em solução aquosa podem apresentar-se como colóides micelares. Os álcalis, os ácidos, o oxigênio, a luz e o calor degradam os taninos. Para extração e purificação, emprega-se acetona:água. O extrato é submetido à partição líquido-líquido com acetato de etila e *n*-butanol, concentrando-se sob pressão reduzida com eliminação do solvente orgânico e seguida de liofilização para manutenção da estabilidade (MELLO; SANTOS, 2001).

Além dos solventes, o método de extração leva em consideração outros dois aspectos: a temperatura e a agitação empregadas no processo extrativo. Uma combinação de agitação e elevação da temperatura pode melhorar o rendimento e diminuir o tempo de extração, porém, o aquecimento em excesso pode degradar alguns compostos ativos (VOIGT, 1993).

A faixa granulométrica da droga deve ser fixada visto que um pó mais fino permite uma maior superfície de contato com o meio solvente, promovendo uma extração mais eficaz, porém, uma elevada tenuidade pode dificultar a posterior separação (VOIGT, 1993).

2.4.2 Métodos de secagem

Secagem significa a remoção do(s) solvente(s), produzindo um pó ou uma massa friável, dependendo do processo empregado. Geralmente os métodos de secagem utilizam o calor, promovendo a evaporação dos solventes, mas podem também utilizar o congelamento sob pressão reduzida, ou ainda a energia das microondas, dependendo das características de termolabilidade e quantidade do material (LIST; SCHMIDT, 1989).

A técnica de *spray-drying* (secagem por aspersão) tem sido vastamente utilizada na pesquisa e desenvolvimento de formas farmacêuticas.

Esta técnica é uma operação de secagem que consiste em dispersar o líquido a secar em finas gotículas no interior de uma câmara provida de corrente de ar quente. O solvente é evaporado instantaneamente, resultando na obtenção de massa seca pulveréa. Sua importância na indústria de fitoterápicos deve-se principalmente ao baixo custo quando comparada a outras técnicas, como a liofilização, e ao baixo risco de degradação de constituintes devido ao curto período de tempo de contato do fluido de alimentação com a fonte de calor (CASADEBAIG et al., 1989; CAMPOS, 1996).

Os produtos secos por aspersão podem apresentar-se na forma de partículas esféricas ocas com distribuição granulométrica uniforme (DE SOUZA, 1997), porém, de aspectos farmacotécnicos pobres (PAGLIARUSSI, 1999; COUTO, 2000).

Na preparação de extratos vegetais secos por aspersão, podem ser utilizados adjuvantes minerais, como o fosfato tricálcico e o dióxido de silício coloidal, e orgânicos, como lactose, glicose, amido, goma arábica, entre outros. O dióxido de silício coloidal (Aerosil® 200) tem sido amplamente utilizado (CARVALHO, 1997; DE SOUZA, 1997; SOARES, 1997; HEBERLÉ, 2000; ZÉTOLA, 2000; CARDOSO, 2002) devido à elevada pureza, inércia química, além de ser considerado essencialmente não tóxico e não irritante para uso oral ou tópico (KIBBE, 2000). Dada à sua elevada superfície específica, apresenta vantagens sobre os outros adjuvantes, pois, ao adsorver as partículas em solução extrativa, diminui a superfície exposta das mesmas, minimizando a aderência do produto na câmara de secagem durante a exposição das gotículas ao calor, sendo o produto, menos sensível à umidade e de melhores propriedades de fluxo em relação à secagem da solução extrativa isolada (CASADEBAIG et al., 1989).

Quando a temperatura se torna condição limitante, pode-se lançar mão do processo de liofilização. O material é inicialmente congelado e depois sujeito, sob pressão reduzida, ao calor moderado, fazendo com que o líquido congelado sublima e deixe um resíduo constituído pelos componentes secos do líquido original. O produto é facilmente reconstituído, porém, é um método que consome muita energia e tempo, não sendo normalmente usado na preparação de formas farmacêuticas (LIEBERMAN et al., 2001).

O aumento do custo da energia provocou um grande interesse na secagem por microondas que atuam diretamente sobre o solvente, tornando o uso de energia mais eficiente e permitindo uma secagem rápida. A secagem por microondas sob pressão reduzida, a temperaturas moderadas (30 a 40 °C) pode ser usada para a secagem de materiais termolábeis, tais como, vitaminas, enzimas, proteínas e aromas (LIST; SCHMIDT, 1989).

Contudo, os extratos secos assim obtidos são muito volumosos, possuindo aspecto reológico pobre, dificultando o enchimento de cápsulas, assim como, a realização de compressão direta. Desta maneira, precisam ser granulados, servindo como forma intermediária na manufatura de medicamentos (LIST; SCHMIDT, 1989).

Pagliarussi (1999) utilizou como sistema de secagem para o extrato aquoso de guaraná, secador em leito de jorro, constatando que as diversas condições de temperatura, vazão de ar e vazão de extrato empregadas no procedimento não alteraram, de forma significativa, o teor de cafeína nos extratos. No entanto, destaca que o extrato seco assim obtido não apresenta qualidades farmacotécnicas adequadas, sugerindo o tratamento com adjuvantes como a sílica.

2.4.3 Métodos de granulação

A granulação tem por objetivo agregar partículas de pós amorfos ou cristalinos.

Esta ação implica na diminuição da superfície específica do material, promovendo uma melhor estabilidade diante da umidade do meio ambiente, bem como, a melhora dos aspectos de fluxo (MARSHALL, 2001).

As metodologias de granulação podem ser classificadas segundo as ações tecnológicas ou quanto ao agente de aglutinação empregado. De acordo com esquema da figura 2, a granulação por desagregação conduz à obtenção de uma massa que será dividida em grânulos, enquanto a granulação por agregação leva à formação direta do granulado. O processo pode ser realizado através da ação de um meio líquido aglutinante, ou ainda, vapores de solvente, promovendo a adesão das partículas, razão pela qual é denominado de granulação por via úmida (LE HIR, 1997). Outra possibilidade é a granulação por via seca, a qual é adequada para substâncias sensíveis à temperatura e à umidade e pressupõe uma compactação prévia do material.

A literatura descreve alguns exemplos de granulação de materiais vegetais com emprego da via úmida (ZANIN et al., 2000), bem como, por via seca (SOARES, 1997; COUTO, 2000; HEBERLÉ, 2000; ZÉTOLA, 2000).

A escolha e a concentração dos adjuvantes empregados influenciam as características físicas, físico-químicas e tecnológicas dos grânulos obtidos de modo a refletir o sucesso do processo de seleção da forma farmacêutica final.

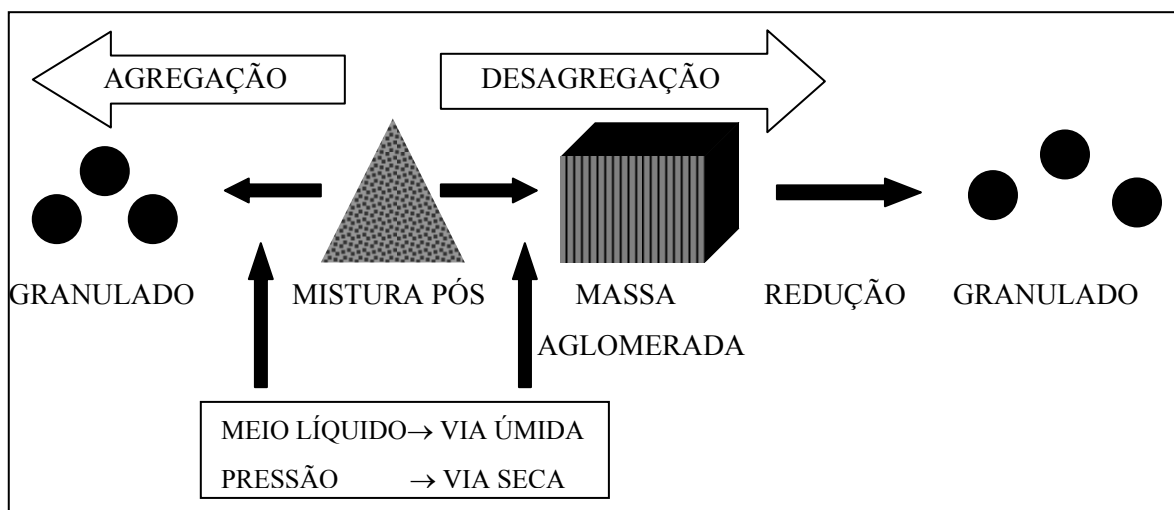


Figura 2 - Esquema geral da granulação adaptado (PETROVICK¹, 2000 apud COUTO, 2000)

Outro aspecto a ser analisado é o perfil de dissolução da forma farmacêutica que implica na capacidade de cedência dos princípios ativos para o meio de dissolução.

Os testes de dissolução *in vitro* medem a velocidade e extensão de dissolução da droga em meio aquoso na presença de um ou mais excipientes contidos no produto (SHARGEL; YU, 1993). A associação de adjuvantes farmacotécnicos pode influenciar a capacidade de liberação do fármaco ou princípios terapêuticos da forma farmacêutica ao meio (ANSEL, 1999).

De acordo com Banker e Anderson (2001), com o desenvolvimento dos testes de dissolução *in vitro* pretende-se atingir dois objetivos: 1) que a liberação do fármaco a partir da forma farmacêutica seja tão completa quanto possível e, 2) que a velocidade de dissolução do fármaco seja uniforme de lote para lote e idêntica aos lotes que demonstraram uma biodisponibilidade e efeito clínico adequados.

Existem diferentes tipos de equipamentos e protocolos para o teste de dissolução. A escolha entre um e outro deve ser baseada no tipo de produto a ser testado, assim como, deve ter uma correlação com o perfil de absorção da droga no organismo (SHARGEL; YU, 1993). E neste sentido, segundo estes autores, uma velocidade mais lenta de agitação é mais próxima ao padrão de dissolução *in vivo*.

¹PETROVICK, P. R. **Tecnologia farmacêutica I**: polígrafo de acompanhamento. Porto Alegre: Ed. da UFRGS, 2000.

Geralmente emprega-se a água como meio de dissolução nos testes de dissolução para formas sólidas orais de liberação imediata (PIANETTI et al., 2004).

Em relação aos ensaios de dissolução para formas farmacêuticas sólidas orais, a legislação brasileira vigente, RE 310 da ANVISA de 01/09/2004 que trata da realização do estudo e elaboração de equivalência farmacêutica e perfil de dissolução, preconiza que caso não exista método de dissolução farmacopéico, os perfis de dissolução devem ser realizados em, pelo menos, três meios de dissolução diferentes, dentro da faixa de pH fisiológico.

As monografias farmacopéicas geralmente preconizam o volume do meio de dissolução em 500 ou 900 ml com agitação de 50 ou 100 rpm.

Chong-Hui Gu et al. (2003) estudaram a importância do volume do meio de dissolução utilizado em testes de dissolução para formulações de BMX-480188 mesilato. De acordo com este estudo, duas diferentes preparações, uma elaborada apenas com o sal, e a outra, com o sal associado aos adjuvantes, forneceram a mesma taxa de dissolução ao se realizar o teste com 1 l do meio de dissolução. No entanto, ao empregar um menor volume do líquido de dissolução (30 ml), observaram um aumento da taxa de dissolução para a formulação preparada em associação com adjuvantes.

De forma semelhante, Pianetti et al. (2004) avaliaram testes de dissolução de cápsulas de sulfato de indinavir conduzidos em diferentes meios e condições de agitação fixando as condições que melhor favoreceram a dissolução da droga.

2.4.4 Métodos analíticos quantitativos

A eleição de um método adequado para realização de uma análise quantitativa depende de uma série de fatores, tais como quantidade de amostra disponível, exatidão requerida, composição química da amostra, número de amostras a analisar e os recursos disponíveis.

Metodologias analíticas descritas em farmacopéias ou formulários oficiais reconhecidos pela ANVISA são consideradas validadas.

Dentre os parâmetros analíticos que devem ser considerados na validação de um método (BRASIL, 2003) estão: especificidade, linearidade, intervalo, precisão, sensibilidade, limite de detecção e quantificação, exatidão e robustez.

Especificidade é a capacidade que o método possui de medir exatamente uma substância sem ser afetado pela presença de outras.

A linearidade é a capacidade da metodologia em demonstrar que, dentro de um certo intervalo, os resultados obtidos são diretamente proporcionais às concentrações do analito na amostra. O intervalo é uma especificação dos limites superiores e inferiores de quantificação do método.

A precisão representa a concordância de uma série de medidas resultantes da aplicação repetida do método, a amostras homogêneas. Pode ser expressa através do desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação percentual (CV%). Esta pode ser considerada em três níveis: precisão intra-corrída (repetibilidade), inter-corrídas (intermediária) e inter-laboratorial (reprodutibilidade).

O limite de detecção é dado pela menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado. E o de quantificação representa a menor quantidade do analito que pode ser determinada com precisão e exatidão.

A exatidão representa a concordância entre o valor obtido e o valor verdadeiro ou esperado. Frequentemente é expressa como percentual de recuperação.

Robustez indica a confiança de um método durante o uso normal em relação a sua capacidade de resistir a pequenas variações dos parâmetros analíticos.

O método ideal é aquele que alia todos os critérios relacionados anteriormente com o baixo custo operacional, possibilitando sua aplicação em análises de rotina.

A literatura relata vários trabalhos que descrevem o desenvolvimento de metodologias analíticas para a análise dos teores de metilxantinas em plantas e seus produtos. Dentre eles, destacam-se os métodos cromatográficos e os métodos espectrofotométricos.

Cromatografia líquida de alta eficiência é uma técnica moderna, de alta especificidade e reprodutibilidade que, no entanto, requer analistas bem treinados, para o manuseio correto de equipamento caro e sofisticado (ANDRADE, 1996).

Técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência (MARX et al., 1985; BELLIARDO; MARTELLI, 1985; MARX, 1990; BEMPONG; HOUGHTON, 1992; BEMPONG et al., 1993; ANDRADE, 1999; USHIROBIRA, 2003), bem como, cromatografia gasosa (KLATSM; ZALA, 1980; KHAYYAL; AYAD, 1983; CHEN, 1987; PAGLIARUSSI, 1999) têm sido frequentemente utilizadas.

De acordo com Andrade (1996), para a determinação de teores de cafeína, os métodos de cromatografia líquida de alta eficiência e espectrofotometria no UV apresentam a mesma precisão; porém, em termos de exatidão, o primeiro produz melhores resultados. No entanto, a

autora sugere que, em razão da simplicidade, facilidade e menor tempo de execução, o doseamento de cafeína pode ser perfeitamente realizado através da espectrofotometria no UV.

Para a análise quantitativa de taninos condensados, os métodos comumente utilizados incluem reações de depolimerização oxidativa de proantocianidinas, reações do anel A com aldeído aromático e reações de oxidação-redução. Outros métodos envolvem reações de clivagem ácida, de precipitação, inibição enzimática e microbiana além de métodos gravimétricos. A dificuldade que envolve a quantificação de taninos condensados se deve à complexidade da estrutura destes compostos (SCHOFIELD et al., 2001).

O ensaio colorimétrico de Folin-Ciocalteu é uma versão do método de Folin-Denis, baseado na reação de oxidação-redução, onde o reagente fosfotúngstico-molibdico é reduzido, produzindo uma coloração azulada. No caso, o reagente é adicionado de sulfato de lítio para evitar a formação de precipitado que poderia interferir com as leituras espectrofotométricas. De acordo com Schofield et al (2001), este método é menos susceptível de interferências de compostos não fenólicos que o método original.

A Farmacopéia Brasileira (2003) descreve metodologia baseada na ligação de taninos com pó de pele, e na determinação fotométrica de complexos de coloração azul formados pela redução do reagente fosfotúngstico com leitura em 691 nm. Andrade (1996) empregou, para o doseamento de taninos no guaraná, o método de Folin-Denis e a caseína em substituição ao pó de pele.

3 OBJETIVOS

Obtenção e caracterização química e físico-química do pó das sementes de *Paullinia cupana* var. *sorbilis*, do extrato bruto (EBPC) e da fração semipurificada EPA.

Obtenção e caracterização química, físico-química e tecnológica de forma farmacêutica intermediária.

Validação de métodos de controle de qualidade para os produtos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAL

4.1.1 Matérias-primas

As sementes de guaraná foram adquiridas do produtor Sr. José Augusto de Souza, do sítio Santa Rita, Estrada Central km 8, Lote NR 376A, Alta Floresta, MT. Foram coletadas de setembro a novembro de 2000, secas e torradas em tacho de ferro durante 1 h e enviadas à Universidade Estadual de Maringá onde foram moídas em moinho de martelos no laboratório de Farmacognosia. A identificação botânica foi realizada pela Profa. Dra. Cássia Mônica Sakuragui, Departamento de Biologia, UEM. A exsicata encontra-se depositada no Herbário da UEM sob número HUM 9065.

Adjuvantes farmacêuticos utilizados: dióxido de silício coloidal (Aerosil® 200 - Degussa) e talco farmacêutico, ambos doados pelos Laboratórios Biosintética Ltda. São Paulo, SP.

4.1.2 Aparelhos e equipamentos

Agitador mecânico circular com 60 vibrações por minuto

Agitador magnético Fisatom mod.752 A

Aparelho de ultrassom Unique USC Cleaner 1450, 25 kHz

Balança analítica AND HR-200

Balança analítica Ohaus MB-200 como sistema de secagem por infravermelho

Banho Maria Marte MB

Bomba de vácuo Ibav BRD4

Câmara de UV 254 nm Germetec

Dissolutor Erweka modelo DT6R

Espectrofotômetro UV-VIS Cary 1E Varian

Estufa de secagem e esterilização Fanem 315 SE

Evaporador rotatório Büchi mod. R – 114

Granulador FELLC

Liofilizador Christ Alpha 1-2

Moinho de martelos Tigre ASN-5
Mufla Fornitec Modelo 2.103
pHmetro digital PG 2000 Gehaka
Tamisador vibratório Produtest
Turbolizador Skymesen LSV-5
Ultra-turrax Yka modelo UTC 115KT
Volúmetro de compactação marca Erweka SVM 12

4.1.3 Reagentes, solventes, soluções e outras matérias-primas

Todos os solventes e reagentes utilizados, exceto quando especificado, possuíam grau de pureza pró-análise (p.a), das marcas Carlo Erba®, Merck®, Synth® ou Sigma®.

Acetona

Acetato de etila

Ácido acético glacial

Ácido fórmico

Ácido orto fosfórico

Água destilada

Álcool metílico

Carbonato de sódio anidro (Merk®)

Cromatofolhas de gel de sílica 60 F₂₅₄ com 0,200 mm de espessura sobre folhas de alumínio 20 x 20 cm (Merck®)

Etanol 93,6°- COCAMAR

Pó de pele R levemente cromada para determinação de taninos, Freiberg – Alemanha.

Reagente Folin-Ciocalteu - 2N - Laborclin

Solução de ácido sulfúrico 2,5% (v/v)

Solução de carbonato de sódio 14,06%

Solução etanólica de cloreto férrico 1%

Soluções tampão pH 7,0 e 4,0 – Digimed

Sulfato de sódio anidro

4.1.4 Substâncias de referência

Além do pirogalol (Merck), foram empregadas as substâncias, catequina, epicatequina e cafeína isoladas e identificadas por Ushirobira (2003) no laboratório de Farmacognosia da UEM, sob a responsabilidade do prof. Dr. João Carlos P. de Mello.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Caracterização da matéria-prima vegetal

4.2.1.1 Análise granulométrica da droga vegetal

A droga vegetal seca e moída foi submetida à análise granulométrica empregando-se um jogo de tamises de 0,840; 0,420; 0,250, 0,177 e 0,149 mm de abertura de malha. A amostra foi tamisada durante 30 min a 70 vibrações/min, utilizando-se tamisador vibratório.

Após a tamisação, procedeu-se à pesagem determinando-se a quantidade de material retido em cada um dos tamises e o resultado calculado em relação a 100 g de droga, pela média de 3 determinações (VOIGT, 1993). O diâmetro médio foi calculado de acordo com a equação (ANSEL, 2000):

$$dm = \frac{\sum (\%retida) \times (abertura \quad média)}{100}$$

4.2.1.2 Determinação da perda por dessecação

O teor de umidade foi determinado pelo método gravimétrico, empregando-se balança analítica com sistema de secagem por infravermelho.

Cerca de 5 g da droga vegetal moída foram exatamente pesadas em bandejas de alumínio taradas e desseçadas por 30 min à temperatura de 110 °C, com intervalo de 15 min entre cada determinação, tempo necessário para o resfriamento da balança. O resultado foi calculado em relação a 100 g de droga, pela média de 5 determinações (CARVALHO, 1997).

4.2.1.3 Determinação do teor de extrativos

Cerca de 1 g de pó das sementes de guaraná foi exatamente pesado e submetido a decocção com 100 g de água fervente durante 10 min. Após resfriamento o volume foi completado a 100 ml. A solução foi filtrada em papel de filtro e os primeiros 20 ml foram desprezados. Deste filtrado foi pesada uma alíquota equivalente a 20 g em placas de Petri previamente taradas, evaporadas em BM até *secura*. O resíduo foi colocado em balança dessecadora à temperatura de 110 °C até peso constante (CARVALHO, 1997). O teor de

extrativos foi calculado em massa percentual, pela média de 3 determinações segundo a equação:

$$TE = \frac{g.FD.100}{m - (m \cdot \frac{PD}{100})}$$

Onde: TE = teor de extrativos (%; m/m)
g = massa de resíduo seco (g)
m = massa da amostra (g)
FD = fator de diluição (5)
PD = perda por dessecação

4.2.1.4 Determinação do teor de cinzas totais

As amostras de pó de guaraná, colocadas em cadinhos de porcelana previamente tarados, foram incineradas em forno de mufla a 450 °C até a eliminação de todo o carvão. Após resfriamento em dessecador, as amostras foram pesadas. O resultado é proveniente de três determinações (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988).

4.2.1.5 Determinação do teor de taninos totais

Cerca de 0,750 g de droga pulverizada, exatamente pesado, foi transferido para um balão com 150 ml de água e extraído sob refluxo durante 30 min em banho-maria à temperatura de 80-90 °C. Após arrefecimento em água corrente, seu conteúdo foi filtrado e transferido para um balão volumétrico de 250 ml, lavando-se e completando-se o volume com água. Uma alíquota de cerca de 80 ml do extrato foi filtrada através de papel filtro, e desprezados os primeiros 50 ml. O filtrado obtido foi denominado Solução-Mãe (SM).

Para a determinação de polifenóis totais (PT), 5,0 ml da SM foram diluídos com água em balão volumétrico de 25 ml. Dessa solução, foram transferidos 2,0 ml para um balão volumétrico de 25 ml com 1,0 ml de solução de ácido fosfotúngstico R (Reagente Fenólico de Folin-Ciocalteu) e 10 ml de água completando-se o volume com solução de carbonato de sódio 14,06 %. Após 15 min da adição da última solução foi medida a absorvância em 691 nm, empregando-se a água como branco. Para determinação de polifenóis não adsorventes (PNA), foram tomados 10,0 ml da SM e transferidos com 0,1 g de pó-de-pele R para um béquer e agitados durante 60 min. A seguir, a solução foi filtrada e 5,0 ml do filtrado foram

diluídos com água para 25 ml em balão volumétrico. Uma alíquota de 2,0 ml desta solução foi transferida com 1,0 ml de solução de ácido fosfotúngstico R (reagente fenólico de Folin-Ciocalteu) e 10,0 ml de água para um balão volumétrico de 25 ml completando-se o volume com solução de carbonato de sódio a 14,06%. Após 15 min da adição da última solução foi medida a absorvância em 691 nm, empregando-se a água como compensação. As operações (extração e diluições) foram realizadas sob proteção de ação da luz direta (GLASL, 1983).

A porcentagem de taninos totais foi calculada segundo as fórmulas:

$$PT = \frac{AA.FD.CP}{AP \cdot \left[m - \left(m \cdot \frac{PD}{100} \right) \right]} \cdot 100 \qquad PNA = \frac{AA.FD.CP}{AP \cdot \left[m - \left(m \cdot \frac{PD}{100} \right) \right]} \cdot 100$$

$$TT = PT - PNA$$

Onde:

AA	=	absorvância amostra
AP	=	absorvância do padrão
CP	=	concentração do padrão (g/ml)
FD	=	fator de diluição
m	=	massa da droga em g
PD	=	perda por dessecação
PT	=	polifenóis totais (%)
PNA	=	polifenóis não adsorventes (%)
TT	=	teor de taninos totais (%)

4.2.1.6 Determinação do teor de metilxantinas

Cerca de 0,250 g da amostra pulverizada foi exatamente pesada e extraída com 4 porções de 20 ml de solução de ácido sulfúrico 2,5 % (v/v) sob agitação mecânica durante 15 min, filtrando-se as porções para balão volumétrico de 100 ml. Foram transferidos 10,0 ml dessa solução para balão volumétrico de 100 ml completando-se o volume com a solução de ácido sulfúrico 2,5 % (v/v). Cerca de 0,05 g de cafeína (substância de referência) foi exatamente pesada e dissolvida em 100 ml de solução de ácido sulfúrico 2,5 % (v/v). Dessa solução, foi tomada uma alíquota de 3,0 ml, equivalente a 1500,0 µg de cafeína, e transferida para balão volumétrico de 100 ml, completando-se o volume com a solução de ácido sulfúrico

2,5 % (v/v). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro em 271 nm, utilizando-se solução de ácido sulfúrico a 2,5 % (v/v), como solução de compensação (ANDRADE, 1996).

A determinação da concentração (C) de metilxantinas foi calculada pela equação:

$$C = \frac{AA \cdot CP \cdot FD}{AP \cdot \left[m - \left(m \cdot \frac{PD}{100} \right) \right]} \cdot 100$$

Onde: AA	=	absorvância da amostra
AP	=	absorvância da substância química de referência
CP	=	concentração da substância química de referência em g/ml
MA	=	massa em gramas de amostra
PD	=	perda por dessecação
C	=	teor percentual de metilxantinas na amostra
FD	=	fator de diluição

4.2.2 Obtenção e caracterização dos extratos EBPC e fração EPA

4.2.2.1 Obtenção

O extrato bruto (EBPC) foi preparado no Laboratório de Farmacognosia, obtendo-se posteriormente duas frações semipurificadas: FAQ e EPA. O protocolo de preparo dos extratos encontra-se sob sigilo de patente nº PI 0.006.638-9, publicado na RPI 1644 de 09.07.2002.

O extrato e frações foram liofilizados para a posterior realização dos testes empregados para a caracterização dos mesmos.

4.2.2.2. Análise em cromatografia em camada delgada (CCD)

A técnica de CCD foi realizada utilizando-se cromatofolhas de alumínio de gel de sílica 60 F₂₅₄ com 0,200 mm de espessura e, acetato de etila:ácido fórmico:água (90:5:5; v/v) como sistema eluente. As substâncias foram visualizadas sob luz UV em 254 nm. A revelação química foi realizada com solução de cloreto férrico a 1 % em etanol para identificação de taninos.

Para a identificação de metilxantinas, foi utilizado o mesmo sistema eluente, porém, a revelação química se fez com reagente de Dragendorff.

4.2.2.3 Determinação do resíduo seco

Foram pesados exatamente 20 g das soluções extrativas em placas de Petri previamente taradas. Após evaporação em banho de água foram submetidas à temperatura de 110 °C durante 15 min em balança dessecadora por infravermelho. Os resultados são expressos em porcentagem de resíduo seco (% m/m) pela média de 3 determinações (MELLO; PETROVICK, 2000).

4.2.2.4 Determinação do pH

Uma amostra de 0,100 g exatamente pesada foi dispersa em 10,0 ml de água destilada, procedendo-se às determinações em triplicata.

4.2.2.5 Determinação da perda por dessecação

O teor de umidade foi determinado por método gravimétrico, como descrito em 4.2.1.2 empregando-se amostras de cerca de 1,0 g exatamente pesadas.

4.2.2.6 Determinação do teor de taninos totais

Foi realizado conforme procedimento descrito em 4.2.1.5 utilizando-se cerca de 0,15 g do EBPC e 0,10 g da fração EPA exatamente pesados.

4.2.2.7 Determinação do teor de metilxantinas

Foi realizado conforme procedimento descrito em 4.2.1.6 empregando-se cerca de 0,05 g da amostra exatamente pesada.

4.2.3 Obtenção e caracterização do granulado

4.2.3.1 Obtenção do granulado

O granulado foi obtido no laboratório de Farmacotécnica a partir da fração semipurificada (EPA). Para cada 50 g da suspensão EPA foram adicionados 2 g de adjuvantes farmacotécnicos, Aerosil 200®: talco (1:1), para obtenção do granulado via úmida, com o emprego dos próprios solventes do processo de purificação como agentes aglutinantes. O granulado foi preparado em granulador com malha de 2,00 mm e seco em estufa de ar circulante a temperatura de 40 °C durante o período de 24 h. Posteriormente foi calibrado em tamis de malha 1,41 mm.

4.2.3.2 Análise granulométrica

A análise granulométrica foi realizada por tamisação empregando-se jogo de tamises de abertura de 1,41, 1,00, 0,84, 0,42 e 0,25 mm em tamisador vibratório durante 30 min a 70 vibrações/min. Os resultados foram calculados a partir da média de 3 determinações, conforme item 4.2.1.1.

4.2.3.3 Determinação da perda por dessecação

O teste foi realizado conforme procedimento descrito em 4.2.1.2, empregando-se amostras de cerca de 1 g exatamente pesadas.

4.2.3.4 Determinação do teor de taninos totais

A determinação do teor de taninos totais do granulado foi realizada segundo metodologia descrita em 4.2.1.5, empregando-se amostras de cerca de 0,7 g exatamente pesados.

4.2.3.5 Determinação do teor de metilxantinas

O teste foi realizado conforme metodologia descrita em 4.2.1.6, empregando-se amostras de cerca de 0,1 g exatamente pesadas.

4.2.3.6 Determinação do pH

O teste foi realizado como descrito para 4.2.2.2.

4.2.3.7 Determinação das densidades bruta e de compactação

O granulado foi transferido cuidadosamente para uma proveta até completar 100 ml e o seu peso tomado. Determinou-se a densidade bruta e a densidade de compactação em triplicata com auxílio de volúmetro de compactação submetendo-se as amostras a 1250 quedas, segundo norma DIN 53194. O ensaio foi repetido até que a diferença entre duas leituras subsequentes fosse inferior a 2 % (VOIGT, 1993).

As densidades bruta (db) e de compactação (dc) foram calculadas pelas equações:

$$db = \frac{Ma}{Vb} \qquad dc = \frac{Ma}{Vc}$$

Onde: Ma = massa
 Vb = volume bruto
 Vc = volume compactado

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

O fator de Hausner foi determinado através do quociente entre as densidades de compactação e bruta (HAUSNER, 1967), conforme a equação:

$$FH = \frac{dc}{db}$$

Para o cálculo do índice de compressibilidade ou índice de Carr (IC), utilizaram-se os dados obtidos para a densidade bruta e de compactação (CARR et al., 1965), segundo a equação:

$$IC = dc \frac{db}{dc} \cdot 100$$

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 volúmetro de compactação (GUYOT et al., 1995), conforme a equação abaixo:

$$C = V10 - V500$$

4.2.3.9 Perfil de dissolução

Para realização do perfil de dissolução do granulado, foi exatamente pesado cerca de 0,700 g para cada cuba do aparelho constituído de sistema de agitação por cestas, com agitação de 50 rpm, empregando-se 500 ml de água destilada à temperatura de $37 \pm 0,5$ °C como meio de dissolução. Amostras de 2,0 ml foram retiradas para determinação do teor de polifenóis totais nos tempos: 5, 10, 20, 30, 40 e 60 min. O volume retirado foi repostado com água destilada na mesma temperatura do banho (USP, 2000). Foi realizado um doseamento de polifenóis totais no granulado para servir de base de cálculo da proporção de polifenóis totais liberada para o meio de dissolução. Este ensaio foi realizado no laboratório de Controle de Qualidade do Departamento de Farmácia e Farmacologia da UEM.

4.2.4 Caracterização dos adjuvantes farmacêuticos

A caracterização dos adjuvantes farmacêuticos, dióxido de silício e talco, foi realizada de acordo com testes descritos em Farmacopéias e literatura especializada. As análises foram executadas em triplicata.

4.2.4.1 Determinação do pH

A determinação do pH da dispersão aquosa foi realizada de acordo com o item 4.2.2.2.

4.2.4.2 Determinação de perda por dessecação

A perda por dessecação foi realizada de acordo com o item 4.2.1.2.

4.2.4.3 Determinação das densidades bruta e de compactação

Realizada conforme descrito em 4.2.3.5.

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

Determinação realizada conforme descrito em 4.2.3.6.

4.2.5 Validação do método espectrofotométrico para determinação do teor de polifenóis totais e cafeína na fração EPA e no granulado de *Paullinia cupana*.

A validação da metodologia empregada para a determinação do teor de polifenóis totais e de cafeína na fração EPA e no granulado (GRA) do guaraná foi realizada de acordo com o Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos da RE 899 da ANVISA (BRASIL, 2003).

A linearidade foi determinada para as curvas de calibração obtidas da análise espectrofotométrica do pirogalol, cafeína, e da fração EPA. O intercepto e a inclinação das curvas de calibração foram determinados através da regressão linear.

O cálculo do limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foi baseado no desvio padrão do intercepto (Dpa) e na inclinação das curvas de calibração (IC), de acordo com as fórmulas:

$$LD = \frac{DPa}{IC} \cdot 3 \qquad LQ = \frac{DPa}{IC} \cdot 10$$

A precisão do método considerou o coeficiente de variação percentual (CV%) obtido da realização de 3 determinações. A exatidão foi determinada através da recuperação de quantidades adicionadas dos padrões nas frações extrativas e no granulado em 3 níveis de concentração.

4.2.5.1 Curva de calibração de pirogalol e teste de recuperação

A curva de calibração do pirogalol foi obtida a partir de solução estoque a 10 mg %. Foram preparadas 5 diluições: 0,03, 0,04, 0,05, 0,06 e 0,07 mg/ml. De cada uma delas foram retirados 2,0 ml conferindo concentrações teóricas finais de: 0,0024, 0,0032, 0,004, 0,0048, 0,0056 mg/ml, procedendo-se a técnica de quantificação de polifenóis totais conforme item 4.2.1.5. As leituras foram realizadas em 691 e 740 nm e são resultados de 3 determinações. Os resultados foram utilizados para cálculo da regressão linear e obtenção da equação da reta.

Alíquotas de 0,5, 0,75 e 1,0 ml da solução padrão de pirogalol preparada a 10 mg % foram adicionadas a 0,1 ml de uma solução de EPA preparada a 10 mg % contendo teoricamente uma concentração de 49,84 µg/ml de polifenóis totais para a determinação da porcentagem de recuperação do método. As leituras foram realizadas em 691 e 740 nm. Os valores obtidos são resultados de 3 determinações. A equação utilizada para calcular a porcentagem de recuperação foi:

$$R\% = \frac{CA - CNA \cdot 100}{CP}$$

Onde:

CA = concentração da solução adicionada

CNA = concentração da solução não adicionada

CP = concentração da substância referência

4.2.5.2 Curva de calibração da cafeína e teste de recuperação

A curva de calibração da cafeína foi construída a partir de solução estoque a 0,05 % (p/v) em ácido sulfúrico a 2,5 % (v/v). Foram preparadas 5 diluições de forma a se obter concentrações de 5,0, 10,0, 15,0, 20,0 e 25,0 µg/ml. As leituras foram realizadas em 271 nm empregando-se a solução de ácido sulfúrico a 2,5 % (v/v) como branco. Os valores obtidos são resultados de 3 determinações e foram utilizados para cálculo da regressão linear e obtenção da equação da reta.

Alíquotas de 1,0, 2,0 e 3,0 ml da solução padrão de cafeína preparada a 50 mg % em solução de ácido sulfúrico a 2,5 % (v/v) foram adicionados a 1,0 ml de uma solução de EPA preparada a 0,2 % contendo teoricamente uma concentração de 699 µg/ml de cafeína para a determinação da porcentagem de recuperação do método. As leituras foram realizadas em 271 nm contra solução de compensação de ácido sulfúrico 2,5 % (v/v). Os cálculos foram realizados empregando-se a equação descrita no item 4.2.6.1 e são resultados de 3 determinações.

4.2.5.3 Curva de calibração da fração EPA e teste de recuperação

A curva de calibração da fração EPA foi construída a partir de uma solução mãe de concentração de 3 mg %. Foram preparadas 10 diluições: de 0,06, 0,09, 0,12, 0,15, 0,18, 0,21,

0,24 0,27, 0,30 e 0,33 mg/ml, das quais foram retirados 2,0 ml e transferidos para balão de 25 ml procedendo-se à quantificação de polifenóis totais com leitura em 740 nm conforme item 4.2.1.5. As concentrações finais teóricas das diluições foram de: 0,192, 0,288, 0,384, 0,48, 0,576, 0,672, 0,768, 0,864, 0,96, 1,056 µg/ml.

Alíquotas de 0,5, 0,75 e 1,0 ml da solução padrão de EPA preparada a 3 mg % foram adicionadas a 0,1 ml de uma solução de GRA preparada a 6,25 mg % contendo teoricamente uma concentração de 39,8 µg/ml de fração EPA, o que corresponde teoricamente a 19,8 µg/ml de polifenóis totais, para a determinação da porcentagem de recuperação do método. As leituras foram realizadas em 740 nm. Os valores obtidos são resultados de 3 determinações.

4.2.6. Métodos estatísticos

Os resultados deste estudo foram avaliados estatisticamente pelos métodos: análise da variância (ANOVA), análise da regressão linear, análise de resíduos e teste “t” de Student. Em todos os casos a probabilidade usada foi $P < 0,05$ (MONTGOMERY, 1991).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA DROGA VEGETAL

Os métodos utilizados neste trabalho são relativamente simples e atendem aos requisitos exigidos na legislação.

A identificação botânica, o conhecimento do local e data de coleta da planta é, sem dúvida, o início de um trabalho que visa garantir a qualidade do produto final.

A droga vegetal, a que se refere este trabalho, também foi objeto de estudo de Ushirobira (2003), particularmente no que se refere aos aspectos fitoquímicos, farmacológicos, toxicológicos e atividade microbiológica.

Além dos aspectos mencionados acima, o método utilizado no processo de secagem da planta também deve ser informado, já que pode interferir na avaliação físico-química da droga (FARIAS, 2000; USHIROBIRA et al., 2004).

Sabe-se que a presença de umidade é um fator que favorece não somente a contaminação microbiana como também desencadeia reações enzimáticas culminando na degradação de princípios ativos. A análise da perda por dessecação determina a quantidade de água juntamente com outras substâncias voláteis e é um dado que revela a eficiência das condições de conservação e armazenamento.

De acordo com Ushirobira et al. (2004), diferentes métodos de secagem das sementes de guaraná determinaram uma variação nos resultados da perda por dessecação. Os valores limites encontrados pelos autores para os variados processos de secagem, ficaram entre 10,55 % \pm 0,25 (CV= 2,38 %) para secagem em tacho de barro durante 2 h e 4,79 % \pm 1,16 (CV= 1,56 %) em tacho de barro por 4 h. Os resultados sugerem que o tempo de secagem é um parâmetro que reflete na qualidade da droga.

O recipiente utilizado também pode influir no resultado. Neste caso, o material do recipiente empregado (tacho de ferro) favoreceu um processo de secagem mais rápido determinando um valor menor da perda por dessecação em relação àquela realizada em tacho de barro durante 2 h. O resultado obtido no presente trabalho, 8,98 % \pm 0,268 (CV= 2,99 %), encontra-se abaixo de 9,5 %, limite estabelecido na Farmacopéia Brasileira (2003), indicando a adequação do método de secagem empregado para a amostra em questão. Pode-se inferir, além disso, que as condições de armazenamento em que se encontra a droga vegetal (barrica de papelão em prateleiras à temperatura ambiente) são satisfatórias para a manutenção de suas características.

Para garantir a eficiência e a reprodutibilidade de um método extrativo é necessária a realização da análise granulométrica da droga, pois os resultados estão na dependência direta da área de superfície de contato da droga com o meio extrator.

Os valores obtidos pelo método de tamisação (tabela 1) demonstram que as classes granulométricas predominantes concentram-se entre os tamises com abertura de malha de 0,840 e 0,420 mm, correspondendo a 65,39% do material e o diâmetro médio das partículas calculado foi de 0,58 mm ± 0,027 (ANSEL, 2000). As curvas de retenção e passagem estão representadas na figura 3.

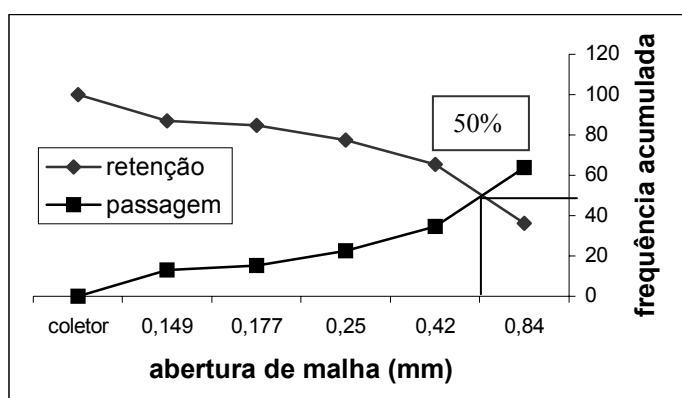


Figura 3. Curvas de retenção e de passagem da matéria-prima vegetal de *Paullinia cupana*

Tabela 1 - Análise granulométrica da droga vegetal por tamisação

Abertura malha (mm)	Am malha (mm)	Rc (g)*	Rc (%)	Am malha x Rc (%)	Fra (%)	Fp (%)
0,84	0,92	36,32	36,27	33,37	36,27	63,73
0,42	0,63	29,16	29,12	18,35	65,39	34,61
0,25	0,33	11,90	11,88	3,92	77,27	22,73
0,177	0,21	7,54	7,53	1,58	84,80	15,20
0,149	0,16	2,04	2,04	0,33	86,83	13,17
Coletor	0,07	13,19	13,17	0,92	100,00	0
Total		100,15	100,00	58,47		

Am = Abertura média; Rc = Resíduo coletado; Fra = Fração retida acumulada; Fp = Fração de passagem

*Os resultados obtidos referem-se aos testes realizados em triplicata.

O teor de extrativos é uma técnica auxiliar usada para o controle de qualidade através da qual se quantifica os constituintes extraídos da droga vegetal por determinado solvente, sob condições específicas, como a granulometria da droga, a agitação e a temperatura de aquecimento (MELLO; PETROVICK, 2000). O resultado obtido, $26,83 \% \pm 0,96$ (CV= 3,57 %), tem uma diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao encontrado por Ushirobira, (2003) [$22,98 \% \pm 1,16$ (CV= 5,05 %)]. A variação existente entre estes valores pode ser atribuída à heterogeneidade da faixa granulométrica do lote em estudo ou às diferenças de umidade entre os mesmos. Por outro lado, Andrade (1996) observou teores de extrativos entre 10 e 14 % para as amostras de sementes de guaraná de diversas procedências, o que pode, além dos fatores anteriormente citados, ser fonte destas variações.

Ao analisar os resultados de teor de extrativos e teor de taninos obtidos por Ushirobira et al. (2004) em amostras de pó de sementes de guaraná nota-se que a amostra com menor teor de taninos é aquela com o menor teor de extrativos, porém, a manutenção desta correlação não acontece para todas as amostras envolvidas no estudo. Da mesma forma, não há relação direta entre este parâmetro e teores de metilxantinas (ANDRADE, 1996).

A produtividade alcançada num processo extrativo deve ser considerada quando se tem por finalidade a produção industrial. A determinação do resíduo seco é uma medida do poder extrativo do solvente e da metodologia de extração. De acordo com Yamaguti et al. (2001), uma maior quantidade de extrativos do guaraná foi obtida usando-se, sob refluxo, acetona:água como líquido extrator. A diferença observada (tabela 2) entre os valores encontrados no presente trabalho com os obtidos pelos autores citados anteriormente pode estar relacionada com o método de secagem, com a granulometria do material vegetal, bem como, com o método de extração utilizado pelos mesmos. Porém, a variação encontrada entre os resultados de Ushirobira (2003) e os deste trabalho não é significativa e pode ser atribuída às diferenças de operações entre os analistas, ou ainda, decorrente de variações de umidade no lote.

Tabela 2 - Determinação do resíduo seco das sementes de *Paullinia cupana*

Resíduo Seco	Dados experimentais $\chi \pm s$ (CV %)	Dados da literatura $\chi \pm s$ (CV %)
Rendimento %(m/m)	$23,71 \pm 1,38$ (5,83)	$29,33 \pm 0,28$ (0,95)* $21,20 \pm 1,17$ (5,52)**

*Yamaguti et al., 2001; **Ushirobira, 2003

Para quantificar impurezas inorgânicas não voláteis procede-se a determinação do teor de cinzas totais. O teor de cinzas totais observado para a amostra em questão foi de 1,83 % \pm 0,018 (CV= 0,99 %) encontrando-se dentro do limite preconizado pela Farmacopéia Brasileira (2003), inferior a 3 %.

O conjunto de informações que auxiliam a caracterização da droga vegetal, bem como, a avaliação de sua integridade, inclui a determinação de teores de substâncias marcadoras. A cafeína vem sendo usada como substância marcadora para controle de qualidade de várias espécies de plantas há muito tempo, inclusive para o guaraná (Farmacopéia Brasileira, 1977; 2003).

Dados da literatura evidenciam certa variação entre os resultados obtidos para o teor desta xantina. O conteúdo de cafeína das sementes de guaraná tem sido relatado entre 3,0 a 8,69 % (ANGELUCCI et al., 1978; MARX et al., 1985; SPOLADORE et al., 1987; BEMPONG et al., 1992 e 1993; PAGLIARUSSI, 1999; YAMAGUTI et al., 2001; USHIROBIRA, 2003). Estas variações são consideradas conseqüências de diferentes condições edáficas e/ou climáticas, ou ainda, relacionadas com a época de coleta do material, que, de acordo com documento da SUFRAMA (2003), pode ocorrer até 5 vezes ao ano. A Farmacopéia Brasileira (2003) preconiza o limite mínimo em 5,0 % de cafeína. Valores inferiores podem estar relacionados ao envelhecimento do material vegetal. O teor de cafeína obtido neste trabalho pode ser observado na tabela 3 e encontra-se de acordo com os valores estabelecidos pela literatura.

Um efeito estimulante maior e prolongado do guaraná tem sido atribuído à presença de um complexo formado entre a cafeína e os taninos condensados (NIERENSTEIN, 1922). Resultados de trabalhos posteriores demonstram que extratos de guaraná livres de cafeína possuem atividade farmacológica (MOURA, 1986).

Marx (1990) demonstrou que o teor total de taninos consistia de proantocianidinas e/ou prototaninos (catequina e epicatequina) não detectando a presença de taninos hidrolisáveis. Sendo assim, para as preparações com guaraná, além dos níveis de metilxantinas, mais significativamente, a presença de vários compostos polifenólicos como a catequina, fornecem autenticidade à droga (CARLSON; THOMPSON, 1998) o que avaliza a importância que envolve o estudo dos teores destas substâncias nas sementes do guaraná.

Ushirobira (2003) isolou e identificou, além da cafeína, os monômeros de flavan-3-ol, catequina e epicatequina, e os dímeros, procianidinas, B2, B3 e B4, corroborando o encontrado por Marx (1990) e a idéia de autenticidade de Carlson e Thompson (1998).

Segundo Andrade (1996) os valores experimentais, obtidos no doseamento de taninos em sementes de guaraná através do método de Folin-Denis, variaram entre 8,18 % (CV= 1,6 %) a 10,98 % (CV= 2,53 %). Por outro lado, Ushirobira et al., 2003, utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu, observaram resultados entre 3,0 % (CV= 6,93 %) e 5,30 % (CV= 2,62 %), sugerindo que a variação encontrada pode estar relacionada com o tempo de secagem das sementes do guaraná, influenciando de maneira positiva, ou seja, quanto maior o tempo de secagem, menor a umidade residual, conseqüentemente, maior o teor de taninos.

Conforme a tabela 3, o presente experimento forneceu teor de 4,42 % (CV= 2,32 %) de taninos totais encontrando-se acima do limite mínimo especificado pela Farmacopéia Brasileira (2003) que é de 4,0 %.

Tabela 3 – Caracterização do pó das sementes de *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (DV)

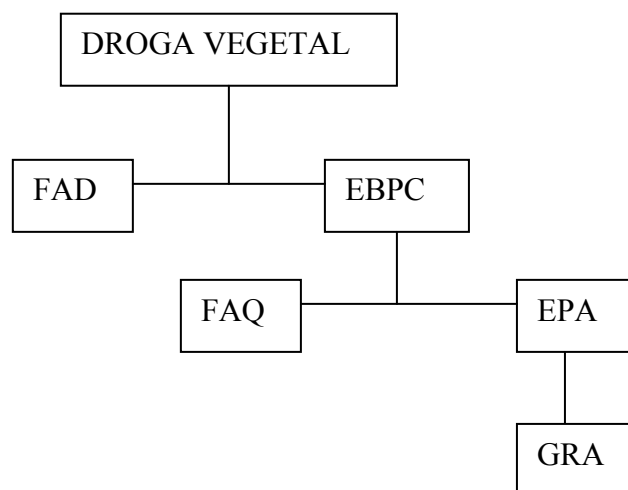
Determinações	Dados experimentais $\bar{x} \pm s$ (CV %)*
Perda por dessecação	8,98 \pm 0,27 (2,99)
Teor de cinzas totais	1,83 \pm 0,02 (0,99)
Teor de metilxantinas	6,93 \pm 0,11 (1,55)
Teor de taninos	4,42 \pm 0,1 (2,32)
Teor de extrativos	26,83 \pm 0,96 (3,57)

*A média e o desvio padrão referem-se aos resultados de testes realizados em triplicata.

5.2 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS

O rendimento médio obtido da extração realizada para a produção de EBPC foi de 14,86 %. O rendimento da fração EPA, obtida a partir do extrato bruto, foi de 5,88 % em relação à droga vegetal (fluxograma 1). Ushirobira (2003), utilizando o mesmo protocolo e a mesma matéria-prima vegetal, obteve um rendimento semelhante ao observado neste trabalho que foi de 15,76 % de extrato bruto e de 6,92 % para a fração EPA. Provavelmente este rendimento pode ser melhorado ao otimizar as condições de produção utilizando-se processo seqüencial com sistema de filtração acoplado.

No sentido de verificar se as condições de extração foram favoráveis à manutenção das características químicas originais da droga, foram realizadas análises cromatográficas, a perda por dessecação e a determinação dos teores de taninos e metilxantinas.



Fluorograma 1 – Esquema geral de preparação de extratos e do granulado a partir das sementes secas de *Paullinia cupana* var. *sorbilis*

A cromatografia em camada delgada foi realizada contra padrão de cafeína onde foi observado o mesmo comportamento para a amostra e para o padrão com produção de manchas com valores de $R_f = 0,54$.

Em outra análise cromatográfica empregaram-se catequina e epicatequina como substâncias de referência constatando-se $R_f = 0,87$ para a amostra, coincidente com as substâncias referências, sem, no entanto, ser capaz de diferenciar os epímeros.

Os resultados da perda por dessecação (tabela 4) estão de acordo com os limites máximos, de 9,5 % para droga vegetal e de 5 % para extratos secos, preconizados pela Farmacopéia Brasileira (2001, 2003).

O pH encontrado para as soluções a 1 % (m/v) do EBPC e do EPA foi respectivamente de $5,23 \pm 0,04$ (CV= 0,77 %) e $3,87 \pm 0,036$ (CV= 0,93 %). A diferença de acidez observada entre o extrato bruto e a fração semi-purificada EPA se deve, provavelmente, às diferentes substâncias extraídas.

Os teores de taninos e metilxantinas fornecidos pelo extrato bruto EBPC e fração semipurificada EPA estão dispostos na tabela 4.

Para verificar a eficiência do processo extrativo, foi realizada uma triagem no marco encontrando-se teor de taninos de $0,16 \% \pm 0,06$ (CV= 0,37 %), não sendo detectada a presença de metilxantinas.

Durante o processo de concentração do extrato bruto, a medida em que o solvente orgânico foi eliminado, formou-se um resíduo escuro (FAD) aderido nas paredes do balão de concentração, correspondendo a 13 % (m/m) da droga vegetal. Foi realizada a determinação

de teor de taninos totais e de metilxantinas neste resíduo (FAD), correspondendo a $19,77\% \pm 0,10$ (CV= 0,53 %) e $35,75\% \pm 0,44$ (CV= 1,24 %), respectivamente.

Tabela 4 – Caracterização do extrato bruto EBPC e fração EPA das sementes de *Paullinia cupana var.sorbilis*

Determinações	Dados obtidos EBPC $\chi \pm s$ (CV %)*	Dados obtidos EPA $\chi \pm s$ (CV %)*
Perda por dessecação	$2,78 \pm 0,13$ (4,69)	$2,97 \pm 0,05$ (1,68)
pH	$5,23 \pm 0,04$ (0,77)	$3,87 \pm 0,036$ (0,93).
Teor de metilxantinas	$28,01 \pm 0,71$ (2,53)	$34,95 \pm 0,99$ (2,83)
Teor de taninos	$17,17 \pm 0,69$ (4,02)	$17,53 \pm 0,37$ (2,09)

*Os resultados obtidos referem-se aos testes realizados em triplicata.

Do processo de obtenção do EPA foi recolhida uma sub fração (FAQ) com a qual se procedeu a determinação do teor de taninos totais encontrando-se um valor de $9,03\% \pm 0,58$ (CV= 6,38 %), e teor de metilxantinas de $17,38\% \pm 0,21$ (CV= 1,23 %).

Analisando-se estes dados observa-se que a fração FAD retém uma grande quantidade de taninos e metilxantinas, o que pode não ser interessante sob o ponto de vista tecnológico. Como o protocolo patenteado foi realizado empregando-se pequenas quantidades da droga vegetal, deve-se pensar em uma implementação metodológica que impeça esta ocorrência quando se tem por objetivo a obtenção de maiores quantidades de extratos. Por outro lado, é recomendável que se proceda ao estudo farmacológico e toxicológico desta fração.

Apesar destas constatações, não se descartou a importância dos procedimentos realizados em todas as etapas da extração como sendo necessários à manutenção da atividade antioxidante (USHIROBIRA et al., 2003) e farmacológica verificada por Audi et al. (2004) da fração semipurificada EPA.

5.3 CARACTERIZAÇÃO DO GRANULADO

Inicialmente houve uma tentativa de secagem por aspersão do extrato que demonstrou ser uma técnica inadequada. O rendimento do extrato nebulizado, em duas sessões, não passou de 40 %. De acordo com List e Schmidt (1989), os extratos secos por aspersão e os liofilizados possuem baixa densidade, o que representa, sob o ponto de vista tecnológico,

dificuldades de escoamento e a ocupação de um grande volume. Associado a este fato, observa-se, geralmente, que as partículas muito finas, devido ao aumento de sua superfície específica, possuem elevada higroscopia, o que influencia negativamente na conservação do produto.

Considerando estas observações, e na tentativa de promover uma forma farmacêutica intermediária que pudesse ter características tecnológicas favoráveis, foi realizada uma operação de granulação. Os grânulos devem suportar o manuseamento sem se quebrarem com produção de partículas muito finas e, ao mesmo tempo, devem apresentar forma e distribuição granulométrica regular que promova a uniformidade de enchimento das matrizes de compressão. Entre outros, a quantidade de líquido de granulação e a concentração do aglutinante empregado são fatores que contribuem para um aumento da resistência dos grânulos (MARSHALL, 2001). Foi demonstrado que é possível produzir grânulos com maior resistência empregando-se material de partículas de tamanhos reduzidos. Este fato se deve, possivelmente, ao maior número de pontos de contato entre as partículas (HUNTER; GANDERTON, 1972).

Os adjuvantes farmacêuticos empregados neste trabalho foram escolhidos após testes preliminares com diferentes associações de aglutinantes para verificar qual o tipo de associação e a proporção entre estas substâncias capazes de promover, com maior facilidade, um granulado de melhor aspecto. Foi observado que algumas associações formavam uma massa de consistência pegajosa que impedia ou dificultava a granulação. Desta maneira, optou-se pela associação entre dióxido de silício coloidal e talco, cuja propriedade adsorvente facilitou o processo de granulação.

O granulado, assim obtido, foi seco e acondicionado em pote plástico leitoso dotado de tampa rosca devidamente vedado com *parafilm* e armazenado em armário de madeira à temperatura ambiente.

O resultado da análise granulométrica realizada no granulado demonstra um diâmetro médio de $1,24 \text{ mm} \pm 0,031$ que foi calculado a partir dos dados da tabela 5, com os quais foram construídas as curvas de retenção e passagem (figura 4).

Subseqüentemente ao preparo foi realizada a determinação da perda por dessecação que foi avaliada em outros dois períodos.

É desejável que uma quantidade residual de umidade esteja presente no granulado permitindo otimizar a força entre as partículas, bem como, atuar como aglutinante durante a compactação (MARSHALL, 2001). Por outro lado, a evolução da perda por dessecação do

granulado é um fator determinante da manutenção da qualidade dos produtos intermediários de um fitoterápico (LIST; SCHIMDT, 1989).

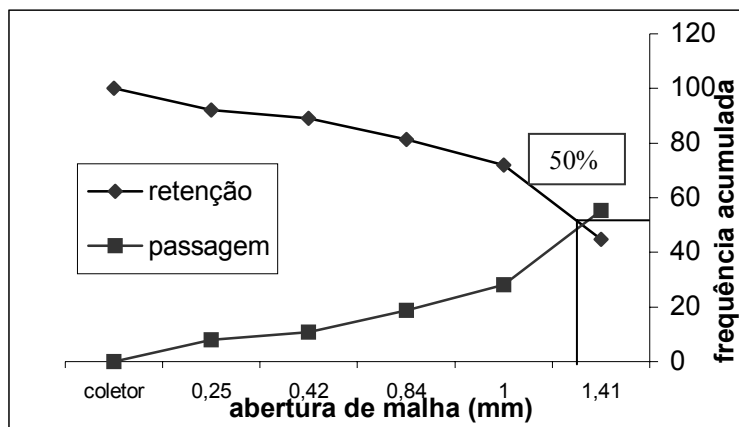


Figura 4 - Curvas de retenção e passagem do granulado da fração EPA de *Paullinia cupana*

Tabela 5 - Análise granulométrica por tamisação do granulado da fração EPA

Abertura malha (mm)	Am malha (mm)	Rc (g)*	Rc (%)	Am malha x Rc (%)	Fra (%)	Fp (%)
1,41	1,70	44,90	44,68	75,96	44,68	55,32
1,00	1,20	27,40	27,27	32,72	71,95	28,05
0,84	0,92	9,30	9,26	8,52	81,21	18,79
0,42	0,63	7,95	7,91	4,98	89,12	10,88
0,25	0,33	3,00	2,98	0,98	92,10	7,90
Coletor	0,12	7,92	7,90	0,95	100,00	0
Total		100,47	100,00	124,11		

Am = Abertura média; Rc = Resíduo coletado; Fra = Fração retida acumulada; Fp = Fração de passagem

*Os resultados obtidos referem-se aos testes realizados em triplicata.

A perda por dessecação observada no granulado logo após a sua obtenção (tempo 1) foi de 6,67 %. Após um período de 50 dias (tempo 2) foi realizada nova determinação da perda por dessecação sendo constatada uma umidade de 6,73 %. Ao final de 7 meses (tempo 3), o teor de umidade determinado no granulado foi de 5,35 %, período este em que a

umidade relativa do ar sofreu variações entre 83 e 51% observando-se, em fevereiro, o mais baixo índice de precipitação comparado à média usual para este mês, dos últimos vinte anos¹.

Como pode ser observado na figura 5, não houve modificação significativa no teor de umidade do granulado durante o período analisado.

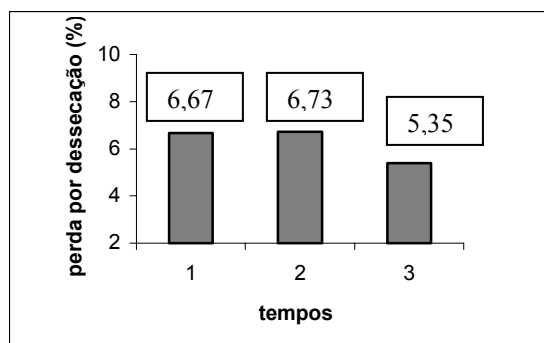


Figura 5 - Evolução da perda por dessecação do granulado obtido da fração EPA de *Paullinia cupana* nos tempos: 05/07/2004 (1), 23/08/2004(2) e 10/02/2005(3)

O pH da solução a 1 % do granulado foi determinado observando-se o valor de $4,31 \pm 0,099$ (CV= 2,29 %). Este valor situa-se entre aqueles determinados para a fração EBPC e EPA o que é interessante para a manutenção do perfil de estabilidade e de absorção da droga.

Os resultados obtidos das análises quantitativas realizadas no granulado são apresentados na tabela 6. O teor de taninos totais determinado foi de $11,84 \% \pm 0,23$ (CV= 1,98 %) que corresponde a uma recuperação de 106 % de taninos em relação à fração semipurificada EPA. O teor de metilxantinas observado foi de $25,88 \% \pm 0,12$ (CV= 0,46 %) com recuperação de 116,26 %.

Além das análises quantitativas é importante analisar o granulado sob o aspecto tecnológico. Estas características vão influenciar os processos de envase, de compactação e as propriedades dos comprimidos.

Ao relacionar as densidades bruta (db) e de compactação (dc), obtém-se o fator de Hausner (FH) indicando que, quanto mais próximo de 1, mais estável é o sistema de empacotamento (THOMAS; POURCELOT, 1991).

¹ Estação Climatológica da Universidade Estadual de Maringá.

Tabela 6 – Caracterização do granulado obtido da fração EPA das sementes de *Paullinia cupana* var. *sorbilis*

Determinações	Dados obtidos GRA $\bar{x} \pm s$ (CV %)*
Perda por dessecação (%)	6,67 ± 0,15 (2,25)
pH	4,31 ± 0,099 (2,29)
Teor de metilxantinas (%)	25,88 ± 0,12 (0,46)
Teor de taninos (%)	11,84 ± 0,23 (1,98)

*Os resultados obtidos referem-se aos testes realizados em triplicata.

O índice de compressibilidade (IC) expressa a capacidade de densificação. Segundo Marshall (2001), valores de IC de até 15 % originam um escoamento adequado indicando um empacotamento correto. Da mesma maneira, a compactabilidade (C) indica a maior ou menor facilidade de rearranjo das partículas e ocupação de espaço e infere a respeito do comportamento compressional do produto (SOARES; PETROVICK, 1999).

Couto (2000) avaliou os resultados reológicos do granulado do extrato seco nebulizado de *Phyllanthus niruri* L obtido na realização de granulação a seco, sugerindo aspectos tecnológicos positivos (tabela 7).

Do mesmo modo, os índices obtidos na avaliação tecnológica do granulado da fração EPA do guaraná (tabela 7) sugerem um bom escoamento ao verificar que quanto menor o FH, maior a estabilidade de empacotamento e menor facilidade de movimentação do granel, do mesmo modo que quanto menor o IC, menor é a quantidade de adjuvante requerida para o processo tecnológico.

Outro aspecto a ser considerado é o perfil de dissolução do granulado. Neste trabalho foi adotada a água como meio de dissolução em condições que, teoricamente, não são as mais favoráveis para promover a dissolução, ou seja, o menor volume (500 ml) e agitação (50 rpm), sendo avaliada a cedência de polifenóis totais.

De acordo com o FDA, um produto de liberação imediata deve promover a dissolução de, no mínimo, 85% do fármaco em 30 min (DRESSMAN et al., 2004).

O valor t50% corresponde ao tempo necessário para que 50% do fármaco dissolvam-se no meio de dissolução. Um valor de t90% de 30 min é normalmente considerado satisfatório, visto ser aceito pela USP/NF o valor de 75% do fármaco dissolvido em 45 min (BANKER; ANDERSON, 2001).

Tabela 7 – Comparação das características tecnológicas do granulado de *Paullinia cupana* e do granulado do PSN de *Phyllanthus niruri* L.

Ensaio	Granulado <i>P. cupana</i> $\chi \pm s$ (CV %)*	Granulado <i>P. niruri</i>** $\chi \pm s$ (CV %)
Densidade bruta (g/ml)	0,776 ± 0,007 (0,009)	0,471 ± 0,01 (0,02)
Densidade compactada (g/ml)	0,832 ± 0,005 (0,01)	0,524 ± 0,004 (0,007)
Fator Hausner	1,071 ± 0,007 (0,01)	1,11 ± 0,02 (0,02)
Índice Compressibilidade (%)	6,91 ± 0,868 (0,13)	10,18 ± 1,62 (0,16)
Compactabilidade (ml)	3 ± 0	13,33 ± 1,44 (0,11)

*Os valores representam a média e o desvio padrão de amostras em triplicata; **Couto (2000)

Inicialmente foi realizada a quantificação de polifenóis totais no granulado para servir de valor de referência ou nominal, obtendo-se o valor de 25,75 (igual a 100 %). Os resultados obtidos do teste de dissolução, em termos de quantificação de polifenóis totais encontram-se dispostos na tabela 8.

Tabela 8 – Teor de polifenóis totais obtidos da dissolução do granulado de *Paullinia cupana* var *sorbilis*

Tempo (min)	Polifenóis Totais $\chi \pm s$ (CV %)*	Cedência (%)
5	11,58 ± 0,46 (3,97)	38,23
10	14,48 ± 0,01 (0,01)	47,80
20	27,52 ± 0,40 (0,01)	90,85
30	30,29 ± 0,25 (0,81)	100,00
40	28,75 ± 0,88 (3,11)	94,92
60	28,25 ± 0,88 (3,06)	93,26

*Os valores representam a média e o desvio padrão de amostras em triplicata.

Como pode ser observado na tabela 8, o valor máximo encontrado no teste é maior que o valor de referência nominal. Esta observação pode ser justificada pela influência da temperatura do banho favorecendo uma dissolução mais eficaz do granulado.

A análise do perfil de dissolução do granulado da fração EPA de guaraná demonstra que o mesmo alcançou o máximo de cedência de polifenóis (117,68 %) para o meio de

dissolução em 30 min (figura 6). O valor de $t_{50\%}$ está entre 10 e 11 min como pode ser observado na figura 7.

A eficiência ou taxa de dissolução (ED %), definida como a proporção de droga dissolvida por unidade de área por tempo (SHARGEL: YU, 1993) é um parâmetro que possibilita comparações entre as velocidades de dissolução de diferentes formulações. O granulado em estudo forneceu uma eficiência de dissolução de 75,96 %, considerando a área sob a curva da figura 6, no intervalo de 0 a 60 min (4557,47 x min).

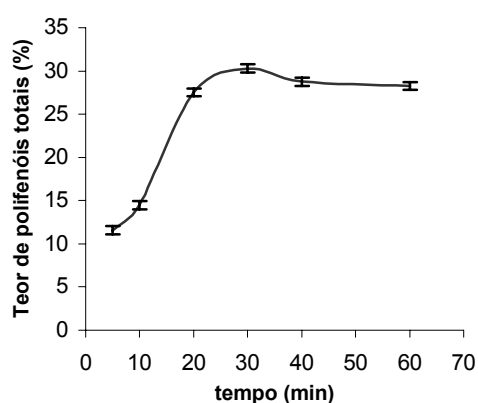


Figura 6 - Perfil de dissolução de polifenóis totais do granulado de *Paullinia cupana*

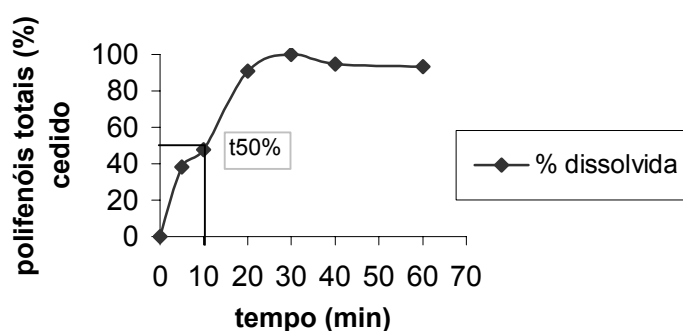


Figura 7 – Relação entre percentual de polifenóis totais cedido e não cedido do granulado.

Os resultados obtidos demonstram que os adjuvantes farmacotécnicos utilizados na obtenção do granulado não prejudicaram a liberação e nem a dissolução de polifenóis totais no meio de dissolução. Conseqüentemente, pode-se inferir que a dissolução do produto não será fator limitante para a disponibilidade biológica destes marcadores.

5.4 CARACTERIZAÇÃO DOS ADJUVANTES USADOS NOS PROCESSOS DE OBTENÇÃO DO GRANULADO.

Os adjuvantes utilizados na produção das formas farmacêuticas intermediárias devem atender requisitos mínimos de qualidade. A avaliação das propriedades tecnológicas dos adjuvantes farmacotécnicos serve como auxiliar na identificação dos mesmos e tem influência determinante na qualidade do produto final (SONAGLIO et al., 2001). Os resultados obtidos são observados na tabela 9 e estão de acordo com as especificações oficiais.

Tabela 9 - Caracterização físico-química e tecnológica dos adjuvantes farmacêuticos empregados na obtenção do granulado

Ensaio	Aerosil®200	Talco	Especificações*
pH $\chi \pm s$ (CV %)	4,4 \pm 0,1305 (2,96)	7,28 \pm 0,15 (2,01)	De acordo
PD (%) $\chi \pm s$ (CV %)	2,12 \pm 0,096 (4,50)	2,57 \pm 0,12 (4,86)	De acordo
db (g/ml)	0,0443	0,4547	De acordo
dc (g/ml)	0,0575	0,7395	De acordo
FH	1,298	1,6265	De acordo
ÍC (%)	24,69	38,51	De acordo

PD = Perda por dessecação; db = densidade bruta; dc = densidade compactada; FH = Fator de Hausner; IC = Índice de compressibilidade.

*Kibbe (2000).

5.5 VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS ANALÍTICOS QUANTITATIVOS EMPREGADOS NO CONTROLE DE QUALIDADE.

Embora os métodos quantitativos empregados neste trabalho estejam contemplados na Farmacopéia Brasileira (2003), é necessário verificar sua validade para determinar os teores das substâncias marcadoras nos produtos intermediários, já que substâncias adicionadas podem interferir no desempenho dos mesmos.

5.5.1 Determinação do teor de polifenóis totais

5.5.1.1 Curva de calibração do pirogalol

Para validação do método de determinação de polifenóis totais foi empregado o pirogalol como padrão, haja vista ser a substância utilizada pela metodologia descrita na Farmacopéia brasileira (2003). Foi realizado um espectro de varredura da solução padrão de pirogalol encontrando-se um pico de absorção em 740 nm. Diante desta observação foram realizadas leituras em 740 e 691 nm visto que a metodologia farmacopéica preconiza este último comprimento de onda para as leituras espectrofotométricas.

As tabelas 10 e 11 apresentam a absorvância média correspondente ao pirogalol, relativa a cada uma das diluições da solução padrão, com leituras em 740 e 691 nm, respectivamente. A precisão do método, avaliada em termos de repetibilidade, forneceu um coeficiente de variação percentual médio (CV %) obtido para cada um dos comprimentos de onda analisados de 1,38 % e 1,31 %, respectivamente, encontrando-se dentro do limite aceitável pela literatura oficial que é de 5 %.(BRASIL, 2003).

A representação gráfica das curvas de calibração e as equações das retas determinadas através do cálculo da regressão linear são mostradas nas figuras 8 e 9. O resultado obtido indica a linearidade do método, com coeficiente de correlação (r) de 0,9966 e 0,9982, respectivamente. Este dado permite que se faça uma previsão de um parâmetro em função do outro, no caso, a correlação linear entre a absorvância da amostra e sua concentração. A legislação (RE n.899, 2003) estabelece como critério mínimo aceitável o valor de $r = 0,99$.

Tabela 10 Valores obtidos das curvas de calibração de pirogalol (740 nm)

Concentração (µg/ml)	Absorvância $\bar{x} \pm s$ (CV %)*	Concentração obtida (µg/ml)
2,4	0,3675 ± 0,0030 (0,82)	2,33
3,2	0,5003 ± 0,0050 (1,00)	3,23
4	0,6322 ± 0,0111 (1,75)	4,12
4,8	0,7191 ± 0,0158 (2,19)	4,71
5,6	0,8493 ± 0,0095 (1,12)	5,59

*Os valores representam resultados de amostras em triplicata

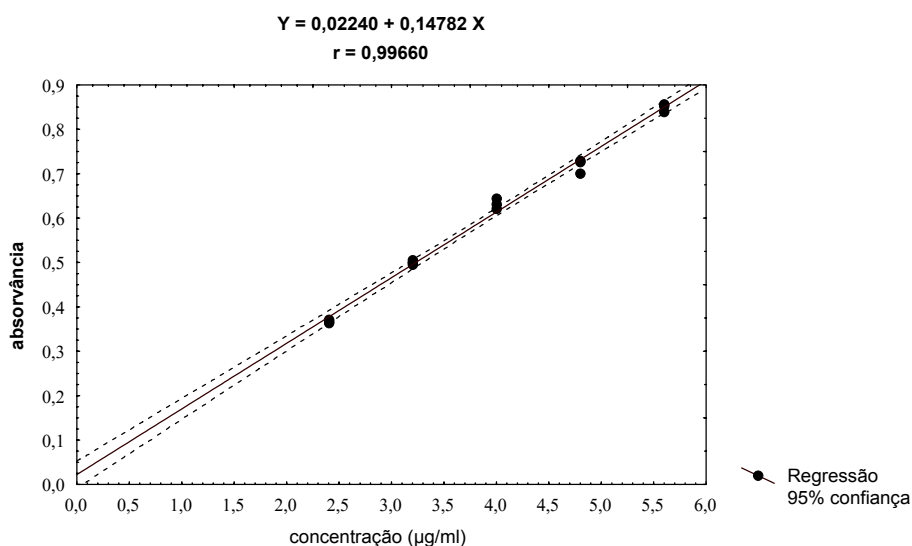


Figura 8 - Curva de calibração do pirogalol (740 nm) e intervalos de confiança

Tabela 11 Valores obtidos das curvas de calibração de pirogalol (691 nm)

Concentração (µg/ml)	Absorvância $\bar{x} \pm s$ (CV %)*	Concentração obtida (µg/ml)
2,4	0,3451 ± 0,0044 (1,27)	2,37
3,2	0,4691 ± 0,0043 (0,92)	3,23
4	0,5877 ± 0,0055 (0,94)	4,06
4,8	0,6845 ± 0,0133 (1,94)	4,80
5,6	0,8119 ± 0,0119 (1,47)	5,62

*Os valores obtidos representam resultados de amostras em triplicata

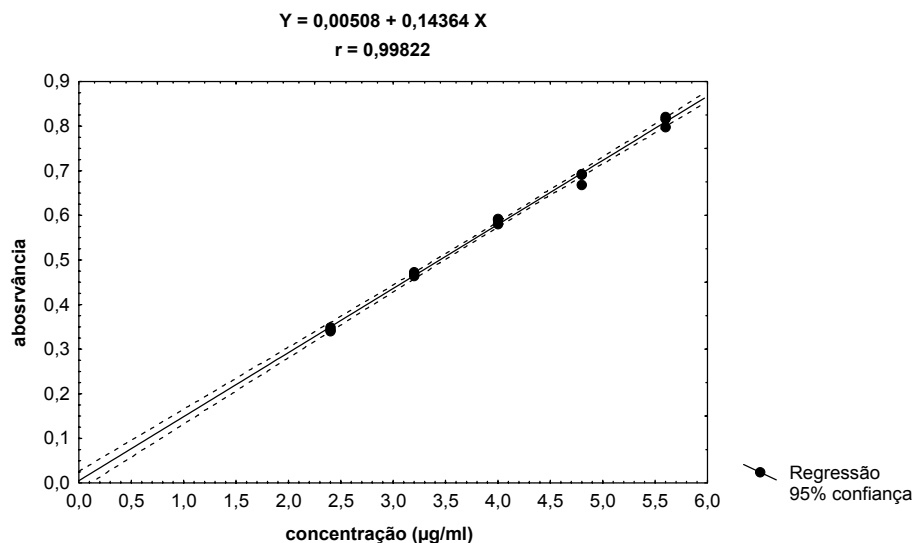


Figura 9 - Curva de calibração do pirogalol (691 nm)

Os resultados do tratamento estatístico (tabelas A.1 e A.2, anexos) sobre os valores experimentais obtidos das curvas de calibração através da análise da variância indicam que a regressão é válida visto o F calculado ser maior que o F crítico tabelado. Além disso, ao examinar os resíduos (erros) produzidos pelo modelo, comprovou-se o ajuste do modelo linear ao verificar a condição de F calculado menor que o F crítico tabelado.

A eficiência da regressão foi calculada através do coeficiente de determinação (r^2) que apresentou um valor de 0,9932 e 0,9964 para as leituras realizadas em 740 e 691 nm, respectivamente. Este dado revela que o modelo consegue explicar 99,32 % e 99,64 % da variação em torno da média, confirmando a linearidade do método.

As figuras A.1.1 e A.2.1 (anexos) trazem a representação gráfica dos resíduos contra os valores observados das análises. Os resíduos estão distribuídos de modo aleatório demonstrando que o erro não é sistemático. Os valores observados em função dos valores esperados, bem como a distribuição normal, estão dispostos nas figuras A.1.2 e A.1.3; A.2.2 e A.2.3 (anexos), para cada um dos comprimentos de onda analisados.

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) encontrados para as leituras realizadas em 740 nm foram de, respectivamente, 0,29 e 0,95 µg/ml. Para leituras realizadas em 691 nm foram encontrados os respectivos valores de 0,21 e de 0,69 µg/ml. Comparando-se os resultados obtidos das leituras nos dois comprimentos de onda observam-se diferenças significativas entre os limites de quantificação ($p < 0,05$) não apresentando, porém, significância para os limites de detecção.

Para a determinação do teor de taninos deve-se realizar uma varredura espectrofotométrica para estabelecer o melhor comprimento de onda de absorvância para o material analisado

5.2.1.2 Teste de recuperação

Os resultados do teste de recuperação do método podem ser observados na tabela 12 indicando a exatidão e sensibilidade do método.

Tabela 12- Valores experimentais do teste de recuperação do pirogalol obtidos na fração EPA

Padrão adicionado ($\mu\text{g/ml}$)	Recuperação (%) 740 nm $\chi \pm s$ (CV %)*	Recuperação (%) 691 nm $\chi \pm s$ (CV %)*
2	102,45 \pm 3,14 (3,07)	103,57 \pm 3,33 (3,22)
3	103,02 \pm 3,59 (3,49)	102,13 \pm 2,65 (2,60)
4	97,02 \pm 1,01 (1,04)	97,89 \pm 1,66 (1,70)

*Os valores obtidos representam resultados de amostras em triplicata

5.2.2 Determinação do teor de Metilxantinas

5.2.2.1 Curva de calibração da cafeína

A tabela 13 apresenta a absorvância média correspondente à cafeína, relativa a cada uma das diluições da solução padrão. O coeficiente de variação percentual médio (CV %) obtido foi de 0,78 encontrando-se dentro dos limites aceitáveis pela literatura oficial (BRASIL, 2003) atendendo ao requisito de precisão adequada.

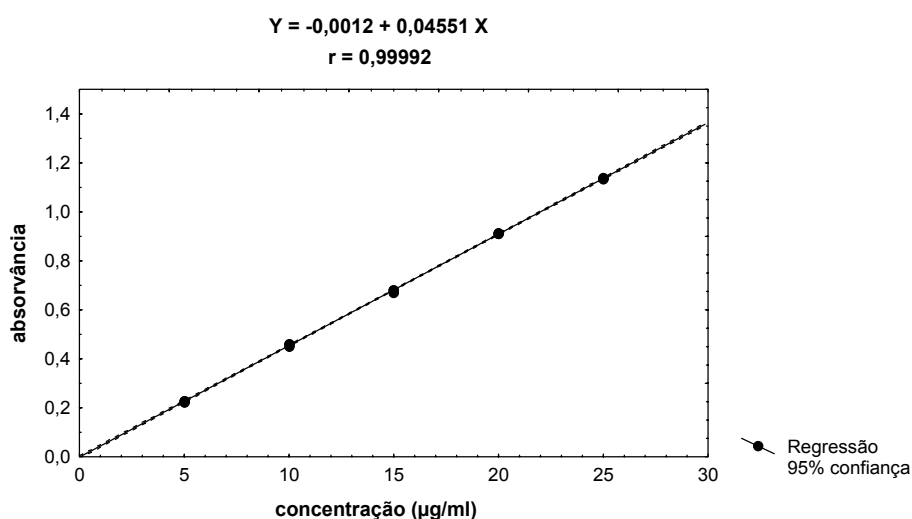
A representação gráfica das curvas de calibração determinadas através do cálculo da regressão linear e a equação da reta, estão indicadas na figura 10. O coeficiente de correlação (r) determinado foi de 0,9999 indicando a linearidade do método.

A eficiência da regressão foi calculada através do coeficiente de determinação (r^2) que apresentou um valor de 0,9998, ou seja, o modelo consegue explicar 99,98 % da variação em torno da média, confirmando a linearidade do método.

Tabela 13 - Valores médios de absorvância obtidos da curva de calibração de cafeína

Concentração ($\mu\text{g/ml}$)	Absorvância $\bar{x} \pm s$ (CV %)*	Concentração obtida ($\mu\text{g/ml}$)
5	0,2226 \pm 0,0036 (1,62)	4,99
10	0,4563 \pm 0,0047 (1,03)	10,05
15	0,6773 \pm 0,0057 (0,84)	14,91
20	0,912 \pm 0,0017 (0,19)	20,06
25	1,136 \pm 0,0026 (0,23)	24,98

*Os valores representam a média e o desvio padrão de amostras em triplicata

**Figura 10.** Curva de calibração de cafeína

Os resultados do tratamento estatístico (tabelas A 3, anexos) sobre os valores experimentais obtidos das curvas de calibração através da análise da variância demonstram a validade da regressão visto que o F calculado é maior que o F crítico tabelado. Da mesma forma, ao examinar os resíduos (erros) produzidos pelo modelo, comprovou-se o ajuste do modelo linear quando foi verificada a condição de F calculado menor que o F crítico tabelado.

A figura A.3.1 (anexos) traz a representação gráfica dos resíduos contra os valores observados das análises. Os valores observados em função dos valores esperados e a curva de distribuição normal estão dispostos na figura A.3.2 e A.3.3 (anexos), respectivamente.

A menor concentração de cafeína que pode ser detectada pelo método (LD) é de 0,18 $\mu\text{g/ml}$. A menor concentração de cafeína que o método pode quantificar (LQ) é de 0,59 $\mu\text{g/ml}$.

5.2.2.2 Teste de recuperação

De acordo com a tabela 14, os resultados obtidos do teste de recuperação do método variaram entre 98,16 e 98,73 % de recuperação. Andrade (1996) obteve resultados semelhantes com recuperação entre 98,53 e 103,60 %, indicando a exatidão do método.

Tabela 14 - Valores obtidos do teste de recuperação da cafeína na fração EPA

Padrão adicionado ($\mu\text{g/ml}$)	Padrão recuperado ($\mu\text{g/ml}$)	Recuperação (%) $\bar{x} \pm s$ (CV %)*
5	4,94	98,73 \pm 3,49 (3,54)
10	9,82	98,16 \pm 1,31 (1,34)
15	14,77	98,49 \pm 1,53 (1,55)

*Os valores representam a média e o desvio padrão de amostras em triplicata.

5.5.3 Curva de calibração da fração EPA

Assumindo-se que o EPA constitui o componente ativo presente na formulação do granulado, a sua completa dissolução implica na dissolução das substâncias constituintes ativas.

A interferência dos adjuvantes na formulação foi verificada através de espectrofotometria de varredura das soluções preparadas com a fração EPA e com o granulado. Os picos de absorvância observados ocorreram em 740 nm tanto para fração EPA quanto para o GRA (figuras 11 e 12) constatando-se que os adjuvantes não interferem na leitura dos componentes ativos presentes no granulado.

A tabela 15 apresenta a absorvância média correspondente às curvas de calibração da fração EPA. O coeficiente de variação percentual (CV %) médio obtido para estas análises foi de 1,61 %, atendendo a legislação (BRASIL, 2003).

Da observação dos resultados obtidos constata-se que a linearidade do método ocorre no intervalo de concentração entre 0,288 e 0,672 $\mu\text{g/ml}$. A equação da reta foi determinada empregando-se, além destas, outras 3 concentrações intermediárias.

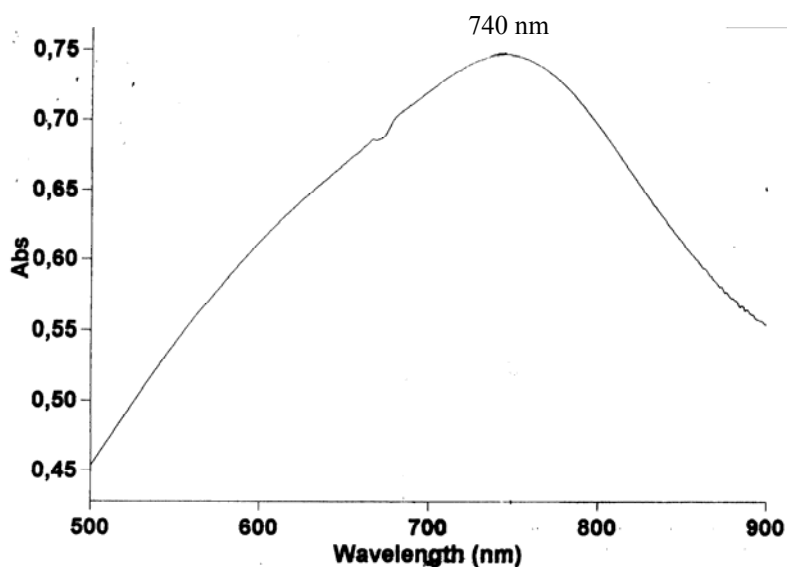


Figura 11 – Espectro de varredura de solução contendo 0,192 µg/ml da fração EPA

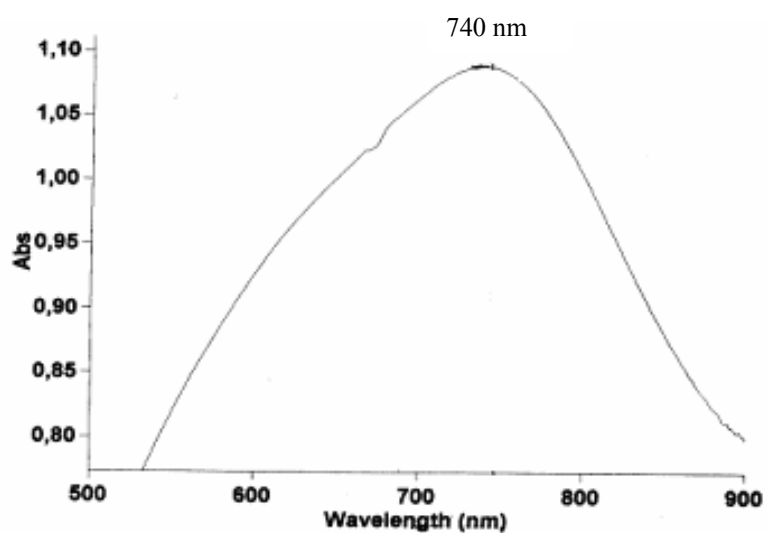


Figura 12 – Espectro de varredura de solução contendo 0,4 µg/ml de granulado

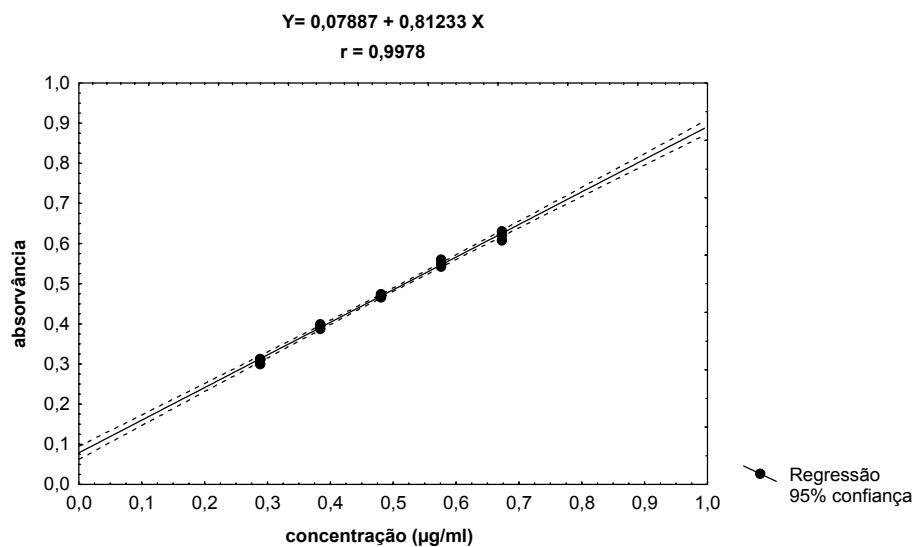
A representação gráfica das curvas de calibração e a equação da reta determinada através do cálculo da regressão linear são observadas na figura 13 e indicam a linearidade do método com coeficiente de correlação (r) de 0,9978.

As análises estatísticas confirmam a linearidade do método (tabela A.4, anexos). A representação gráfica dos resíduos em função dos valores observados, os valores esperados contra os valores observados, bem como, a curva de distribuição normal, são demonstrados nas figuras A.4.1, A.4.2 e A.4.3 (anexos), respectivamente.

Tabela 15 – Valores obtidos das curvas de calibração da fração EPA

Concentração (µg/ml)	Absorvância $\bar{x} \pm s$ (CV %)*	Concentração obtida (µg/ml)
0,192	0,2309 ± 0,0051 (2,23)	0,187
0,288	0,3085 ± 0,0065 (2,09)	0,283
0,384	0,3946 ± 0,0056 (1,41)	0,389
0,48	0,4697 ± 0,0041 (0,87)	0,481
0,576	0,5508 ± 0,0090 (1,64)	0,581
0,672	0,6203 ± 0,0115 (1,86)	0,666
0,768	0,6898 ± 0,011 (1,57)	0,752
0,864	0,7727 ± 0,0089 (1,15)	0,854
0,96	0,8186 ± 0,015 (1,79)	0,911
1,056	0,8863 ± 0,013 (1,45)	0,994

*Os valores obtidos representam resultados de amostras em triplicata

**Figura 13** - Curva de calibração da fração EPA

O limite de detecção observado é de 0,03 µg/ml e de quantificação, 0,09 µg/ml. A tabela 16 apresenta os valores do teste de recuperação da fração EPA obtidos no granulado.

Os resultados permitem inferir que a forma intermediária (GRA) possui o mesmo comportamento, no tocante ao doseamento de polifenóis totais, que a fração EPA. A taxa de recuperação da fração EPA no granulado implica na exatidão do método.

Tabela 16 - Valores obtidos do teste de recuperação da fração EPA

Padrão adicionado ($\mu\text{g/ml}$)	Padrão recuperado ($\mu\text{g/ml}$)	Recuperação (%) $\bar{x} \pm s$ (CV %)*
4,8	4,718	98,07 \pm 1,94 (1,99)
6,0	5,93	98,77 \pm 1,31 (1,33)
7,2	7,32	101,72 \pm 1,53 (1,50)

*Os valores representam a média e o desvio padrão de amostras em triplicata.

O comportamento linear das curvas admite a utilização da metodologia para a avaliação quantitativa do granulado.

Os resultados da validação dos métodos utilizados para quantificação das substâncias marcadoras e da fração EPA estão dispostos na tabela 17.

Tabela 17 – Índices obtidos na validação dos métodos de quantificação

Requisito	Caféina	Pirogalol (740 nm)	Pirogalol (691 nm)	EPA
Linearidade (r)	0,9999	0,9966	0,9982	0,9978
Intervalo ($\mu\text{g/ml}$)	5-25	2,4-5,6	2,4-5,6	0,288-0,672
Exatidão (R %)	98,46	100,83	101,19	99,52
Precisão (CV %)	0,78	1,38	1,31	1,61
LD* ($\mu\text{g/ml}$)	0,18	0,29	0,21	0,03
LC** ($\mu\text{g/ml}$)	0,59	0,95	0,69	0,09

*limite de detecção; **limite de quantificação

Durante o desenvolvimento do trabalho observou-se que fatores tais como, o emprego de diferentes lotes de reagentes, a temperatura de armazenamento dos mesmos, bem como, a padronização da vidraria utilizada, o tempo e a velocidade de agitação durante a complexação da fração tanante com o pó de pele, podem interferir nos resultados. Deste modo evidencia-se a necessidade de controle das condições analíticas para que os resultados sejam reprodutíveis.

Para implantação em grande escala da tecnologia discutida neste trabalho, deverão ser realizadas análises que garantam a reprodutibilidade do método.

6. CONCLUSÕES

A matéria prima vegetal atende às especificações estabelecidas pela Farmacopéia Brasileira atestando sua identidade e integridade.

Os extratos obtidos (EBPC e EPA) mantiveram as características da planta no que se refere à presença das substâncias marcadoras.

O granulado obtido (GRA) demonstrou, preliminarmente, possuir propriedades tecnológicas favoráveis ao envase ou à compressão e estabilidade frente às condições de armazenamento em relação ao teor de umidade.

O perfil de dissolução do granulado caracterizou a forma farmacêutica como sendo de liberação imediata e manteve as características originais da fração EPA no que se refere aos teores das substâncias marcadoras.

Os métodos analíticos empregados atenderam aos requisitos da legislação demonstrando especificidade, linearidade, sensibilidade, exatidão, precisão e robustez para o intervalo indicado.

A metodologia empregada na determinação de teores de metilxantinas e de taninos é adequada para aplicar no controle de qualidade do granulado.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, L. **Estudo da metodologia de análise da droga vegetal guaraná**. 1996. 106 f. Dissertação (Mestrado)- Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1996.
- ANGELUCCI, E; TOCCHINI, R. P.; LAZARINE, V. B.; FONTES PRADO, M. A. Caracterização química da semente de guaraná. **Boletim do Instituto Tecnológico de Alimentos**, Campinas, v. 56, n. 5, p. 183-192, 1978.
- ANSEL, H. C.; POPOVICK, N. G.; LOYD JUNIOR, A. **Farmacotécnica: Formas Farmacêuticas & Sistemas de Liberação de Fármacos**. Tradução da Editorial Premier. 6. ed. São Paulo: 2000.
- AUDI, E. A.; OTOBONE, A. C. C.; SANCHES, R.; NAGAE, J. V. C.; MARTINS, V. R.S.; MELLO, J. C. P. Effect of lyophilized extracts from guarana seeds (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke) on the behavioral profiles in rats. **Phytotherapy Research**. No prelo
- BANKER, G. S.; ANDERSON, N. R. Comprimidos. In: LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H.A.; KANIG, J. L. **Teoria e prática na indústria farmacêutica**. Lisboa: Calouste Gulbenkian, 2001. v. 2, cap. 11, p. 509-597.
- BAUMANN, T. W.; SCHULTHESS, B. H.; HANNI, K. Guaraná (*Paullinia cupana*) rewards seed dispersers without intoxicating them by caffeine. **Phytochemistry**, London, v. 39, n. 5, p. 1063-1070, 1995.
- BELLIARDO, F.; MARTELLI, A.; VALLE, M. G. HPLC determination of caffeine and theophylline in *Paullinia cupana* Kunth (guarana) and *Cola spp* samples. **Zeitschrift für Lebensmittel –Untersuchung und –Forschung**, Köln, n. 180, p.398-401, 1985.
- BEMPONG, D. K.; HOUGHTON, P. J. Dissolution and absorption of caffeine from guarana. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. London, 44, n. 9, p. 769-771, 1992.
- BEMPONG, D. K.; HOUGHTON, P. J.; STEADMAN, K. The xantine content of guarana and its preparations. **International Journal of Pharmaceutics**. Amsterdam, v. 31, n. 3, p. 175-181, 1993.
- BENONI, H.; DALLAKIAN, P.; TARAZ, K. Studies on the essential oil from guarana. **Zeitschrift für Lebensmittel –Untersuchung und -Forschung**, Köln, v. 203, p. 95-98, 1996.
- BLOOM, F. E. Neurotransmission and the central nervous system. In: HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. (Ed.). **Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. 9 th ed. New York: McGraw Hill, 1996. cap. 12, p. 286.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria nº 070, de 16.03.1982. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 19.03.1982.

BRASIL. Ministério de Ciência e Tecnologia. **Chamada para apresentação de projetos de pesquisa e desenvolvimento na área de fitomedicamentos envolvendo centros de pesquisas e empresas**. Brasília, DF, 2001.

BRASIL. Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. Superintendência da Zona Franca de Manaus (SUFRAMA). **Projeto potencialidades regionais: estudo de viabilidade econômica**. Brasília, DF, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução Específica n. 899 de 29.05.2003. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 02.06.2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) n.48, de 16.03.2004. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 19.03.2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução Específica n. 310, de 01.09.2004. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 03.09.2004.

BRIGGS, C. Guarana. **Canadian Pharmaceutical Journal**, Toronto, n. 125, p. 222-224, 1992.

BYDLOWSKI, S. P.; DAMICO, E. A.; CHAMONE, D. A. F. An aqueous extract of guarana (*Paullinia cupana*) decreases platelet thromboxane synthesis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v. 24, p. 421-424, 1991.

BYDLOWSKI, S. P.; YUNKER, R. L.; SUBBIAH, M. T. R. A novel property of an aqueous guarana extract (*Paullinia cupana*): inhibition of platelet aggregation *in vitro* and *in vivo*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v. 21, p. 535-538, 1988.

CAGNO, N. Sobre alguns aspectos importantes do guaraná (*Paullinia cupana*). **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, n. 2, p. 213-245, 1942.

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

CAMPOS, A. M. **Desenvolvimento de extratos secos nebulizados de *Ilex paraguariensis* St. Hil., Aquifoliaceae (erva-mate)**. 1996. 149 f. Dissertação (Mestrado)- Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1996.

CARDOSO, M. L. C. **Desenvolvimento de técnica analítica e tecnológica na obtenção de extratos secos nebulizados de *Heteropteris aphrodisiaca* O. Mach Malpighiaceae (nó-de-cachorro)**. 2002. 128 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas)-UNESP, Araraquara, 2002.

CARLSON, M.; THOMPSON, R. D. Liquid chromatographic determination of methylxantines and catechins in herbal preparations containing guarana. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, Arlington, v. 81, n. 4, p. 691-701, 1998.

CARR JR., R. L. Evaluating flow properties of solids. **Chemical Engineering**, New York, v. 72, n. 2, p. 163-168, 1965.

CARVALHO, E. L. S. **Desenvolvimento de extrato seco nebulizado de *Maytenus ilicifolia* Martius ex Reiss. (espinaheira santa)**. 1997. Dissertação (Mestrado)- Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1997.

CASADEBAIG, J. L.; JACOB, M.; CASSANAS, G.; MARION, C.; PUECH, A. Elaboration d'extratis vétetaux adsorbés, réalisation d'extraits secs d'Orthosiphon staninus Benth. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, Zürich, v. 64, p. 220-224, 1989.

CASTLEMAN, M. **The healing herbs**. Pensilvania: Rodale Press, 1991. p. 125-129, 348 350.

CHAAR, J. M. Extration of caffeine from seed of guarana fruit. **Dissertation Abstracts**, Ann Arbor, v. 51, n. 6, p. 2688-b, 1990.

CHEN, J. Determination of caffeine in tea, coffee and cola drinks by gas chromatography with a nitrogen-phosphorus detector. **Chinese Journal of Chromatography**. Beijing, v. 5, n. 6, p. 367-369, 1987. **Chemical Abstracts**, v. 108, 73903e, 1988.

CHONG-HUI GU; GANDHI R. B.; ZHOU S.; RAGHAVAN, K. Importance of using physiologically relevant volume of dissolution medium to correlate the oral exposure of formulations of BMS-480188 mesylate. **International Journal of Pharmacy**. Amsterdam, n. 269, p. 195 -202, 2004.

COLLINS, C. H. **Introdução a métodos cromatográficos**. 7.ed. Campinas, SP, [s.n.], 1997.
CORRÊA, M. P. **Dicionário de plantas úteis do Brasil**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, v. 3, p. 545-555, 1984.

COUTO, A. G. **Desenvolvimento e avaliação tecnológica de granulado contendo produto seco nebulizado de *Phyllanthus niruri* L. Euphorbiaceae (quebra pedra)**. 2000. 179 f. Dissertação (Mestrado)- Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2000.

CRELLIN, J. K.; PHILPOTT, J. **Herbal medicine past and present**. London: Duke University, 1990. v. 2, p. 240-241.

DE SOUZA, D. C. B. **Desenvolvimento de metodologias analíticas e tecnológicas na obtenção de extratos secos nebulizados de *Passiflora edulis* variedade *flavicarpa* (maracujá)**. 1997. 156 f. Dissertação (Mestrado)-Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1997.

DRESSMAN, J. B.; LINDENBERG, M.; KOPP, S. Classification of orally administered drugs on the World Health Organization model list of essential medicines according to the biopharmaceutics classification system. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Geneva, v. 58, p. 265-278, 2004.

DUKE, J. A. **Handbook of medicinal herbs**. Florida: CRC,1985. p. 131, 349, 521, 562.

ESPÍNOLA, E. B.; DIAS, R. F.; MATTEI R.; CARLINI, E. A. Pharmacological activity of Guarana (*Paullinia cupana* Mart) in laboratory animals. **Journal of Ethnopharmacology**. Lausanne, v.55, n. 3, p. 223-229, 1997.

FARIAS, M. R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Florianópolis: Ed.Universidade: Ed. da UFSC, 2004. cap. 12, p. 263-288.

FARMACOPÉIA Brasileira. 3. ed. São Paulo: Andrei, 1977.

FARMACOPÉIA Brasileira. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1988. parte I.

FARMACOPÉIA Brasileira. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2001. parte II, fasc.3, monografia 150.

FARMACOPÉIA Brasileira. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2003. parte II, fasc.5, monografia 236.

FONSECA, C. A. S.; LEAL, J.; COSTA, S. S.; LEITÃO, A. C. Genotoxic and mutagenic effects of guarana (*Paullinia cupana*) in prokaryotic organisms. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 321, p. 165-173, 1994.

GALDURÓZ, J. C.; CARLINI, E. A. Acute effects of the *Paullinia cupana*, "Guaraná" on the cognition of normal volunteers. **Revista Paulista de Medicina**, São Paulo, v. 112, n. 3, p. 607-611, 1994.

GALDURÓZ, J. C.; CARLINI, E. A. Acute effects of long-term administration of guaraná on the cognition of elderly volunteers. **Revista Paulista de Medicina**, São Paulo, v.114, n.1, p.1073-8, 1996.

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

GRIEVE, M. A. **Modern herbal**. New York: Hafner, 1967. p. 381.

GUYOT, J. C.; ARNAUD, P.; BECOURT, P.; CASSIERE, J. P.; CHULIA, D.; DUCHÊNE, D.; ERRAND, D.; GOUAIHARDU, J.; LANGLOIS, C.; LEQUIEN, C.; MALFOID, F.; OURCELOT, Y.; RENOUX, R.; SERGOT, S.; TOURE, P. Commentaires relatifs aux methods générales d'analyse des formes orales solides récemment introduites dans le pharmacopées française et européenne. Rapport d'une commission SFSTP. **Sciences et Techniques Pharmaceutiques Pharma Pratiques**, Montpellier, v.5 n. 6, p. 432-494, 1995.

HAUSNER, H. H. Friction Conditions in a mass of metal Powder. **International Journal of Powder Metallurgy**, Princeton, v. 3, p. 7-13, 1967.

- HEBERLÉ, G. **Desenvolvimento do produto seco por aspersão de *Cecropia glazioui* Sneth.** (Cecropiaceae). 2000. Dissertação (Mestrado)—Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2000.
- HENMAN, A. R. Guarana (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*): ecological and social perspectives on an economic plant of the central amazon basin. **Journal of Ethnopharmacology**. Florida, v. 6, n. 3, p. 311-338, Nov.1982.
- HUNTER, B. M.; GANDERTON, D. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. London, v. 24, p. 17P, 1972.
- KHAYYAL, S. E.; AYAD, M. M. Determination of purine basis in formulations and natural products. **Analytical Letters**, New York, v. 16, n. B19, p. 1525-1535, 1983.
- KIBBE, R. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. London: American Pharmaceutical Association; Pharmaceutical Press. Third edition, 2000.
- KLATSM, A.; ZALA, P. Gas chromatography of the caffeine contents of foods. **Chemical Abstracts**, v. 94, 172957z, 1981.
- LE HIR, A. **Noções de Farmácia Galênica**. São Paulo. Andrei, 6ª Ed., 1997.
- LIEBERMAN, H. A.; RANKELL, A. S.; SCHIFFMAN, R. F. Secagem. In: LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. (Ed.) **Teoria e prática na indústria farmacêutica**. Lisboa: Calouste Gulbenkian, 2001. v. 1, cap. 3, p.83-112.
- LIST, P. H.; SCHMIDT, P. C. **Phytopharmaceutical technology**. Plymouth: Latimer Trend: Boca Raton, 1989. p. 374.
- LIST, P. H.; HÖRHAMMER, L. **Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis**. Springer, Berlin Heidelberg New York, Bd VI 4, S 481.
- MARAVALHAS, N. **Estudos sobre o guaraná e outras plantas produtoras de cafeína**. Manaus: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, 1965.
- MARSHALL, K. Compressão e consolidação de sólidos em pó. In: LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. (Ed.) **Teoria e prática na indústria farmacêutica**. Lisboa: Calouste Gulbenkian, 2001. v. I, cap. 4, p.113-170.
- MARX, F. Analysis of guaraná seeds. II. Studies on the composition of the tannin fraction. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung**, Stuttgart, v. 190, p. 429-431, 1990.
- MARX, F.; PFEILSTICKER, K.; MAIA, J. G. S. Zur Analytk von Guarana (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*). **Deutsche Lebensmittel-Rundschau**, Stuttgart, n. 12, p. 390-392, 1985. **Chemical Abstracts**, v. 104, 67808d, 1986.

- MATTEI, R.; DIAS R.F.; ESPÍNOLA, E.B.; CARLINI, E.A; BARROS, S.B. Guarana (*Paullinia cupana*): toxic behavioral effects in laboratory animals and antioxidants activity *in vitro*. **Journal of Ethnopharmacology**, Leiden, v. 60, n. 2, p. 111-1166, 1998.
- MELLO, J. C. P.; PETROVICK, P. R. Quality control of *Baccharis trimera* (Less) DC (*Asteraceae*) hydroalcoholic extracts. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, La Plata, v. 19, n. 3, 2000.
- MELLO, J. C. P.; SANTOS, S. C. Taninos. In: SIMÕES, C. M. O; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Ed. da UFRGS, cap. 24, p.527-554, 2001.
- MIURA T.; TATARA, M.; NAKAMURA, K. SUZUKI, I. Effect of guarana on exercise in normal and epinephrine-induced glycogenolytic mice. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 21, n. 6, p. 646-648, 1998.
- MONTGOMERY, D.C. **Diseño y análisis de experimentos**. México: Iberoamérica, 1991.
- MOURA, S. **Aspectos farmacológicos de uma das frações hidrossolúveis do extrato etanólico do guaraná (*Paullinia cupana* H. B. K.)**. 1986. 57 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1986.
- NIERESTEIN, M. Catechutannins: *Paullinia tannin*. **Journal of the Chemical Society**, London, n. 121, p. 23-28, 1922.
- O'BRIEN, C. P. Drug addiction and drug abuse In: HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. (Ed.). **Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. New York: McGraw Hill, 1996. cap. 24, p. 571-572.
- PAGLIARUSSI, R. S. **Obtenção de extrato bruto de sementes de Guaraná (*Paullinia cupana*) sob a forma de pó e avaliação da influência dos processos de extração e secagem no teor de cafeína do extrato obtido**. 1999. 91 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1999.
- PIANETTI, G. A.; CARVALHO SILVA, B.; MOREIRA CAMPOS, L. M.; NUNAN, E. A.; VIANNA SOARES, C. D.; ARAUJO ALVES, B. L.; CESAR, I. C. Optimization and statical evaluation of dissolution tests for indinavir sulfate capsules. **II FÁRMACO**, Padua, v. 59, p. 921 – 927, 2004.
- SALDAÑA, M. D.; ZETSL, C. MOHAMED R. S.; BRUNNER G. Extraction of methylxantines from guarana seeds, mate leaves, and cocoa beans using supercritical carbon dioxide and ethanol. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. Washington, n. 17, p. 4820-4826, Aug. 2002.
- SANTA MARIA, A.; LOPEZ, A.; DIAZ, M. M.; MUNOZ-MINGARRO, D.; POZUELO, J. M. Evaluation of citotoxicity of guarana with *in vitro* bioassays. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. Orlando, v. 39, n. 3, p.164-167, Mar. 1998.

SCHOFIELD, E.; MBUGUA, D. M.; PELL, A. N. Analysis of condensed tannins: a review. **Animal Food Science and Technology**, n. 91, p. 21-40, 2001.

SHARGEL, L.; YU, A. B. C. **Applied biopharmaceutics and pharmacokinetics**. Prentice Hall, Connecticut, 1993. cap. 8, p. 135-167.

SIMÃO, A. M.; MURADIAN, J.; CARVALHO, J. P. P. Isolamento do pigmento vermelho natural do pó de guaraná e doseamento de cafeína no extrato clorofórmico. **Síntese**, v. 59, n. 2, p. 10-15. São Paulo, 1986.

SOARES, L. A. L. **Padronização de extrato aquoso e desenvolvimento de produto seco por aspersão de *Phyllanthus niruri* L. Euphorbiaceae (Quebra Pedra)**. 1997. Dissertação (Mestrado)- Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1997.

SOARES, L. A. L.; PETROVICK, P. R. Física da compressão. **Caderno de Farmácia**, Porto Alegre, v. 15, n. 2, p. 65-79, 1999.

SONAGLIO, D.; ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P. R.; BASSANI, V. L. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENCKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Ed.da UFGS, 2004. cap.13, p. 289-326.

SPOLADORE, D. S.; BOAVENTURA, M. A. M.; SÃES, L. A. Teor de cafeína em sementes matrizes de guaraná. **Bragantia**, Campinas, v. 4, n. 2, p. 425- 429, 1987.

TEIXEIRA, S. M. M. Estudo do mercado do guaraná. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DO GUARANÁ, 1., 1983, Manaus. **Anais...** Manaus: Embrapa, 1983. p. 157-177.

THOMAS, C.; POURCELOT, Y. Preformulation of five commercial celluloses in drug development: rheological and mechanical behavior. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, New York, v. 19, n. 15, p. 1964 – 1974, 1991.

USHIROBIRA, T. M. A. **Estudo químico, avaliação microbiológica e toxicológica pré-clínica (aguda e subcrônica) de extratos de sementes de *Paullinia cupana* H.B.K. var. *sorbilis* (Mart.) Ducke (Guaraná)**. 2003. 194 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Paraná, 2003.

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

USP 24 – The United States Pharmacopeia. 24th ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, Easton: Mack, 2000.

VOIGT, R. **Pharmazeutische Technologie**. 7 überarb. Berlin: Ullstein Mosby, 1993.

World Health Organization - WHO/PHARMA/92.559/rev.1 Quality Control Methods for Medicinal Plant Materials, Geneva, 1993.

YAMAGUTI, E.; UEMURA, L. M.; USHIROBIRA, T. M. A.; MELLO, J. C. P. Caracterização físico-química de amostras de guaraná. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE FARMACOGNOSIA, 3., 2001. Curitiba. **Resumos...** Curitiba, UFPR, 2001.

ZANIN, S. M. W.; SATO, M. E. O.; KUBICKI, K. M. Soluble granulated tea containing fluid extracts of medicinal plants. In: PHARMATECH, 5., Porto Alegre. **Programa de Resumos...** 2000, Porto Alegre: [s.n.], 2000. p. 47.

ZÉTOLA, M. **Desenvolvimento de preparações extrativas de *Lippia Alba*** (Miller) N. E. Brow Ex Brit & Wils (falsa melissa). 2000. Dissertação (Mestrado)- Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2000.

Anexo 1a

Tabela A.1 - Análise da variância das absorvâncias determinadas para as curvas de calibração de pirogalol (740 nm)

Fontes de variação	Soma quadrática	Gl	Média quadrática	F calculado	F tabelado
Regressão linear	0,419539	1	0,419539	1900,020*	4,67
Resíduos	0,002871	13	0,000221		
Falta de ajuste	0,001877	3	0,000625	6,29**	6,55
Erro puro	0,000994	10	0,000099		
Total	0,422410	15			

Variação explicada: 99,32 %

Variação máxima explicável: 99,76 %

* significativo para $\alpha < 0,05$; **Não significativo para $\alpha < 0,01$

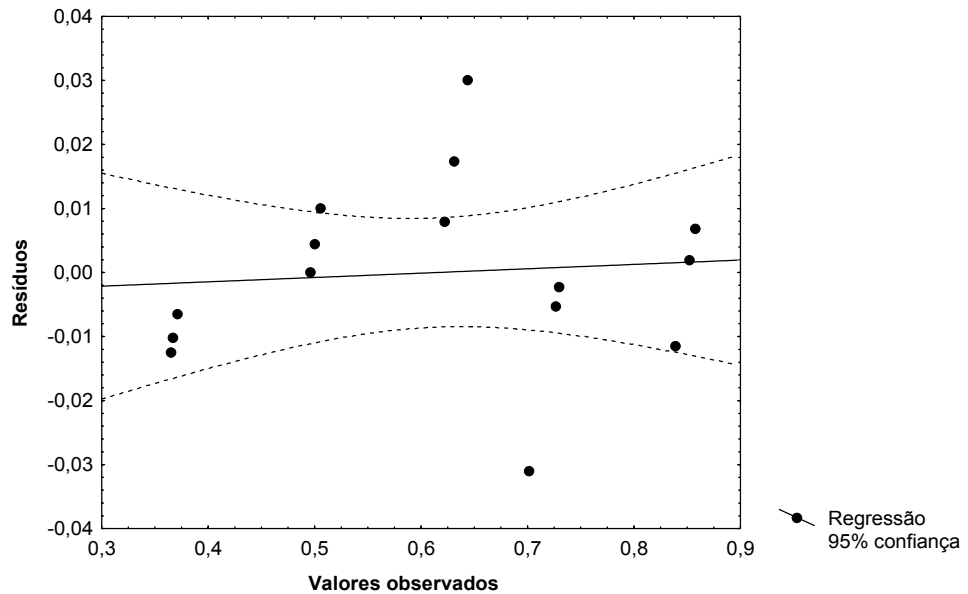


Figura A.1.1 – Distribuição dos resíduos observados da análise das curvas de calibração de pirogalol (740 nm)

Anexo 1b

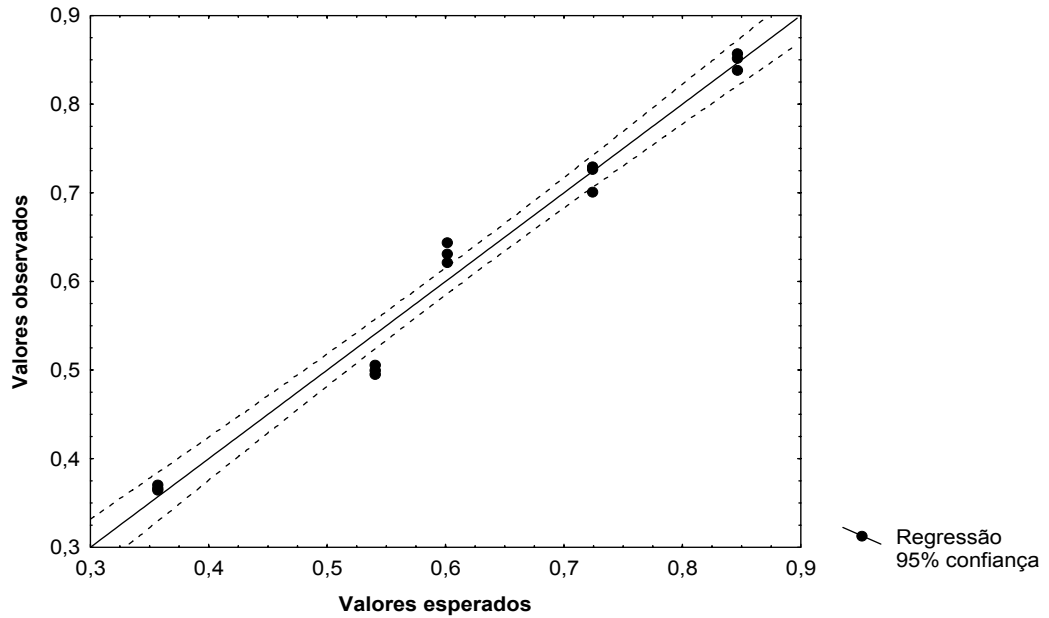


Figura A.1.2 – Correlação entre os valores esperados e observados das curvas de calibração de pirogalol (740 nm)

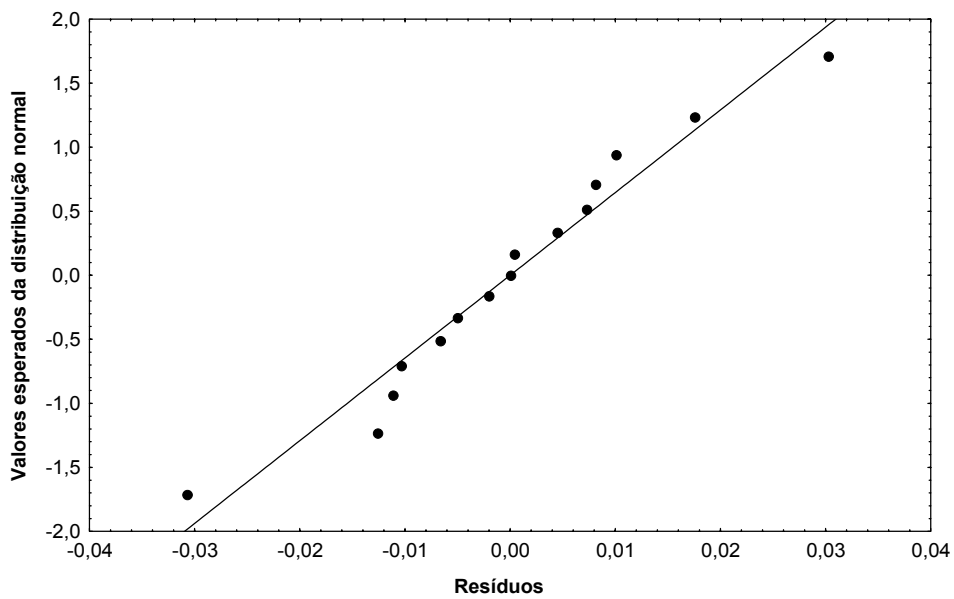


Figura A.1.3 – Curva de probabilidade normal da análise das curvas de calibração do pirogalol (740)

Anexo 2a

Tabela A.2 - Análise da variância das absorvâncias determinadas para as curvas de calibração de pirogalol (691nm)

Fontes de variação	Soma quadrática	Gl	Média quadrática	F calculado	F tabelado
Regressão linear	0,396152	1	0,396152	3651,038*	4,67
Resíduo	0,001411	13	0,000109		
Falta de ajuste	0,000636	3	0,000212	2,74**	3,71
Erro puro	0,000774	10	0,000077		
Total	0,397563	14			

Varição explicada: 99,64 %

Varição máxima explicável: 99,80 %

* significativo para $\alpha < 0,05$; ** não significativo para $\alpha < 0,05$

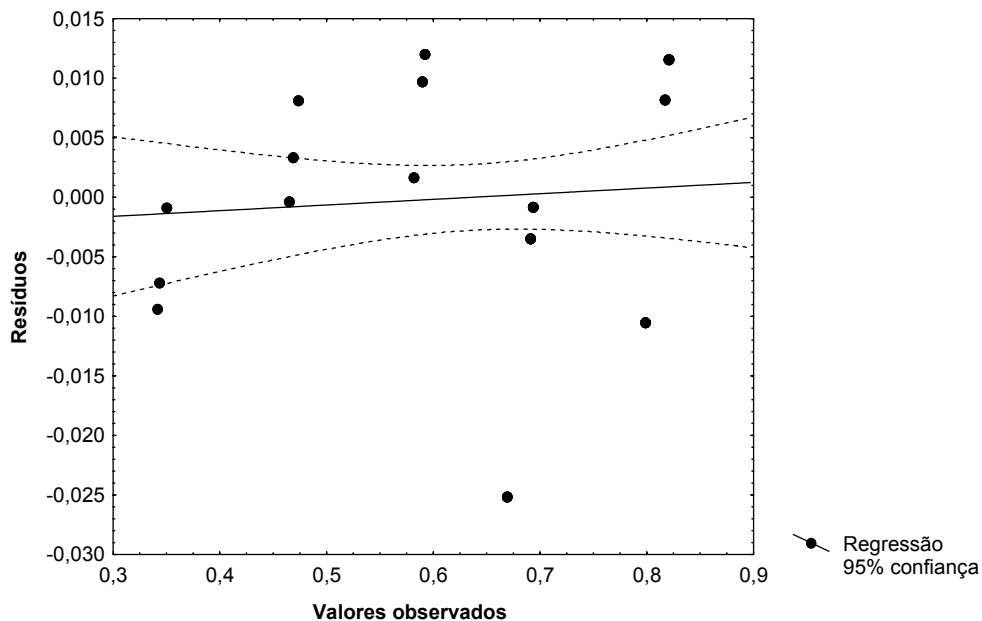


Figura A.2.1 – Distribuição dos resíduos observados da análise das curvas de calibração do pirogalol (691 nm)

Anexo 2b

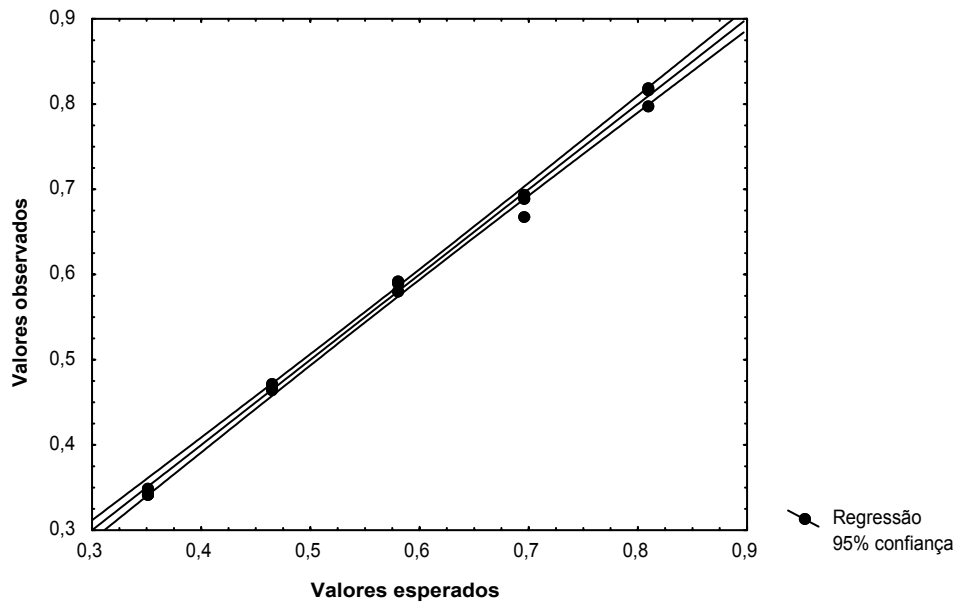


Figura A.2.2 – Correlação entre os valores esperados e observados das curvas de calibração do pirogalol (691 nm)

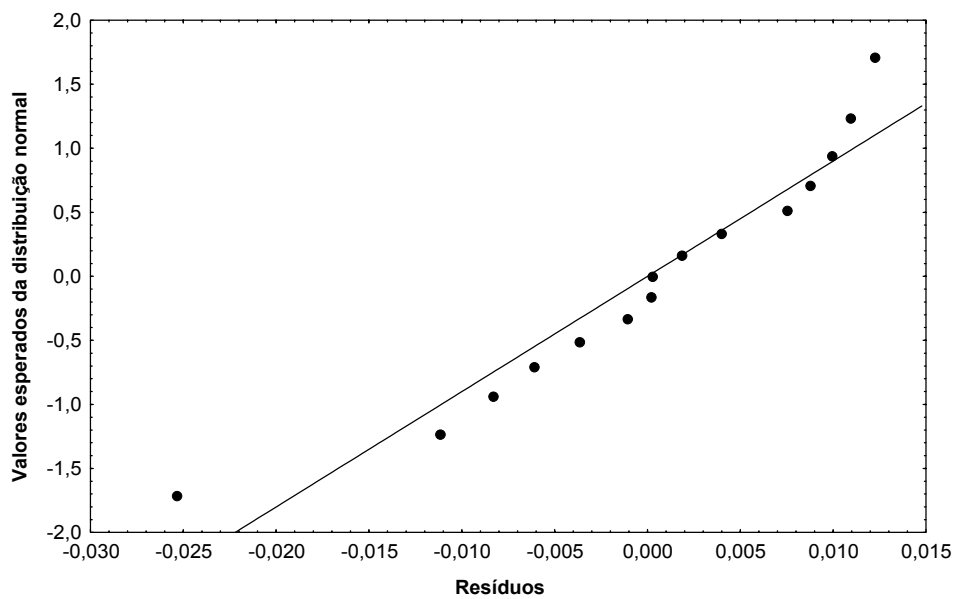


Figura A.2.3 – Curva de probabilidade normal da análise das curvas de calibração do pirogalol (691).

Anexo 3a

Tabela A.3 - Análise da variância das absorvâncias determinadas para as curvas de calibração da cafeína

Fontes de variação	Soma quadrática	gl	Média quadrática	F calculado	F tabelado
Regressão linear	1,553598	1	1,553598	80114,12*	4,67
Resíduos	0,0002521	13	0,000019		
Falta de ajuste	0,0000968	3	0,000032	2,08**	3,71
Erro puro	0,000155	10	0,000015		
Total	1,55385	14			

Variação explicada: 99,98 %

Variação máxima explicável: 99,99 %

*significativo para $\alpha < 0,05$; **não significativo para $\alpha < 0,05$

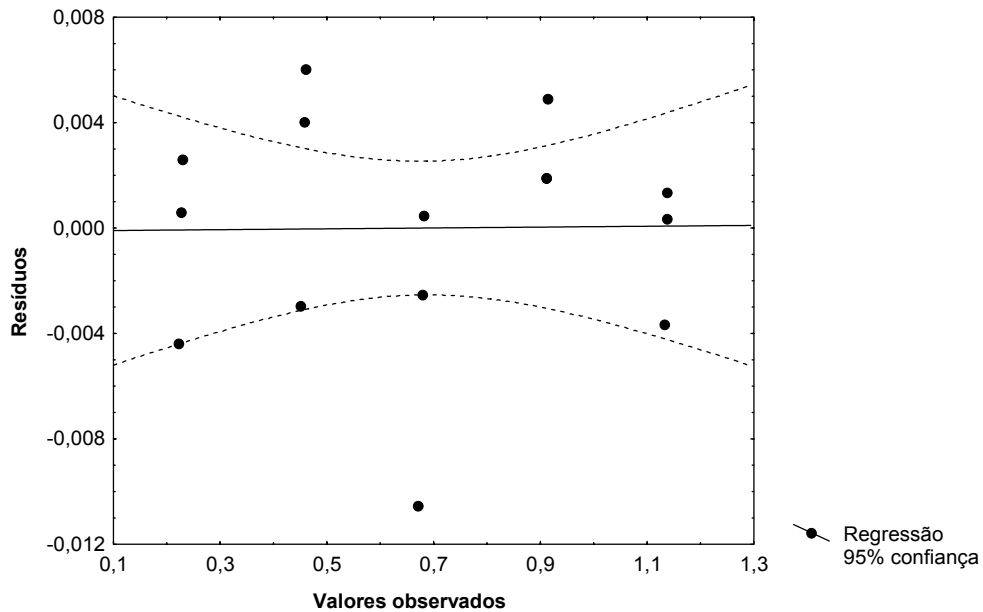


Figura A.3.1 – Distribuição dos resíduos observados da análise das curvas de calibração da cafeína

Anexo 3b

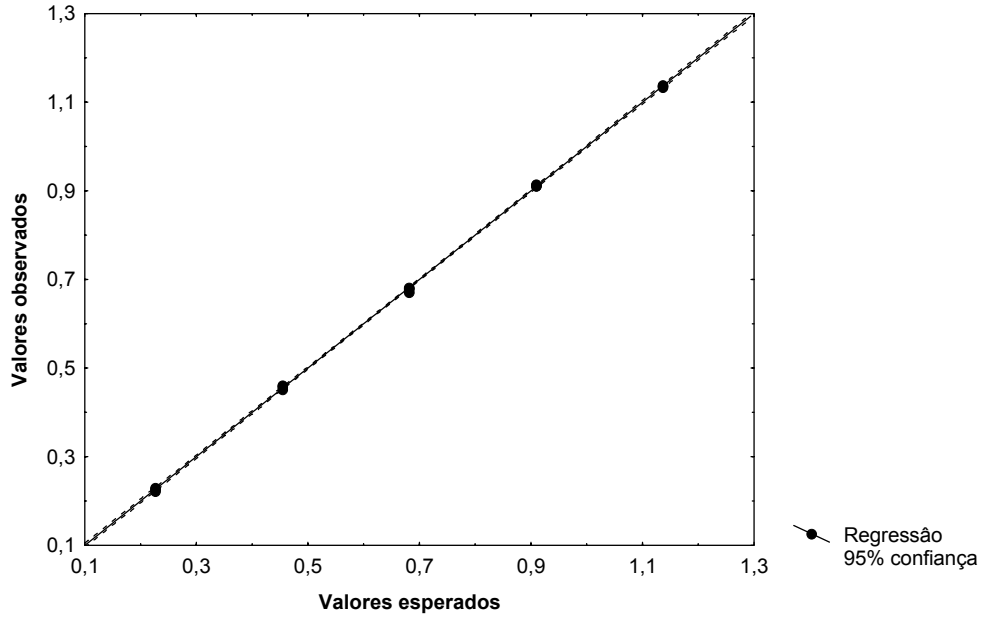


Figura A.3.2 – Correlação entre os valores esperados e observados das curvas de calibração da cafeína.

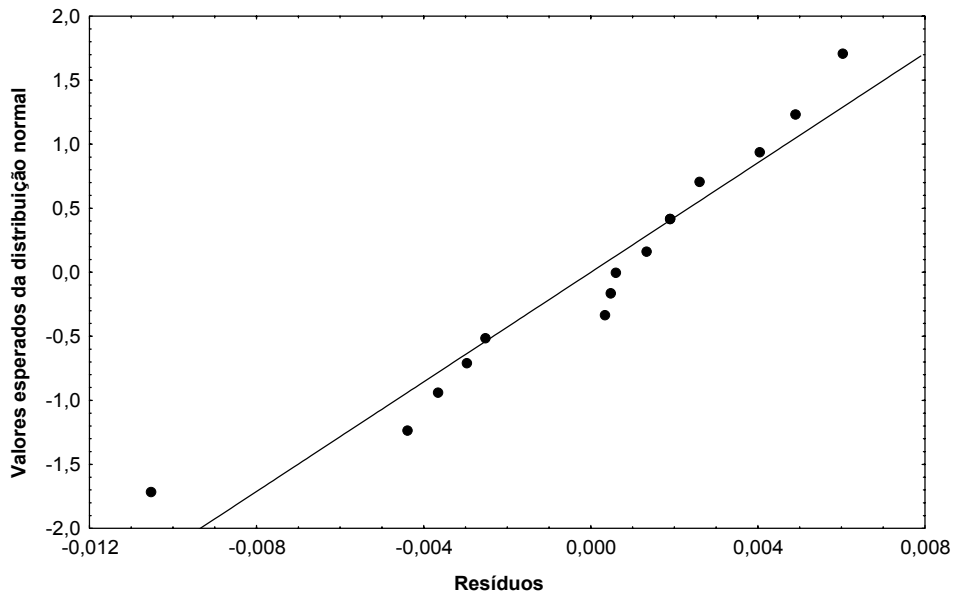


Figura A.3.3 – Curva de probabilidade normal da análise das curvas de calibração da cafeína.

Anexo 4a

Tabela A.4 - Análise da variância das absorvâncias determinadas para as curvas de calibração da fração EPA

Fontes de variação	Soma quadrática	gl	Média quadrática	F calculado	F tabelado
Regressão linear	0,182442	1	0,182442	2909,87*	4,67
Resíduo	0,001782	13	0,000137		
Falta de ajuste	0,001175	3	0,0003917	6,46**	6,55
Erro puro	0,000607	10	0,000061		
Total	0,183257	14			

Varição explicada: 99,55 %

Varição máxima explicável: 99,67 %

*significativo para $\alpha < 0,05$; **não significativo para $\alpha < 0,01$

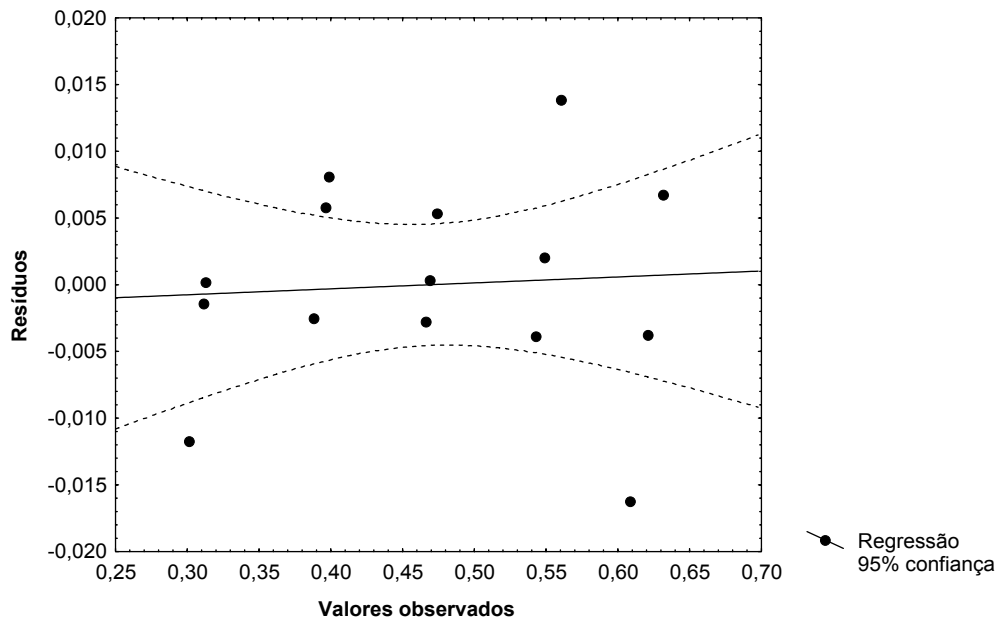


Figura A.4.1 – Distribuição dos resíduos observados da análise das curvas de calibração da fração EPA

Anexo 4b

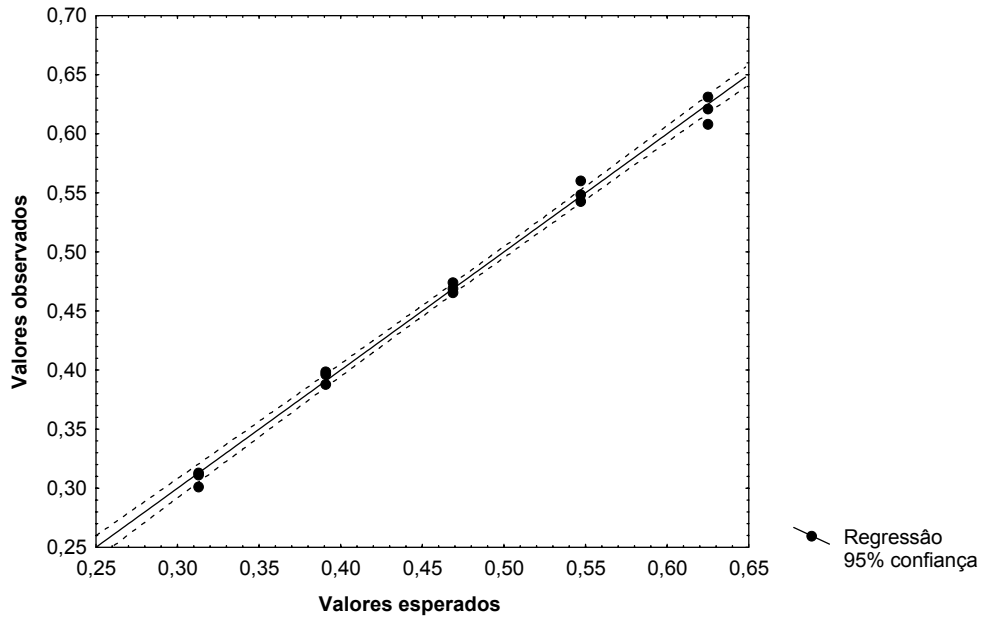


Figura A.4.2 – Correlação entre os valores esperados e observados das curvas de calibração da fração EPA

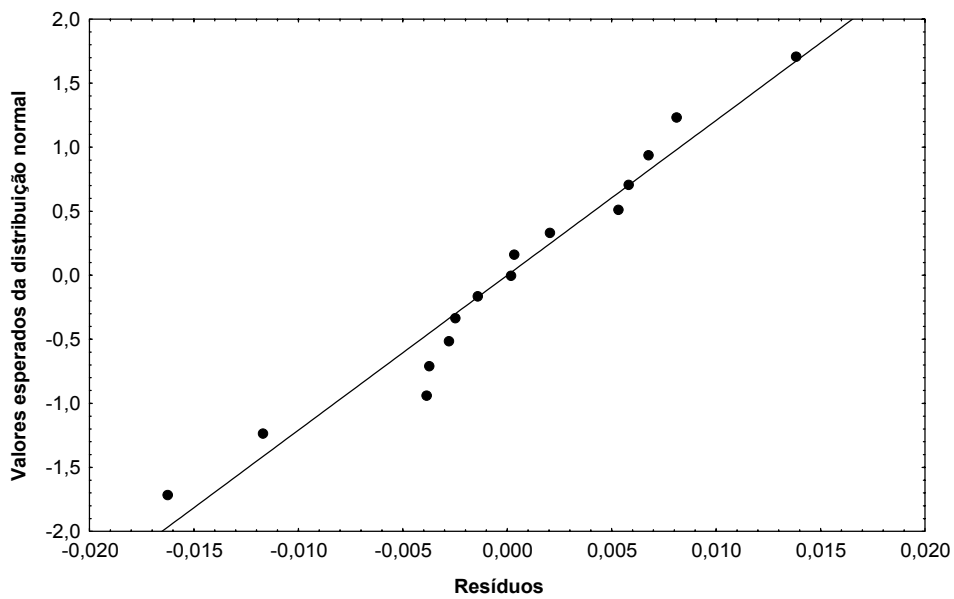


Figura A.4.3 – Curva de probabilidade normal da análise das curvas de calibração da fração EPA

MARIA INEZ DE GODOY PELOZO

Data de Nascimento – 28/05/1962

Naturalidade – Lucélia, São Paulo

Nacionalidade – Brasileira

Filiação – Derci Freitas de Godoy Pelozo e Bento Pelozo

Estado Civil – Solteira

1980 a 1983 – Graduação em Farmácia com Habilitação em Bioquímica –
Fundação Universidade Estadual de Londrina.

1986 a 1987 – Especialização em Saúde Pública –
Universidade de Ribeirão Preto em convênio com Centro de Estudos Superiores
de Londrina.

03/1984 a 10/1984 - Responsável Técnica –
Farmácia de Victorio dos Reis & Cia Ltda.Cianorte.

07/1985 a 04/1988 - Responsável Técnica –
Farmácia Souza Naves Ltda. Londrina.

04/1985 a 02/1989 - Bioquímica –
Laboratório Oswaldo Cruz de Análises Clínicas Ltda. Londrina.

02/1989 a 03/1991 - Professora de Ensino Superior –
Universidade Estadual de Londrina.

01/1992 a 06/2001 - Proprietária e Responsável Técnica –

PHARMATEC Farmácia e Manipulação de Fórmulas Ltda. Londrina.

Desde 08/1999 - Professora de Ensino Superior –

Universidade Norte do Paraná. Londrina.

01/2001 a 01/2005 - Sócia-proprietária da Oficinal –

Instituto de Estudos Farmacêuticos. Londrina.

Desde 1998 – Ministrante do curso –

“Desenvolvimento de Produtos e Técnicas de Manipulação Farmacêutica e Cosmecêutica” em parceria com o SENAC – Serviço Nacional de Aprendizagem Comercial. Curitiba.

Desde 2003 – Aluna do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas –

Universidade Estadual de Maringá – Maringá.

Área de Concentração: Produtos Naturais Biologicamente Ativos.

Sub-área: Tecnologia e Controle de Qualidade.

Apresentação de partes do presente trabalho em Congresso

Desenvolvimento e caracterização do produto seco nebulizado de *Paullinia cupana* H.B.K. var. *sorbilis* (Mart.) Ducke (GUARANÁ). Pelozo, M.I. de G; de Mello, J.C. P. In: 1º Congresso de Ciências Farmacêuticas de Cascavel – PR, Resumos..., Cascavel, Paraná, Brasil, 11 a 15 de julho de 2004.