

Renata Palhares Zschaber de Araujo

**Avaliação comparativa do conteúdo de extrato seco de Sene
(*Cassia angustifolia* Vahl) em cápsulas desenvolvidas com material
vegetal e cápsulas convencionais de gelatina**

Rio de Janeiro

2012

Renata Palhares Zschaber de Araujo

Avaliação comparativa do conteúdo de extrato seco de Sene (*Cassia angustifolia* Vahl) em cápsulas desenvolvidas com material vegetal e cápsulas convencionais de gelatina

Dissertação apresentada, como um dos requisitos para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica, do Instituto de Tecnologia em Fármacos - FIOCRUZ

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Siani

Co-orientadora: Profa. Dra. Mônica Freiman de Souza Ramos

Rio de Janeiro

2012

Renata Palhares Zschaber de Araujo

Avaliação comparativa do conteúdo de extrato seco de Sene (*Cassia angustifolia* Vahl) em cápsulas desenvolvidas com material vegetal e cápsulas convencionais de gelatina

Dissertação apresentada, como um dos requisitos para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica, do Instituto de Tecnologia em Fármacos - FIOCRUZ

Aprovado em 03 de agosto de 2012.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Antônio Carlos Siani
Instituto de Tecnologia em Fármacos – FIOCRUZ

Prof^a. Dr^a. Maria Antonieta Ferrara
Instituto de Tecnologia em Fármacos – FIOCRUZ

Prof. Dr. José Luiz Mazzei da Costa
Instituto de Tecnologia em Fármacos – FIOCRUZ

Prof. Dr. Paulo Sérgio Bergo de Lacerda
Instituto de Tecnologia em Fármacos – FIOCRUZ

Rio de Janeiro

2012

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Medicamentos e Fitomedicamentos/ Farmanguinhos / FIOCRUZ - RJ

A663

Araújo, Renata Palhares Zschaber de

Avaliação comparativa do conteúdo de extrato seco Sene (*Cassia angustifolia* VAHL) em cápsulas desenvolvidas com material vegetal e cápsulas convencionais de gelatina. – Rio de Janeiro, 2012.

92 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Instituto de Tecnologia em Fármacos-Farmanguinhos, Pós-graduação em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica, 2012.

Bibliografia: f. 78-86

1. Sene. 2. Extrato seco. 3. Cápsula. 4. Hipromelose. 5. Gelatina. I. Título.

CDD 615.32

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, ao meu marido e ao meu filho.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me amparado nos momentos difíceis e por ter colocado em meu caminho pessoas especiais que me apoiaram.

Aos meus pais, Milton e Carmen pelo amor, pelo incentivo ao estudo, pela educação e ensinamento de valores que têm orientado a minha vida.

Ao meu marido Marcio pelo amor, companheirismo e estímulo. Por ser, assim como o meu irmão Rogério, admirável exemplo de dedicação ao estudo, pesquisa e desenvolvimento profissional.

Ao meu filho Otavio pela inocente paciência e por inspirar a renovação da vida em mim.

Ao Dr. Siani e Dra. Mônica pela orientação da dissertação, pelo trabalho e persistência.

Aos colegas da empresa Capsugel que apoiaram e colaboraram com o trabalho, em especial Robson Guedes Rodrigues.

Ao Dr. J. L. Mazzei, Márcio Soares, Alexandre Xavier e Vinícius Vaz Cabral Nery da Plataforma de Métodos Analíticos de Farmanguinhos (PMA/FAR) – FIOCRUZ.

Aos proprietários e amigos da Biodoses Farmácia de Manipulação pela contribuição.

A todos aqueles que direta ou indiretamente colaboraram com o trabalho.

A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original.

Albert Einstein

RESUMO

ARAÚJO, Renata. *Avaliação comparativa do conteúdo de extrato seco de Sene (Cassia angustifolia Vahl) em cápsulas desenvolvidas com material vegetal e cápsulas convencionais de gelatina*. 2012. 93f. Dissertação Mestrado Profissional em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica – Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2012.

Atualmente, há uma crescente demanda pela disponibilidade de produtos fitoterápicos, para atender tanto o mercado privado quanto a inserção destes produtos no Sistema Único de Saúde. Para a indústria de medicamentos envolvida com a fabricação de fitoterápicos em escala, a estratégia de produção está hoje delineada pela utilização de extratos secos padronizados de espécies medicinais, sob a forma de cápsulas. As cápsulas duras comerciais mais disseminadas são elaboradas a partir de gelatina, que apresentam uma grande limitação de sua eficiência quando o material a ser encapsulado tem características higroscópicas, pois a gelatina é reconhecida por formar ligações cruzadas em condições de alta umidade e temperatura. Este fato tem sido um fator limitante para a indústria farmacêutica, especialmente no que tange à veiculação de extratos vegetais secos, desde que muitos fitoterápicos constituem pós extremamente higroscópicos, o que em última análise compromete a estabilidade do medicamento fitoterápico. O presente estudo teve como objetivo avaliar a eficiência de cápsulas de hipromelose e de gelatina contendo extrato padronizado comercial de Sene (*Cassia angustifolia* Vahl). As cápsulas de ambos os tipos foram submetidas ao estresse térmico acelerado a 35 graus Celsius (°C) e 65% de umidade relativa (UR) e a 40°C/75%U.R. por 6 meses. As medidas comparativas de estabilidade consistiram nas avaliações de (i) perda por dessecação, (ii) desintegração, (iii) suscetibilidade à quebra, (iv) atividade de água, (v) contaminação microbiana, e (vi) análise dos derivados hidroxiantracênicos e dos senosídeos A e B. Os testes físico-químicos foram realizados de acordo com os métodos farmacopeicos em vigor, e a comparação dos conteúdos químicos foi avaliada quantitativamente por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), utilizando como marcadores os senosídeos A e B comerciais, cujas presenças nos extratos foram corroboradas com a CLAE acoplada à espectrometria de massas. Os resultados obtidos na caracterização física demonstraram que as cápsulas de hipromelose apresentaram maior estabilidade em todos os parâmetros estudados, quando comparadas as de gelatina. Os resultados da análise química apontaram uma queda maior no teor de senosídeo B para as cápsulas de gelatina em relação às de hipromelose: 0,021% e 0,022%, 30°C/65%UR e 0,02% e 0,017% 40°C/75% UR, respectivamente. Estes resultados demonstram preliminarmente que há vantagens no uso da cápsula hipromelose em relação à de gelatina para encapsular o extrato seco de Sene, em um estudo de estabilidade acelerada, no entanto outras avaliações serão necessárias, incluindo um estudo de estabilidade completo no produto.

Palavras-chave: Sene. Extrato Seco. Cápsulas. Hipromelose. Gelatina.

ABSTRACT

Currently there is a growing demand for the availability of herbal products to meet both the private market and the inclusion of these products in the Unified Health System. For the pharmaceutical industry involved in the manufacture of herbal medicines in scale, the production strategy is outlined today by the use of standardized dry extracts of medicinal species in the form of capsules. The most widespread commercial hard capsules are made from gelatin, which present a major limitation of its efficiency when the material to be encapsulated has hygroscopic characteristics, because the gelatin is known to form cross-linking under conditions of high humidity and temperature. This has been a limiting factor for the pharmaceutical industry, especially in regard to the placement of dry plant extracts, since many herbal powders are highly hygroscopic, which ultimately compromises the stability of herbal medicine. The present study aimed to evaluate the efficiency of capsules of hypromellose and gelatin containing commercially standardized Senna dry extract (*Cassia angustifolia* Vahl.). The capsules of both types were subjected to accelerated heat stress at 35 Celsius degrees (°C) / 65% relative humidity (RH) and at 40°C / 75%RH for 6 months. The comparative measures of stability in the evaluations consisted of (i) loss on drying, (ii) disintegration, (iii) susceptibility to breakage, (iv) water activity, (v) microbial contamination, and (vi) analysis of hydroxyanthracene derivatives and senosídes A and B. The physicochemical tests were performed according to the pharmacopoeial methods in place, and the comparison of chemical content was assessed quantitatively by High Performance Liquid Chromatography (HPLC), using commercial senosídeos A and B as chemical markers, whose presence in the extracts were corroborated by HPLC coupled with mass spectrometry. The results of the physical characterization of the capsules showed that hypromellose capsules showed a higher stability in all these parameters, when compared with gelatin. The chemical analysis results showed a greater decrease in the concentration of senoside B for gelatin compared to hypromellose capsules: 0.021% and 0.022%, 30 °C/65% R.H. and 0.02% and 0.017% 40 °C/75% R.H., respectively. These preliminary results show that there are advantages in the use of hypromellose capsule in relation to the gelatin to encapsulate the Senna dry extract in an accelerated stability study, but further evaluation will be needed, including a complete study of stability in the product.

Keywords: Senna. Dry extract. Capsules. Hypromellose. Gelatin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01	Ilustração das estruturas vegetais e do arbusto da espécie <i>Cassia angustifolia</i> Vahl.....	23
Figura 02	Principais substâncias presentes no Sene (<i>Cassia angustifolia</i> Vahl).....	26 a 28
Figura 03	Procedimento de análise de antraquinonas em Sene.....	32
Figura 04	Ilustração de parte do processo de preparo das cápsulas e aspecto das cápsulas de hipromelose.....	43
Figura 05	Distribuição granulométrica do extrato seco de Sene.....	49
Figura 06	Representação gráfica da distribuição do peso médio das cápsulas de gelatina (A).....	51
Figura 07	Representação gráfica da distribuição do peso médio das cápsulas de hipromelose (B).....	51
Figura 08	Cromatogramas do extrato seco original (I) e do conteúdo das cápsulas duras de Sene – hipromelose (II).....	52
Figura 09	Espectro de massa dos padrões comerciais de senosídeos A e B e fragmentação principal da molécula de senosídeo.....	56
Figura 10	Espectros de massas dos sinais dos senosídeos A e B nas amostras do extrato seco (I e II) e do conteúdo das cápsulas duras de Sene – hipromelose (III e IV).....	57
Figura 11	(1) e (2) = Padrão de senosídeos A e B comerciais injetados na concentração mínima da curva de calibração. (3) = Amostra utilizada como referência. (4) = Amostra de referência (extrato + amido) fortificada com padrão de senosídeos A e B (150 µl do extrato mais 165 µl de MeOH 70%).....	60 a 61
Figura 12	Cromatogramas obtidos pela análise por CLAE das cápsulas de gelatina contendo extrato seco de Sene submetidas ao ensaio de estabilidade térmica nas condições de 30°C/65% UR (A) e 40°C/ 75% U.R.(B).....	62
Figura 13	Cromatogramas obtidos pela análise por CLAE das cápsulas de hipromelose contendo extrato seco de Sene submetidas ao ensaio de estabilidade térmica nas condições de 30°C/65% UR (A) e 40°C/ 75% UR (B).....	63

Figura 14	Representação gráfica das curvas de calibração dos senosídeos A e B.....	64
Figura 15	Representação gráfica do ensaio de recuperação do conteúdo da cápsula de hipromelose nas concentrações de 50, 100, 250 e 500 mg/5mL.....	65
Figura 16	Via de degradação dos senosídeos quando submetidos a 40°C/75% U.R. e a decomposição do extrato a 70°C.....	74

LISTA DE QUADROS

Quadro 01	Sene na lista de medicamentos fitoterápicos de registro simplificado.....	29
Quadro 02	Exemplos de separação de hidroxiantraquinonas (senosídeos) por CLAE.....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 01	Teor de derivados hidroxiantracênicos das amostras 1 e 2.....	50
Tabela 02	Dados extraídos da análise de peso médio das cápsulas de gelatina e hipromelose.....	50
Tabela 03	Dados físico-químicos do estudo de estabilidade térmica acelerada das cápsulas duras de gelatina e hipromelose contendo extrato seco de Sene.....	52
Tabela 04	Dados microbiológicos do estudo de estabilidade térmica acelerado das cápsulas duras de gelatina e hipromelose contendo extrato seco de sene.....	53
Tabela 05	Listagem dos sinais obtidos no cromatograma do conteúdo das cápsulas duras de Sene.....	58 a 69
Tabela 06	Teor de senosídeo B e A determinado por CLAE nas cápsulas de gelatina e hipromelose após estresse térmico, no estudo de estabilidade acelerada.....	64
Tabela 07	Dados de linearidade do método obtidos a partir da curva de calibração dos senosídeos A e B.....	66
Tabela 08	Análise de variância pelo método dos mínimos quadrados para os resultados de quantificação do senosídeo B.....	66
Tabela 09	Análise de variância pelo método dos mínimos quadrados para os resultados de quantificação do senosídeo A.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CLAE - Cromatografia de alta eficiência
CLAE-EM - Cromatografia de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas
CRF/SP - Conselho Regional de Farmácia do Estado de São Paulo
DAD - Detector de Arranjo de Diodos
EtOH - Etanol
EUA - Estados Unidos da América
FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz
HPLC - High Performance/Pressure Liquid Chromatography
HPMC - Hidroxipropilmetilcelulose, hipromelose
ICH - International Conference on Harmonization
IEN - Ionização por eletronebulização
IQPA - ionização química à pressão atmosférica
IUCN - International Union for Conservation of Nature
MeOH - Methanol
OMS - Organização Mundial da Saúde
PEAD - Polietileno de alta densidade
PNPIC - Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
PNPMF - Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos
Sen A - Senosídeo A
Sen B - Senosídeo B
SUS - Sistema Único de Saúde
TFA - Ácido Trifluoroacético
THF - Tetraidrofurano
UR - Umidade relativa
USP - Universidade de São Paulo
USP - United States Pharmacopeia
WHO - World Health Organization

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	19
2.1 Cápsulas duras: gelatina e hipromelose.....	19
2.2 Aspectos botânicos e farmacognósticos do Sene.....	22
2.3 Extratos secos de Sene.....	29
2.4 Análise química dos derivados de Sene.....	31
3 OBJETIVOS.....	39
3.1 Objetivo geral.....	39
3.2 Objetivos específicos.....	39
3.2.1 Metas.....	39
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
4.1 Materiais.....	40
4.2 Obtenção do extrato seco de Sene.....	40
4.3 Caracterização do extrato seco de Sene.....	40
4.3.1 Perda por dessecação.....	40
4.3.2 Determinação do teor de cinzas.....	41
4.3.3 Análise granulométrica.....	41
4.3.4 Determinação espectrofotométrica dos derivados hidroxiantracênicos no extrato seco de Sene.....	42
4.4 Preparação e caracterização das cápsulas contendo extrato seco de Sene.....	43
4.4.1 Determinação do peso médio.....	44
4.4.2 Estudo de estabilidade térmica acelerada.....	44
4.4.2.1 Perda por dessecação.....	45
4.4.2.2 Desintegração.....	45
4.4.2.3 Suscetibilidade à quebra.....	45
4.4.2.4 Atividade de água.....	46
4.4.2.5 Análise dos senosídeos nas cápsulas duras.....	46
4.4.2.6 Testes microbiológicos.....	47
5 RESULTADOS.....	49

5.1 Características farmacopeicas do extrato seco de Sene.....	49
5.2 Determinação espectrofotométrica dos derivados hidroxiantracênicos.....	49
5.3 Determinação do peso médio das cápsulas duras contendo extrato seco de Sene.....	50
5.4 Análise das cápsulas duras após estabilidade térmica.....	52
5.4.1 Caracterização física das cápsulas duras.....	52
5.4.2 Análise química do extrato seco e do conteúdo das cápsulas duras por CLAE-DAD-EM.....	54
5.4.3 Análise quantitativa do teor de senosídeos do conteúdo das cápsulas duras por CLAE.....	60
6 DISCUSSÃO.....	68
7 CONCLUSÃO.....	76
7.1 Perspectivas futuras.....	76
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77
ANEXOS.....	86

1 INTRODUÇÃO

A atenção dirigida pelas autoridades e administrações de saúde para o uso de plantas medicinais aumentou consideravelmente nos últimos anos, por diferentes razões e em diferentes setores. A Organização Mundial de Saúde tem incentivado investimentos públicos em plantas medicinais desde 1978, ao observar a crescente aceitação da fitoterapia por profissionais de saúde da atenção básica como também o aumento de seu uso pela população. Nos países em desenvolvimento, isto resultou principalmente na decisão de considerar mais seriamente a medicina tradicional e de explorar a possibilidade de utilizá-la nos cuidados primários de saúde. Em outros países, as autoridades de saúde foram obrigadas a adotar medidas impostas pelo interesse do público no uso de plantas medicinais (GUIMARÃES et al., 2006; CARVALHO et al., 2008).

A Organização Mundial de Saúde estima que cerca de 80% da população mundial chega a utilizar plantas para combater problemas típicos da atenção básica à saúde, como pressão alta, queimaduras, gripe, tosse, prisão de ventre, entre outros conforme o *Guidelines on the Conservation of Medicinal Plants* (WHO, IUCN & WWF, 2004).

Globalmente, os fitoterápicos chegam a movimentar US\$ 22 bilhões por ano (em torno de 7% do mercado mundial de medicamentos) e no Brasil representam uma parcela significativa no mercado. Não existem dados oficiais atualizados, porém, estima-se que esse mercado gira em torno de US\$ 160 milhões por ano. O fator de atração é o ritmo de crescimento das vendas internas, chegando a mais de 15% anuais, contra os 4% que representam a evolução de vendas dos medicamentos sintéticos. Considerando-se toda a cadeia produtiva, no Brasil o setor fitoterápico movimenta anualmente cerca de R\$ 1 bilhão (GUIMARÃES et al., 2006). Uma pesquisa realizada na Universidade de São Paulo-USP sinalizou que, em 2009, a previsão de crescimento do mercado brasileiro de fitoterápicos seria de 15% já para o ano seguinte (CONSELHO REGIONAL DE FARMÁCIA – CRF/SP, 2009).

Como consequência dessa ascensão, também é crescente o número de profissionais que se envolvem nas diversas atividades relacionadas a plantas medicinais e/ou fitoterápicos; seja na pesquisa, fomento ou difusão. Os estudos e

pesquisas com plantas medicinais e fitoterápicos têm repercutido positivamente na economia, como oportunidade para gerar empregos na cadeia de atividades representada pela produção no campo até a indústria. Parte deste movimento foi induzida pela consolidação das políticas públicas mais recentes do Ministério da Saúde, as quais foram publicadas para o setor de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil. A primeira foi a Portaria Ministerial MS/GM no. 971, de 03 de maio de 2006, que aprovou a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS) (BRASIL, 2006 a). A segunda foi o Decreto no. 5.813, de 22 de junho de 2006, que aprovou a Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos (PNPMF) e deu outras providências (BRASIL, 2006 b). Por meio da PNPIC, o governo visa medidas voltadas para garantir acesso seguro e uso correto das plantas medicinais e de fitoterápicos pela população, ao estimular também a adoção da fitoterapia nos programas de saúde pública. A PNPMF tem caráter amplo de pesquisa, desenvolvimento de produtos e produção de insumos, e visa primordialmente promover a utilização sustentável da biodiversidade brasileira e o desenvolvimento da indústria nacional. Convém mencionar também que o arcabouço regulatório para a cadeia produtiva e as atividades de pesquisa, desenvolvimento e validação de fitoterápicos que dão suporte ao registro destes produtos, tem evoluído consideravelmente no país, considerando-se as duas últimas décadas. A principal regulamentação em vigor para o registro de medicamentos fitoterápicos é a Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) N^o. 14 de 31 de março de 2010 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2010 a), que lidera uma série de normativas, resoluções e anexos; assim como se apoia em regulamentações anteriores mais gerais para medicamentos. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é o órgão oficial destinado a garantir que os medicamentos sejam avaliados quanto à segurança, eficácia e qualidade farmacêutica, antes de serem comercializados.

O conjunto atual de atos institucionais em vigor resulta como incentivo para a área de plantas medicinais, e espera-se um aumento no número de medicamentos fitoterápicos registrados, principalmente com base em espécies nativas. A crescente relevância dos fitoterápicos para a saúde pública, somada à obrigatoriedade dos requisitos de qualidade associada ao potencial produtivo da indústria farmacêutica nacional, revela a expectativa de um aumento de disponibilidade e consumo,

convergindo para a tendência no aumento da produção destes medicamentos. Atualmente, no Brasil, há um total de 512 medicamentos fitoterápicos registrados, sendo 80 fitoterápicos associados e 432 simples, ou seja, obtidos de derivados de apenas uma espécie vegetal. Dentre fitoterápicos registrados, as principais formas farmacêuticas cadastradas são cápsulas com 47,1%, seguindo-se os comprimidos com 20,6%. Percebe-se neste fato a predominância pelas formas farmacêuticas sólidas, com especial destaque para as cápsulas duras.

No Brasil, comercializam-se desde plantas frescas, secas, grosso modo seccionadas, moídas ou rasuradas, a princípios ativos processados por métodos apropriados de extração (destilação, percolação, maceração e outros). Com relação aos produtos comercializados, estes podem ser classificadas em formas farmacêuticas sólidas (pós, extratos secos, granulados, cápsulas, óvulos, comprimidos), semissólidas (extratos espessos, extratos moles, cremes, pomadas, emulsões, supositórios, suspensões integrais de planta fresca) e líquidas (sucos, extratos aquosos, hidrolatos, tinturas, elixires, xaropes). Caracteristicamente, os constituintes ativos são extraídos na forma de um 'fitocomplexo', constituindo um conjunto de substâncias presentes na planta. É geralmente aceito que este 'fitocomplexo' atua de maneira sinérgica, melhorando a atividade biológica e garantindo a finalidade terapêutica. Assim, a garantia da qualidade de um fitoterápico deve assegurar a coexistência destes grupos químicos presentes nas espécies vegetais, ainda que as substâncias responsáveis pela atividade biológica sejam desconhecidas ou apenas parcialmente conhecidas. A qualidade adequada para um fitoterápico é atingida quando todas as etapas do processamento da matéria-prima ativa vegetal e da manufatura do produto final são planejadas e executadas de modo a conservar na forma farmacêutica o constituinte ativo e as possíveis relações sinérgicas entre as substâncias do 'fitocomplexo' (PACHÚ, 2007).

Este cenário técnico trouxe de imediato um novo desafio para a indústria farmacêutica nacional – tanto aquelas já atuantes na produção de fitoterápicos, como os novos entrantes nesta área – representado pela produção de medicamentos fitoterápicos em larga escala, com qualidade, e atendendo às boas práticas de fabricação vigente. Convém enfatizar que a disponibilização destes produtos para o mercado com eficácia e segurança asseguradas é um princípio ético

que deve nortear todo o princípio de produção (CONSELHO REGIONAL DE FARMÁCIA – CRF/SP, 2009).

Neste contexto, as indústrias farmacêuticas têm especial interesse pelos extratos secos, pois as formas farmacêuticas sólidas trazem a vantagem da maior precisão na dosagem dos constituintes, além da facilidade de manuseio, transporte e armazenagem. Não menos importante é o fato de as formas farmacêuticas secas apresentarem maior estabilidade química, física e microbiológica (PACHÚ, 2007). Sendo este o fulcro principal da qualidade dos produtos, as empresas têm buscado constantemente as melhores soluções tecnológicas para aperfeiçoar o desempenho do encapsulamento de extratos secos, aperfeiçoando continuamente os aspectos técnicos e operacionais da produção desses, no sentido de garantir uma produção de escala homogênea em seus produtos. Dessa maneira, os extratos secos formulados constituem hoje o foco preferencial da indústria farmacêutica para a produção de medicamentos. Em sua maneira mais usual, a apresentação desses extratos tem sido como cápsulas duras de gelatina; uma forma farmacêutica que envolve um menor número de etapas de fabricação, e cuja administração é considerada mais palatável ao consumidor. Os resultados dos estudos realizados pela empresa Burke Inc., em pesquisa de opinião sobre o uso de cápsulas com 1000 pacientes, revelaram a preferência por cápsulas. Mais da metade (54%) é a favor de cápsulas, e somente 29% e 13% preferem drágeas e comprimidos (BURKE MARKETING RESEARCH, 1992).

Os extratos secos se apresentam sob a forma de pó, e perdem de 5 a 8% de água quando encapsulados. Em geral, os extratos secos são de fácil manipulação, mas oferecem desafios para a obtenção de bons rendimentos no encapsulamento em cápsulas duras de gelatina, além de exigir a atenção para a integridade das características da cápsula no produto final. Este detalhe de processo é devido às características de higroscopicidade da maioria dos extratos, derivado do fato das cápsulas duras de gelatina constituir polímeros proteicos com teor de umidade entre 13 a 16% (CAPSUGEL, 2009). O contato do extrato, especialmente os higroscópicos, com as cápsulas duras de gelatina acarreta a absorção de água pelo extrato, tornando as cápsulas quebradiças, comprometendo o revestimento (por conseguinte, também a estabilidade do conteúdo), e reduzindo a rentabilidade do processo. Este efeito persiste durante todo o período de validade do medicamento,

podendo causar alterações no perfil de dissolução e na biodisponibilidade do fitoterápico; além de aumentar a susceptibilidade ao crescimento microbiano.

Uma alternativa que vem sendo explorada pelas empresas é a utilização de cápsulas duras produzidas a partir de hidroxipropilmetilcelulose (hipromelose), um polímero vegetal derivado da celulose, que confere a este tipo de cápsula maior flexibilidade e teores de umidade comprovadamente menores que 9% (CAPSUGEL, 2008). Esta característica de umidade baixa potencializa sobremaneira este produto para encapsulamento de produtos higroscópicos, que é o caso de muitos extratos secos padronizados. Assim, esta alternativa surge como uma possível solução tecnológica, cujo impacto positivo na eficiência traria suporte para o aumento na produção de medicamentos fitoterápicos – esta uma das tarefas mais importantes neste nicho da indústria farmacêutica, assim como preconizado pelas diretrizes das atuais políticas públicas.

A presente proposta teve como objetivo estudar o encapsulamento de um extrato seco padronizado em cápsulas duras de hipromelose e comparar seu desempenho com cápsulas duras de gelatina – estas já convencionalmente utilizadas como base para os fitoterápicos existentes atualmente no mercado. Para tal, foi escolhido como protótipo o extrato seco da droga vegetal Sene (*Cassia angustifolia* Vahl), utilizado como laxativo (BRASIL, 2008). Como medida de comparação, foi mensurada a variação do conteúdo de dois de seus principais marcadores químicos: senosídeo A e senosídeo B (ambos da classe das hidroxiantraquinonas) em ambas as cápsulas. Estas medidas utilizaram Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) após o estudo de estabilidade acelerada, segundo as condições estabelecidas pela legislação vigente, RE nº 1 de 29 de julho de 2005. Adicionalmente, foram realizados os ensaios farmacopeicos: perda por dessecação, teor de cinzas, análise granulométrica, determinação de peso médio das cápsulas, bem como a determinação dos derivados hidroxiantracênicos por espectrofotometria.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Cápsulas duras: gelatina e hipromelose

Cápsulas são definidas como preparações sólidas com invólucros duros ou moles, de várias formas e capacidades, usualmente contendo uma única dose de medicamento. Elas são normalmente destinadas à administração oral. Os invólucros das cápsulas podem ser de gelatina ou outra substância, e sua consistência ajustada pela adição de substâncias tais como glicerol e sorbitol. Excipientes tais como substâncias tensoativas, opalescentes, edulcorantes, corantes autorizados e, se necessário, aromatizantes, também podem ser adicionados. As cápsulas podem ou não apresentar marcação de superfície (EUROPEAN PHARMACOPEIA, 2007).

Segundo Cade et al. (2003), as cápsulas são formas usadas amplamente na indústria farmacêutica e de suplementos alimentares, empregadas principalmente para a dosagem de sólidos, semi-sólidos, líquidos, *pellets* ou preparações à base de plantas (ex. extratos). O objetivo desta forma de dosagem é resultar em boa desintegração após serem administradas, permitindo uma dissolução efetiva da substância ativa no aparelho digestivo. É desejável que a cápsula se mantenha estável ao longo do tempo de estocagem do produto, garantindo assim a integridade do produto.

Em 1834, a primeira patente para cápsulas foi concedida ao farmacêutico Joseph Gérard Auguste Dublanc e ao estudante de farmácia François Achille Barnabé Mothès (DUBLANC; MOTHÈS, 1834). O material tradicionalmente empregado para formar cápsulas é a gelatina. Este polímero apresenta características e propriedades consideradas ideais para as cápsulas; contudo também apresenta aspectos desfavoráveis como a origem animal e o elevado conteúdo de água, o qual varia entre 10-17%. Com o decréscimo do conteúdo de água, as cápsulas de gelatina apresentam perda de elasticidade, tornando-se ainda mais sensíveis ao calor e umidade. Já em condições secas, o filme de gelatina pode apresentar mudança estática, o que pode afetar o processamento posterior. Apesar da alta difusão da gelatina como material de primeira escolha, atualmente as empresas ensaiam uma procura por alternativas de revestimento vegetal, na

tentativa de evitar as cápsulas de origem animal por razões diversas, que incluem desde o paciente vegetariano, restrições religiosas, e também a possível transmissão de doenças como a da vaca louca (HONKANEN, 2004; KU et al., 2010).

O uso de filme de derivados da celulose solúveis em água já é descrito na literatura como substituto da gelatina (OGURA et al., 1998). Os relatos sobre cápsulas obtidas a partir de derivados da celulose referem-se usualmente à pobre desintegração, especialmente quando comparada com gelatina (CADE et al., 2003). Para superar este inconveniente, Taizo et al. (1995) patentearam o uso de hipromelose (hidropropilmetilcelulose), cuja viscosidade está entre 2,4 e 5,4 centistokes, desenvolvendo uma cápsula a partir de uma solução aquosa 2% (20 °C) adicionada de carragenana, como agente gelificante, e de cálcio ou potássio como agente co-gelificante. No entanto, a baixa viscosidade resultante, devido ao baixo peso molecular das cadeias poliméricas, produziu um filme com alta fragilidade e perda de transparência do filme.

Cade et al. (2003) patentearam a invenção de um filme polimérico para cápsulas que continha na composição éteres de celulose, hidrocoloides e agentes sequestrantes numa razão de 90 para 99,98% do peso de éter de celulose; ou mistura de éteres de celulose com conteúdo de água de 2 a 10%, e de 0,01 a 5% de peso de hidrocoloides ou misturas de hidrocoloides; e 0,01 a 5% de peso de um agente sequestrante que não apresentava as desvantagens mencionadas acima. A composição do polímero desta invenção melhorou a elasticidade permitindo que fosse usado para a produção de invólucro para o encapsulamento de formulações de produtos farmacêuticos, agroquímicos, sementes, plantas, alimentos, corantes e agentes flavorizantes.

Honkanen (2004) descreveu cápsulas de hipromelose como sendo um novo tipo de cápsulas de duas partes, desenvolvidas como alternativa para as clássicas cápsulas similares de gelatina. As vantagens técnicas da hipromelose sobre a gelatina seriam: baixo conteúdo de umidade, material quimicamente inerte, e uma grande habilidade de se manterem mecanicamente íntegras em condições de baixa umidade. Adicionalmente, como derivado vegetal, o hipromelose cumpriria as restrições à origem animal, mencionadas acima.

Cole et al. (2004) demonstraram que o desempenho *in vitro* das cápsulas de hipromelose com adição de agente gelificante difere das cápsulas de gelatina,

requerendo, portanto, modificações na metodologia dos testes de dissolução para alguns ativos. Isto porque a gelatina apresenta uma característica única, por ser um agente gelificante anfotérico; ou seja, solúvel em ambos os meios gástrico e intestinal. As alternativas para gelatina requerem, entretanto, a adição de sistemas gelificantes (como polissacarídeos), que por sua vez necessitam metais catiônicos para promover a formação do gel. Estes géis também são sensíveis à presença de metais catiônicos ou ácidos que estão frequentemente presentes em meios de dissolução. Portanto, este tipo de cápsula de hipromelose contendo agente gelificante requereria acumular estudos referentes aos melhores meios de dissolução.

Ku et al. (2010) descreveram a qualificação de uma cápsula de hipromelose de alto desempenho sem agentes gelificantes, que apresentou um perfil adequado de dissolução. Além disso, a comparação entre as cápsulas de gelatina e hipromelose contendo carragenana e a de hipromelose sem agente gelificantes, demonstrou que esta última é superior em termos de resistência mecânica, higroscopicidade e compatibilidade com uma ampla faixa de ativos. A cápsula de hipromelose sem agente gelificantes demonstrou menor variação de peso, melhor maquinabilidade e extravazamento de pós, que a cápsula hipromelose contendo carragenana. Portanto, a cápsula hipromelose sem agentes gelificantes demonstrou uma aplicabilidade mais ampla que as cápsulas de gelatina no tocante ao desenvolvimento de novos fármacos, devido especialmente à sua inércia e compatibilidade para uma ampla faixa de excipientes, incluindo aqueles para formulações líquidas. Em uma segunda fase da qualificação, as propriedades de desintegração e dissolução da cápsula de hipromelose sem agentes gelificantes foram avaliadas clinicamente com base no sistema de classificação biofarmacêutica de solubilidade e permeabilidade, para 10 novos compostos, de origem sintética. Com base em seu desempenho, a cápsula hipromelose sem agentes gelificantes tem sido utilizada com sucesso em cerca de 20 novos compostos em fase de investigação (KU et al., 2010).

Dentre as cápsulas de hipromelose disponíveis no mercado, está a Vcaps® Plus, sem adição de agentes gelificantes e sem conservantes. Estas são produzidas empregando-se pequenas quantidades de agentes de moldagem no processo de fabricação, conforme a descrição da edição mais atual da *European and US*

Pharmacopeia e do *Food Chemical Codex*, que admitem invólucro das cápsulas contendo opalescentes e corantes. Nenhuma matéria-prima de origem animal é empregada. Estas cápsulas vegetais são de alto desempenho e compatíveis com diferentes tipos de produtos, incluindo os higroscópicos. São fabricadas por processo similar ao da cápsula dura de gelatina, em condições controladas equivalentes e boas práticas de fabricação (CAPSUGEL, 2008).

2.2 Aspectos botânicos e farmacognósticos do Sene

A palavra 'Sene' é de origem árabe e corresponde ao nome popular para as espécies do gênero *Cassia* (Caesalpinaceae/Fabaceae) conhecidas desde a antiguidade pelas propriedades laxantes. As espécies mais difundidas comercialmente de Sene são a *Cassia angustifolia* Vahl, conhecida pelos nomes populares de Sene da Índia e Sene de Tinnevely, e a *Cassia acutifolia* (ALONSO, 1998). A *Cassia angustifolia* é originária do sul da Península Arábica, Punjab e Somália; sendo introduzida posteriormente no sul da Índia, em especial nos territórios que lhe cunham a origem comercial, como o Sene de Tinnevely. Consiste num arbusto cuja altura pode chegar a 1,5 metros, as folhas são paripenadas compostas, com 3 a 7 pares de folíolos estreitos ou arredondados, de cor verde pálido ou verde-amarelado, crescendo silvestre preferencialmente em zonas desérticas, e está atualmente disseminada em todas as regiões semiáridas do mundo (FARMACOPEIA PORTUGUESA 8ª Ed., 2005).



Figura 01 - Ilustração das estruturas vegetais e do arbusto da espécie *Cassia angustifolia* Vahl. (fontes: Farmacopeia Portuguesa VIII, 2005 e <http://www.plantasmedicinaisfitoterapia.com/plantas-medicinais-Sene.html>).

A importância do Sene como purgativo é evidenciada pela sua inclusão e permanência na maioria das farmacopeias correntes (MARTINDALE, 1977). Os laxantes de Sene originam-se de diferentes espécies, cujas origens geográficas usualmente identificam os nomes comerciais. Entre sinônimos botânicos e comerciais para *C. angustifolia*, o manual “*A Modern Herbal*” descreve: *Sena alexandrina*, *Sena nubia*, *Cassia senna*, *Cassia lenitiva*, *Cassia lanceolata*, *Cassia officinalis*, *Cassia aethiopica*, *Sena acutifolia*, *Cassia augustifolia*, Sene Egípcio, Sene de la Palthe, Sene de Tinnevelly e Sene do leste indiano (GRIEVE, 1931). Ainda, como um exemplo da variedade descritiva do Sene, pelo menos 17 sinonímias são registradas para esta *C. angustifolia* (PLANTAMED, 2012). O fedegoso (*Cassia occidentalis* L.), uma exceção a esta nomenclatura tradicional, é nativa nas Américas (READER’S DIGEST BRASIL, 1999). No entanto, as farmacopeias brasileiras mais atuais referem-se à *Senna alexandrina* P. Miller, restringindo-se, em sua quinta edição, à descrição dos folíolos (*Sennae folium*), cujo material, quando dessecado, constitui a droga vegetal (BRASIL, 2010 a).

Tradicionalmente, tanto os folíolos (neste caso, a droga vegetal não consiste da folha inteira, mas dos folíolos removidos) quanto às sementes (vagens) são

utilizados, e de modo geral, a composição de derivados antracênicos é semelhante nos folíolos e folículos. No entanto, o teor total de glicosídeos antranóides é maior nos frutos (5%) que nos folíolos (3%); em contrapartida, estes últimos possuem maior teor em derivados da aloemodina, às quais se chegou a atribuir efeitos terapêuticos mais acentuados. Assim, na mesma dose, folíolos apresentam efeito laxante mais intenso que os frutos. Tanto as folhas quanto as vagens são colhidas e secas para serem empregadas como laxantes. Infusões (chá de Sene), tinturas e xaropes são também utilizados. A droga age irritando o intestino, o que acelera a sua motilidade. As folhas de Sene são mais comumente usadas na forma de chás, mas os extratos são frequentes em uma variedade de produtos laxativos. Como drogas farmacopeicas, as folhas e as vagens de Sene são denominadas *Sennae folium* e *Sennae fructus*, respectivamente, com o indicativo de 'promover movimentos intestinais moderados e amolecer as fezes, por exemplo, em pacientes com fissuras anais ou hemorroidas, antes de procedimentos diagnósticos, ou após alguma cirurgia ano-retal' (SCHULZ et al., 2004). Já na primeira versão da Grande Farmacopeia Brasileira, Chernoviz menciona o Sene como um dos purgativos mais seguros e mais frequentemente empregados, sendo que, para evitar cólicas eventuais, pode ser associado a substâncias aromáticas, como a canela, erva-doce, gengibre, ou outros purgantes menos energéticos (CHERNOVIZ, 1996). O Sene tem a vantagem de produzir o efeito purgativo quase imediatamente depois de sua aplicação. Apesar de tudo, deve-se ter cautela, uma vez que as doses muito frequentes ou excessivas podem resultar em sintomas de lesão de fígado (READER'S DIGEST BRASIL, 1999).

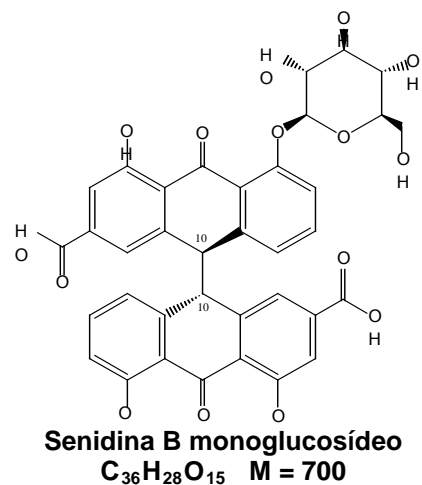
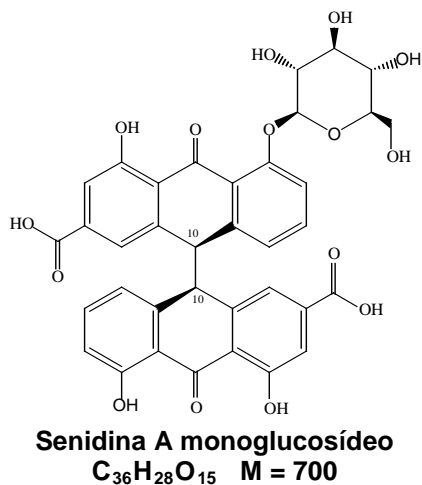
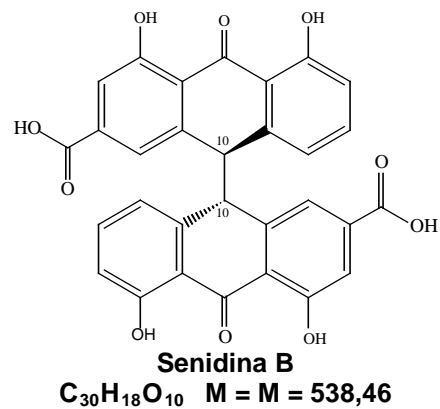
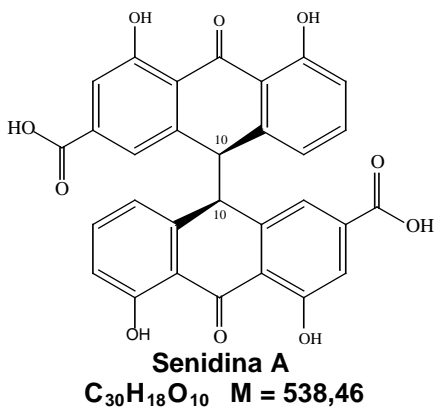
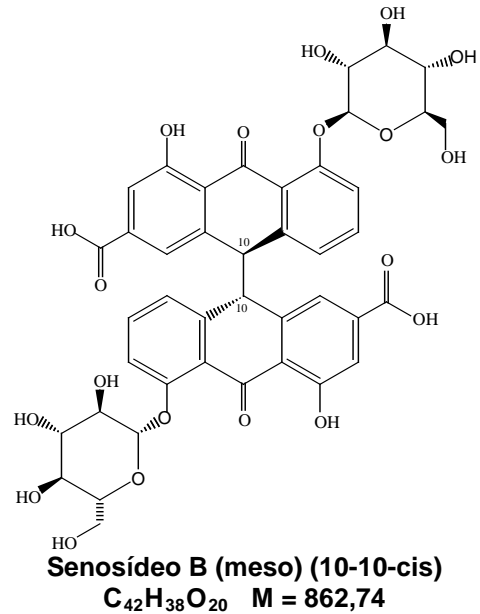
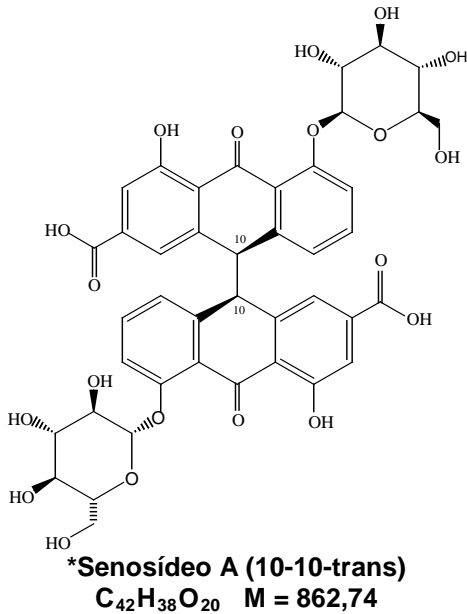
De acordo com a Farmacopeia Brasileira 5ª Edição (2010), a droga vegetal é constituída dos folíolos dessecados contendo, no mínimo, 2,5% de derivados hidroxiantracênicos expressos em senosídeo B, e 0,6% de senosídeo B e 0,5% de senosídeo A; não devendo ser utilizados antes de um ano após a colheita. Isto está em acordo com *The Complete German Commission E Monographs – Therapeutic Guide to Herbal Medicines* (THE AMERICAN BOTANICAL COUNCIL, 1998) que preconiza um conteúdo mínimo de 2,5% de glicosídeos hidroxiantracênicos, calculados com referência a senosídeos B para a droga seca.

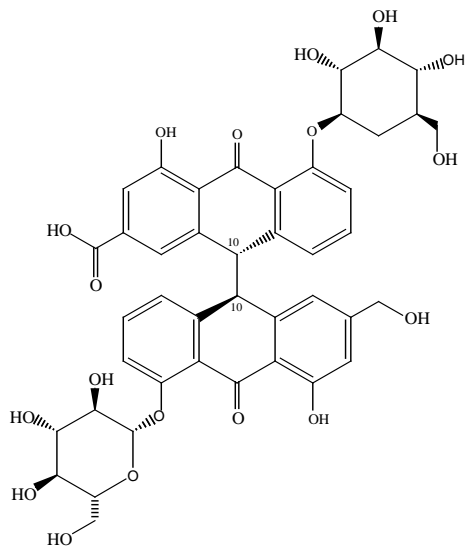
Além deste detalhe, a Farmacopeia Brasileira 5ª Edição (2010) atualizou os requerimentos para o *Sennae folium* preconizando os requerimentos para os parâmetros abaixo:

- Características organolépticas: sabor e odor.
- Descrição botânica
 - Macroscópica: aspectos botânicos relacionados aos folíolos.
 - Microscópica: aspectos micromorfológicos e cortes histológicos do material vegetal (folíolos).
- Descrição microscópica do pó da planta: coloração, aspectos micromorfológicos, diferenciação entre folíolos e raques foliares.
- Identificação:
 - Testes colorimétricos.
 - Microsublimação e colorimetria específica.
 - Cromatografia em camada delgada com eluentes e reveladores químicos específicos de extratos alcoólicos pré-definidos da droga vegetal; medidas de Rf.
- Ensaio de Pureza:
 - Material estranho: sujidades e raques foliares.
 - Conteúdo de água.
 - Cinzas totais.
- Doseamento dos derivados hidroxiantracênicos: espectrofotometria; Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

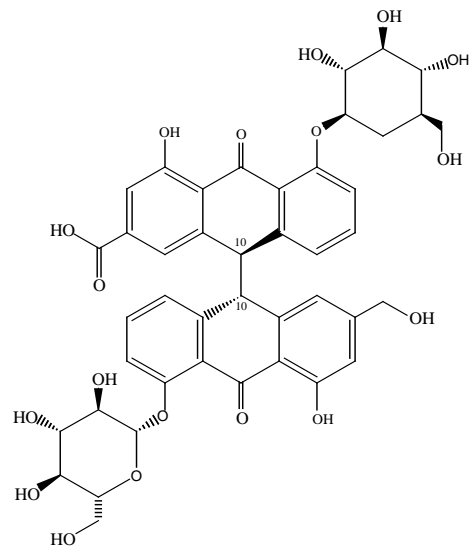
As principais antraquinonas constituintes do Sene são os glicosídeos hidroxiantracênicos diméricos cujas agliconas são compostas de emodina de aloés e/ou de reina. A maior concentração é de senosídeos A e B (classe das reína-diantronas), par de estereoisômeros cujas agliconas (senidina A e B) são diantronas derivadas de reína. O conteúdo químico do Sene também inclui pequena quantidade de glicosídeos monoméricos e antraquinonas livres, entre as quais se destacam aloeemodina, crisofanol, reína (ALONSO, 1998); além de pequenas quantidades de flavonoides e outros derivados minoritários do naftaleno (WHO, 1999), demonstrados na Figura 02. Os senosídeos A e B são substâncias isoméricas

amarelas e cristalizáveis, solúveis em álcool e pouco solúveis em água; constituindo-se na base do controle químico da qualidade da droga vegetal, e medicamentos derivados de Sene.

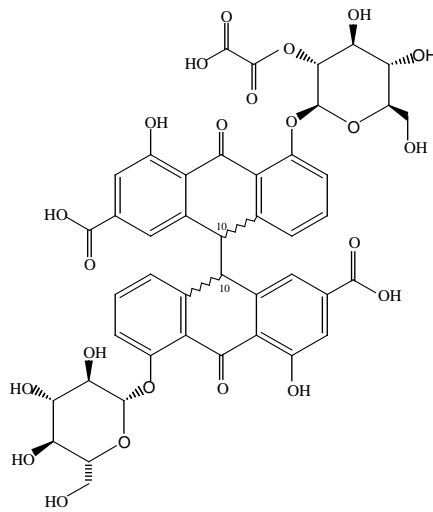




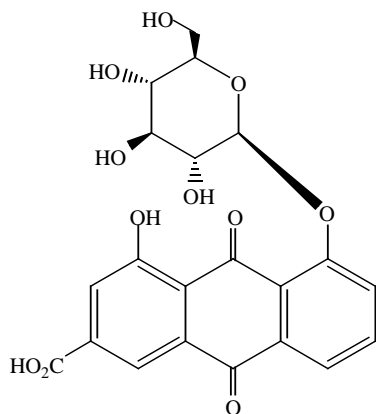
Senosídeo C (10-10-trans)
 $C_{42}H_{40}O_{19}$ $M = 848,8$



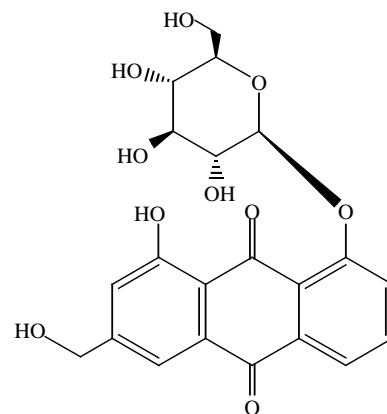
***Senosídeo D (meso) (10-10-cis)**
 $C_{42}H_{40}O_{19}$ $M = 848,8$



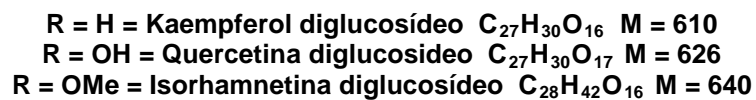
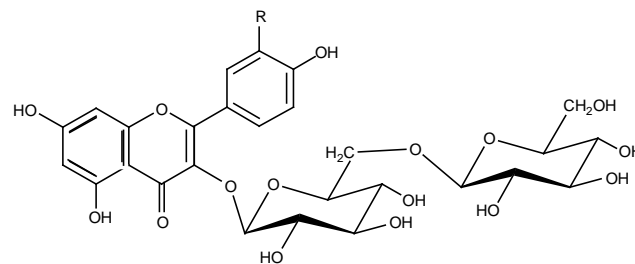
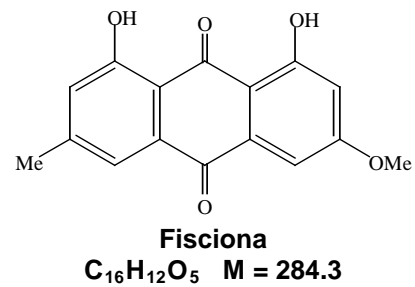
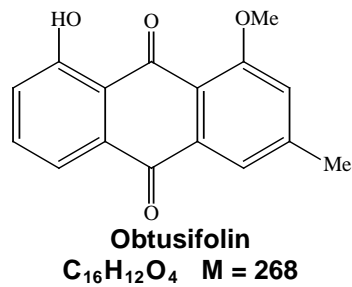
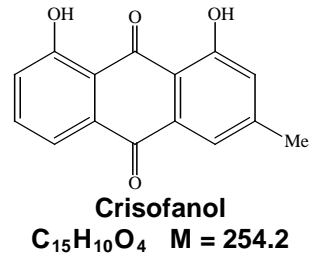
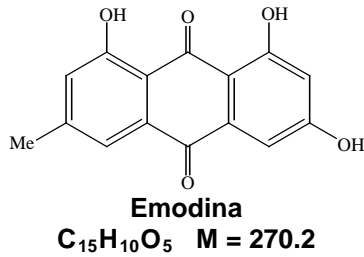
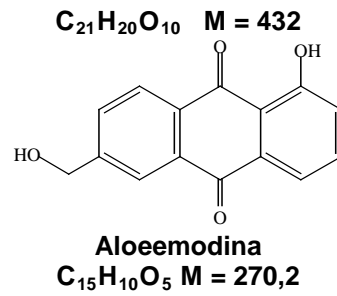
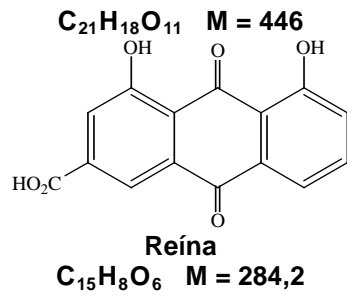
****Senosídeo E**
 $C_{44}H_{38}O_{23}$ $M = 934$



Reína 8-glucosídeo



Aloeemodina 8-glucosídeo



* **Senosídeo A1** = isômero ótico de Senosídeo A; **Senosídeo D1** = isômero ótico de Senosídeo D.

** Senosídeo E = literatura não específica estereoquímica da ligação dimérica C₁₀-C₁₀.

Figura 02 - Principais substâncias presentes no Sene (*Cassia angustifolia* Vahl.)

A partir da definição oficial de fitoterápico como o medicamento obtido a partir de plantas medicinais, empregando-se exclusivamente derivados de droga vegetal (extrato, tintura, óleo, cera, exsudato, suco, e outros) (BRASIL, 2010 b) e das possíveis modalidades de registro de fitoterápicos, o Sene está entre aqueles aos quais se permite o registro simplificado; lembrando que os compostos vegetais devem estar em formas padronizadas, com a caracterização qualitativa e quantitativa dos seus principais ativos, fornecendo os requisitos de qualidade, efetividade e segurança exigidos em uma preparação farmacêutica moderna conforme a RDC 14 (BRASIL, 2010 b). O quadro abaixo resume as informações descritas na Instrução Normativa nº 5 (BRASIL, 2008), que suportam a inclusão do Sene na Lista de Medicamentos Fitoterápicos de Registro Simplificado.

Nomenclatura botânica	<i>Senna alexandrina</i> Mill., <i>Cassia angustifolia</i> Vahl ou <i>Cassia senna</i> L.
Nome popular	Sene
Parte usada	Folhas e frutos
Padronização/Marcador	Derivados hidroxiantracênicos expressos em senosídeo B
Derivado de droga vegetal	Extratos/tintura
Indicações/Ações terapêuticas	Laxativo
Dose Diária	10 a 30 mg de derivados hidroxiantracênicos expressos em senosídeo B
Via de Administração	Oral
Restrição de uso	Venda sem prescrição médica

Quadro 01 - Sene na lista de medicamentos fitoterápicos de registro simplificado
Fonte: Instrução Normativa nº5 (BRASIL, 2008)

2.3 Extratos secos de Sene

Estabelecer a dose adequada e eficiente é provavelmente o aspecto mais controverso da fitoterapia contemporânea. Muitas vezes é necessário administrar muitas cápsulas ou comprimidos contendo a droga vegetal pulverizada (pó da planta) para atingir a dose terapêutica o que acarreta a não aderência do paciente ao tratamento. Uma solução para simplificar o esquema posológico é a utilização de

extrato seco padronizado, onde os componentes químicos do vegetal são ajustados em níveis concentrados e conhecidos. A padronização é utilizada para assegurar lote a lote as especificações do teor de ativos, em relação aos quais os ensaios clínicos de segurança e eficácia foram estabelecidos e documentados (FERREIRA, 2010). Extratos secos são preparações sólidas obtidas pela evaporação do solvente utilizado na sua preparação. Estes, geralmente, apresentam no mínimo, 95% de resíduo seco, calculados como percentagem de massa. Os extratos secos padronizados são ajustados para ter um conteúdo definido de constituintes, usando materiais inertes adequados (THE AMERICAN BOTANICAL COUNCIL, 1998). Os extratos secos, quando preparados adequadamente, apresentam inúmeras vantagens frente à forma fluída convencional, tais como: menor espaço necessário para o armazenamento, maior concentração, estabilidade e facilidade de padronização dos princípios ativos presentes nas plantas, o que aumenta o valor agregado do produto (SOUZA, 2007).

No caso do Sene, um levantamento no CENTRAX BULAS (2010) aponta três medicamentos fitoterápicos contendo o extrato seco em cápsulas duras de gelatina disponíveis no mercado. Estes possuem em geral as composições abaixo:

Medicamento 1

Cada cápsula contém:

Extrato seco de <i>Cassia angustifolia</i> Vahl, (Sene)	100 mg
Excipiente (Amido) q.s.p	1 cápsula

Tendo o extrato padronizado em 10-11% de glicosídeos hidroxiantracênicos calculados como senosídeos B. Cada cápsula contém 10 mg de glicosídeos hidroxiantracênicos calculados como senosídeo B.

Medicamento 2

Cada cápsula contém:

Extrato seco de <i>Cassia angustifolia</i> Vahl, (Sene)	80 mg
Excipiente (Amido) q.s.p	300 mg

Tendo o extrato padronizado em 35% de senosídeos totais. Cada cápsula contém 28 mg de senosídeos totais.

Medicamento 3

Cada cápsula contém:

Extrato seco de <i>Cassia angustifolia</i> Vahl, (Sene)	350 mg
Excipiente (Amido) q.s.p	1 cápsula

Tendo o extrato padronizado em 2,5% de glicosídeos hidroxiantracênicos calculados como senosídeos B. Cada cápsula contém 8,75 mg de glicosídeos hidroxiantracênicos calculados como senosídeo B.

No entanto, apesar de apresentarem um baixo teor de umidade, e na manipulação de fitoterápicos serem utilizados preferencialmente para o preparo de pós, cápsulas e comprimidos (BRASIL, 2005), os extratos secos ainda são higroscópicos, devendo ser adequadamente acondicionados com dessecantes até sua utilização ou processamento.

2.4 Análise química dos derivados de Sene

A primeira análise para a presença de antraquinonas em plantas foi desenvolvida por Hugo Bornträger, em 1897, na Alemanha, quando buscava um método rápido e preciso para detectar adulterações em cervejas e licores, que durante a entressafra de lúpulo, tinham seus princípios amargos substituídos por extratos de babosa (*Aloe sp.*), e cujo consumo contínuo provocava hepatotoxicidade nos consumidores (BORNTRÄGER, 1880). O procedimento original consistia basicamente em extrair o material em estudo com éter sulfúrico, seguido de tratamento deste extrato com amoníaco. Os ânions gerados pelas estruturas antraquinônicas livres produziam uma coloração avermelhada característica, que era revertida pela adição de ácido.

No decorrer do século XX, a descoberta de Bornträger (1880) foi adaptada e amplamente utilizada para várias outras espécies utilizadas com fins medicinais, entre elas Cáscara Sagrada (*Rhamnus purshiana* L.), Ruibarbo (*Rheum palmatum* L.), Frângula (*Rhamnus frangula* L.) e Sene (*Cassia angustifolia* Vahl.). O procedimento aplicado às drogas vegetais foi gradualmente variado, incluindo principalmente a introdução inicial de uma hidrólise oxidativa ácida de moléculas

diméricas como os senosídeos, a fim de garantir o cômputo das hidroxiantraquinonas glicosiladas (não extraídas pelo éter) no resultado final da análise (LONGO; MEINARDI, 1965).

Em resumo, tanto o método aplicado às folhas quanto aos produtos derivados do pó de Sene fundamentam-se na sequência de extração em meio aquoso, remoção das geninas antraquinônicas, clivagem oxidativa das di-antrons e hidrólise ácida, para resultar nas geninas antraquinônicas monoméricas. Estas são então determinadas colorimetricamente, pela reação de Bornträger; sendo os glicosídeos totais usualmente calculados sobre o teor de senosídeo B (SCHULZ, et al. 2004). Este procedimento consolidou-se no método que hoje integra a maioria das farmacopeias do mundo, e pode ser resumido no esquema da Figura 3 (FARMACOPEIA BRASILEIRA 4ª ed., 1988):

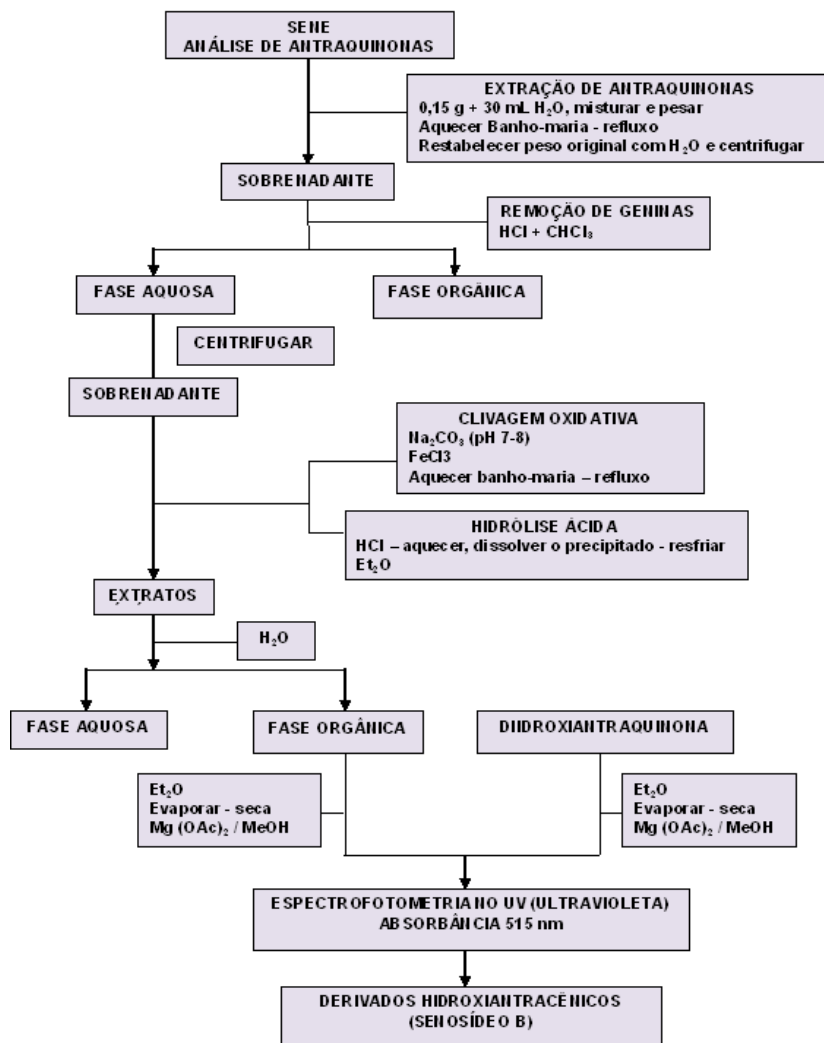


Figura 03 - Procedimento de análise de antraquinonas em Sene (fonte: Procedimento de análise de Sene segundo a Farmacopéia Brasileira, 1988).

Apesar de adequar-se à questão farmacopeica da garantia da eficácia pelo conteúdo químico total de hidroxiantraquinonas, este procedimento baseado na formação de derivados coloridos pela ação de álcali sobre as agliconas liberadas não é específico, desde que não distingue entre os senosídeos isoméricos A e B, mas sim fornece o conteúdo total de senosídeos. Além disso, o risco persiste na exatidão da análise, desde que bi-antronas C-C (como os senosídeos) podem não ser completamente oxidadas para antraquinonas (LEMLI, 1965). Estes motivos impulsionaram o aperfeiçoamento dos métodos mais diretos para analisar o conteúdo químico em Sene (e outras drogas vegetais) – como a colorimetria sobre o conteúdo original da droga/extrato, e a aplicação de CLAE.

O desenvolvimento de ensaios precisos para o controle químico do Sene e de seus fitoderivados permaneceu, durante longo tempo, retardado devido à imprecisão do conhecimento sobre o princípio ativo na droga, (HABIB, 1980). Convém mencionar também que os métodos de análises envolvendo o conteúdo químico de espécies de Sene tiveram o seu desenvolvimento pautado na droga vegetal. Desde os primeiros estudos científicos até meados de 1960, os esforços foram, mormente, concentrados na questão do controle de qualidade farmacêutico da droga disponibilizada para a população.

Curiosamente, esta mesma dificuldade, associada aos desvios inerentes na precisão do controle botânico, levaram Fairbairn et al. (FAIRBAIRN; SALEH, 1953; FAIRBAIRN et al., 1958; FAIRBAIRN; SCHRESTHS, 1967; FAIRBAIRN; MOSS, 1970), complementados posteriormente por Kobashi et al. (1980) e Dressen et al. (1981), a desenvolver modelos de controle biológico para verificar os efeitos de extratos de Sene, frações, substâncias isoladas e misturas destas, quando ensaiados *in vitro* sobre bactérias dos tratos intestinais de ratos, camundongos e humanos; assim como medidas das variações nos períodos de defecação e consistência das fezes de animais tratados. A maior parte destes ensaios foi realizada concomitantemente à aplicação da cromatografia de papel a estes metabólitos, aplicada inicialmente por Shibata et al. (1950); o que foi decisivo para os avanços alcançados nas duas décadas seguintes. Estes avanços incluíram uma maior precisão na identificação estrutural dos constituintes antraquinônicos em espécies de Cassia (FRIEDRICH; BAIER, 1973; FAIRBAIRN; SCHRESTHS, 1967),

assim como as quantificações dos princípios purgativos nas plantas (BRENDEL; SCHNEIDER, 1974; BRENDEL; BERGER, 1974).

Os métodos analíticos para derivados de antraceno em drogas vegetais, utilizados até a metade do século passado, foram revisados por Kraus (1959), que racionalizou os avanços obtidos até então com aplicação de fluorimetria, polarografia e cromatografia e eletroforese em papel, cromatografia em coluna, e tendo como base estudos colorimétricos das substâncias.

Uma cuidadosa revisão realizada por Friedrich e Baier, sobre os resultados dos estudos então realizados até 1973, complementados com um exaustivo trabalho com base em Cromatografia em Camada Delgada (CCD), resultou na elucidação do rol de substâncias presentes nos extratos ativos de Sene (FRIEDRICH; BAIER, 1973). O autor deixou patente que, embora a base científica de validação do Sene admita a medida do teor de senosídeos como critério de qualidade da matéria-prima e produtos derivados, a composição antraquinônica dos seus extratos é mais complexa do que a simples mistura destas substâncias.

O primeiro estudo dos constituintes antraquinônicos isolados do Sene foi realizado por Stoll et al. (1949), que identificaram os senosídeos A e B, seguido do isolamento da reína (que já era conhecida) a partir da oxidação de componentes da espécie brasileira *Cassia alata* L. (HAUPTMANN; NAZÁRIO, 1950). Dois novos glicosídeos antraquinônicos, assim como aloeeomodina e traços de emodina glucosídeo foram detectados nas vagens de *C. angustifolia* por Khorana e Sanghavi (1964) e, posteriormente, o senosídeo E foi isolado do ruibarbo por Oshio et al. (1972). Estudos adicionais (FRIEDRICH; BAIER, 1973) contribuíram para aumentar o conhecimento da presença de hidroxiantraquinonas, e seus derivados de oxidação e clivagem em drogas vegetais; e o isômero ótico do senosídeo A (senosídeo A1) foi identificado nas vagens de *C. senna* (CHRIST et al., 1978). Com relação aos constituintes químicos, duas espécies de *Cassia* foram rapidamente revisadas por Lemli (1986), que também apontou a questão da isomerização nos senosídeos dímeros. A partir do estabelecimento das estruturas das substâncias, deslançou tanto o desenvolvimento das análises químicas de hidroxiantraquinonas quanto a proposição de métodos mais rápidos e eficientes para extrações de componentes específicos de plantas contendo este tipo de substâncias (LADDHA, 2009).

O diagnóstico e a detecção colorimétrica das antraquinonas em vegetais evoluiu conjuntamente com os procedimentos utilizados para a separação e identificação destas substâncias, quando originalmente se empregavam meios químicos envolvendo clivagem, hidrólise e extrações em diferentes pHs (KUSSMAUL; BECKER, 1947). O método espectrofotométrico para análise dos senosídeos foi desenvolvido por Auterhoff e Kinsky (1965) e mais tarde aperfeiçoado por Brendel e Schneider (1974), o que permitiu corrigir os resultados obtidos originalmente muito altos para o teor de senosídeos. A fidelidade dos resultados analíticos no acesso do conteúdo de antraquinonas diméricas ainda avançou mais com o estudo de Habib e El-Sebakhy (1980), por intermédio de um procedimento mais elaborado no preparo da amostra, no sentido de diferenciar os monômeros carboxílicos presentes, principalmente os glicosídeos de réina (SCHULZ et al., 2004).

O estabelecimento do método colorimétrico, até sua consolidação nas farmacopeias, ainda passou por muitas etapas de aperfeiçoamento, desde a adequação contínua do preparo da amostra a ser analisada, até a proposição de variantes técnicas e consequentes validações analíticas. Estas últimas derivaram principalmente da introdução paulatina de novas tecnologias nas análises orgânicas, considerando tanto novos equipamentos, novas e mais eficientes fases cromatográficas, reveladores químicos inéditos para antraquinonas, etc. (LAWRENCE; FREI, 1973) Neste contexto, também contribuíram o surgimento de novos métodos e adaptações inéditas de métodos existentes, como CLAE associada a análises densitométricas (DEQUEKER et al., 1964; SHAH et al., 2000; AKTAR et al., 2008), cromatografia associada à partição iônica (KOMOLAFE, 1978; SAGARA et al., 1987), eletroforese (ZWAVING, 1974; LEMMENS, 1977) e outras (KRAUS, 1959).

Todavia, de uma maneira geral, a maioria dos métodos desenvolvidos neste contexto de caracterização e quantificação das hidroxiantraquinonas sempre apresentou uma forte dependência da etapa de preparo das amostras para análise; considerando que essas contêm misturas de glicosídeos e substâncias não glicosiladas (com diferenças marcantes de solubilidades) igualmente importantes para a eficácia dos fitocomplexos de Sene. Estes motivos impulsionaram a busca por consolidar meios mais diretos para analisar o conteúdo de senosídeos em Sene

(e outras drogas vegetais) – como a aplicação da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), em inglês *High Performance/Pressure Liquid Chromatography (HPLC)*. Neste contexto, embora a metodologia colorimétrica, com base na determinação do teor de senosídeos, ainda seja o principal suporte para o controle de qualidade do Sene nas farmacopeias internacionais, a técnica de CLAE vem sendo gradualmente implantada como método preconizado de análise farmacopeica. Esta novidade foi recentemente incorporada na 5ª edição da Farmacopeia Brasileira (2010).

A CLAE é uma técnica cromatográfica que se caracteriza por usar alta pressão aplicada à fase móvel. Isso permite que se utilizem partículas de diâmetro reduzido (na ordem de 5,0 μm) na fase estacionária que consiste no recheio da coluna cromatográfica. O aumento da área superficial produz maior poder de absorção, promovendo uma separação mais eficiente dos componentes da amostra. Assim, esta técnica permite lançar mão de colunas pequenas, menores quantidades de amostra (escala de μL) e economia de fase móvel. O acoplamento do cromatógrafo com o espectrômetro de massas combina as vantagens desta cromatografia (alta seletividade e eficiência de separação) com as vantagens da espectrometria de massas (obtenção de informação estrutural, massa molar e aumento da seletividade). A técnica que acopla a cromatografia líquida à detecção de massas é conhecida como CL-EM (CLAE-EM). Este acoplamento funciona melhor quanto menos cada instrumento em separado é afetado pela conexão entre eles; assim como não devem ocorrer modificações químicas não controladas do analito e perda de amostra durante esta transição. Por este motivo, a maneira que ocorre o interfaceamento entre o cromatógrafo e o detector é fundamental para a fidelidade das análises (CHIARADIA et al., 2008).

A aplicação da técnica de CLAE aos constituintes de espécies do gênero *Cassia* desenvolveu-se entre meados de 1970 e 1980 (RAI et al., 1975; GÖRLER et al., 1979; HAYASHI et al., 1980; KOMOLAFE, 1981; DUEZ et al., 1984). Como para o método colorimétrico, as análises de hidroxiantraquinonas por CLAE evoluíram nas últimas décadas de maneira par e passo com os ganhos tecnológicos dos equipamentos e das colunas de separação cromatográfica. Uma breve revisão da literatura (já excluindo as referências acima citadas) dos estudos mais pertinentes sobre este assunto está resumida no Quadro 02.

Somado aos estudos de isolamento e identificação, assim como a maior disponibilidade dos componentes antraquinônicos do Sene, a técnica de CLAE se estabeleceu gradativamente como um método quantitativo. Muitos artigos sobre quantificação de antraquinonas glicosiladas surgiram nas duas últimas décadas do século passado (Quadro 02), culminando mais recentemente com a aplicação da técnica de CLAE acoplada à Espectrometria de Massas (CLAE-EM) (STUPPNER; STURM, 1996; LIAO et al., 1998; DÁVID et al., 2009). Esta técnica hifenizada não só contribuiu para estabelecer um perfil químico mais preciso para a droga vegetal (DEMIREZER et al., 2011), como também para identificar a presença de antraquinonas inéditas nos seus extratos e frações (TERREAUX et al., 2002; XU et al., 2012).

Entre as modalidades de detecção mais utilizadas está a ionização por eletronebulização (IEN), em inglês *electrospray ionization*, que representa a fonte de ionização do analito localizada na interface do sistema. Devido ao modo de obtenção dos íons por esta fonte de ionização, a sua aplicação é favorecida em compostos ionizáveis em solução e compostos altamente polares que podem ser facilmente ionizados. A ionização ocorre diretamente na solução, o que evita a degradação dos compostos sensíveis. Uma variação desta técnica é a ionização química à pressão atmosférica (IQPA), em inglês *atmospheric pressure chemical ionization*, que pode ser considerada uma fonte de ionização complementar à IEN, pois é aplicável a compostos apolares ou de média polaridade, voláteis e termicamente estáveis, uma vez que a ionização ocorre em fase gasosa, e também porque IQPA é aplicável a vazões maiores do eluente cromatográfico do que as suportadas por IEN. Tanto na IEN quanto na IQPA ocorre a denominada ionização suave, isto é, são formados íons pseudo-moleculares intactos, $[M+H]^+$ no modo positivo, ou $[M-H]^-$ no modo negativo, porque a energia empregada nestas fontes de ionização não é suficiente para gerar uma fragmentação significativa das moléculas do analito. Nestas fontes de ionização, mais comumente na IQPA, também pode ocorrer a formação de adutos entre os íons moleculares e Na^+ , K^+ , NH_4^+ , $HCOO^-$ e CH_3COO^- , que são espécies iônicas presentes nas fases móveis provenientes dos modificadores adicionados a elas (CHIARADIA et al., 2008).

Equipamento/coluna	Condições de análise	Material analisado	Referência
Sistema CLAE + bomba SP-800-150SD, detector UV UVILOG-5III, válvula de injeção Rheodyne Model 7125, registrador Seconic SS-250f.	Coluna Sensyu-Pak coluna (25cm x 8,0mm) com Nucleosil 5 N(CH ₃) ₂ . Fase móvel (isocrático): THF-água-HOAc (8:2:1), vazão 3,5 mL/min, detecção 280 nm.	Senosídeos A, B, C e E do extrato metanólico de ruibarbo.	Oshima & Takahashi, 1983
Bomba 6000 A, e injetor U ₆ K Waters, detector espectrofotômetro mod 450, registrador Omniscibe Waters.	Coluna µl Bondapak TM/C 18 Waters, granulometria 10 µm. Fase móvel (isocrático) 100 mL sol t-BuNH ₄ ⁺ OH 0,1N + 300 mL MeOH + 1 L água, ajuste de pH 7,5 com H ₃ PO ₄ , vazão 1,5 mL/min. Detecção 254 nm.	Padrões comerciais de senosídeos A e B: medida de isomerização com luz em 150 dias: sen B → sen A → reína.	Merle et al., 1984
Sistema (Waters): duas bombas Mod 510, controlador automático de gradiente Mod 680, DAD Mod 991.	Coluna Cosmosil 5C ₁₈ (5µm, 25 cm x 4,6 mm), pré-coluna µ Bondapak C ₁₈ Millipore. Fase móvel (gradiente linear) A+B [A = tampão: CH ₃ CN 9:1 (tampão: 0.02M NaOAc e 0.4197 M HOAc)]; B = MeOH:CH ₃ CN:1%HOAc 9:9:2, vazão 0,8 mL/min. Detecção em 280 nm.	Fitoterápico chinês (Hsiao-cheng-chi-tang) contendo sen A, sen B, emodina, flavonoides, outros	Sheu & Lu, 1995
Sistema (Waters): duas bombas W 510 S Waters, válvula de injeção Rheodyne 7125, injetor automático W 717, DAD W 996, Workstation Millenium.	Coluna inox com cartucho Nucleosil 5 C ₈ (5µm, 250x4 mm), 20 °C. Fase móvel (gradiente não linear) A+B [A = 0,02 M hidrogênio fosfato com H ₃ PO ₄ até pH 2; B = CH ₃ CN. Detecção em 435 nm (antraquinonas) e 270 nm (biantranilas).	Extratos de frutos e folhas de <i>S. angustifolia</i> e <i>S. acutifolia</i> contra padrões comerciais de 5 antraquinonas + 2 glicosídeos (quali) + 9 senosídeos, agliconas e monoglicosídeos A, A1, C, D, D1 (quali) + sen B (quanti)	Metzger & Reif, 1996
Sistema modular Waters com bomba M-6000, injetor U ₆ K, detector λ variável M-450 e módulo de dados M-730.	Coluna µl Bondapak C ₁₈ (300 x 3,9mm, partícula 10 µm). Fase móvel: MeOH:água:HOAc:THF 60:38:2:2 v/v (isocrático), vazão 0,8 mL/min, 25 °C. Detecção em 254 nm.	Sementes de <i>C. angustifolia</i> : senosídeos A e B. Medidas de recuperação.	Verma et al., 1996
Sistema modular Waters com duas bombas Mod 501, injetor U ₆ K, controlador automático de gradiente Mod 680, degasificador <i>in line</i> , DAD W 996, Workstation Millenium 2010.	Coluna Symetry C ₁₈ Waters (150 x 4,6mm, 5 µm). Fase móvel (gradiente linear binário) A+B [A = MeOH, HOAc 20:80:0,1 v/v, pH 4,0]; B = 80:20:0,1, pH 4,0], 25 °C. Vazão 0,6 mL/min (20 min)+1,0 mL/min (30 min). Detecção em 285 nm.	Folhas e vagens de <i>C. angustifolia</i> . Análise quantitativa de sen A e sen B contra curvas de calibração com padrões comerciais.	*Bala et al., 2001
Não indicado.	Coluna de sílica octadecilsilanizada (150mm x 3,9mm, 4 µm). Fase móvel: A+B (isocrática intercalada com períodos de gradiente linear) [A = água:TFA (100:0,08); B = CH ₃ CN] vazão 0,9 mL/min. Detecção 270 nm.	Quantificação de senosídeos A e B nas amostras com referência a curva analítica contendo sen A + sen B.	Farmacopeia Brasileira 5 ^a Ed. 2010.
System Agilent 1100 com sistema de bombeamento Quatpump G1311A, DAD UV-VIS G1315B, degasificador G1322A.	Otimização inicial de condições pela separação e tempo de análise, incluindo tipo de coluna e fase móvel: coluna C ₁₈ Luna (250 x 4,6 mm, 5 µm), temperatura ambiente. Fase móvel: CH ₃ CN:água+0.1% H ₃ PO ₄ (gradiente). Vazão 1,0 mL/min. Detecção em 278 nm.	Quantificação simultânea de 8 antraquinonas (glicosídeos e agliconas; mas não senosídeos), usando como padrões substâncias isoladas e certificadas de <i>C. obtusifolia</i>	Xu et al., 2012

* Condições adaptadas e utilizadas para quantificar os senosídeos por CLAE no presente estudo.

λ - Lambda = comprimento de onda

Quadro 02 - Exemplos de separação de hidroxiantraquinonas (senosídeos) por CLAE.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Realizar um estudo comparativo do desempenho (estabilidade) de cápsulas duras de gelatina e cápsulas duras de hipromelose contendo extrato seco de sene sob condições de estresse térmico.

3.2 Objetivos específicos

- Verificar comparativamente a influência de um extrato higroscópico sobre a estabilidade físico e química dos invólucros de gelatina e hipromelose
- Verificar comparativamente a estabilidade físico e química do conteúdo (extrato seco de Sene) mediante encapsulamento em gelatina e hipromelose.

3.2.1 Metas

- Obter cápsulas duras com extrato seco de sene utilizando hipromelose e gelatina
- Analisar por CLAE o teor de senosídeos A e B no extrato encapsulado em cápsulas de gelatina
- Analisar por CLAE o teor de senosídeos A e B no extrato encapsulado em cápsulas de hipromelose
- Avaliar a estabilidade química do extrato seco encapsulado em ambos os polímeros (gelatina e hipromelose) após estabilidade acelerada no período de 6 meses, em condições específicas
- Avaliar a integridade das cápsulas de gelatina e hipromelose após estabilidade acelerada no período de 6 meses, em condições específicas

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

Os excipientes e reagentes utilizados foram: Amido (Cargill, Lote nº 2514), senosideo A (Sigma-Aldrich), senosideo B (Sigma-Aldrich), metanol (grau HPLC), ácido acético, acetato de magnésio, ácido sulfúrico (Vetec). As cápsulas de gelatina (Coni-Snap® - Capsugel) e de hipromelose (Vcaps® Plus - Capsugel) ambas no tamanho nº 0 e na cor natural (sem adição de corantes) foram gentilmente fornecidas pelos Laboratórios Pfizer. Estas cápsulas tamanho 0 apresentavam as seguintes características: capacidade para 0,68 mL, peso médio de 90 a 102 mg, diâmetro externo do corpo 7,34 mm (\pm 0,06) e da tampa 7,64 mm (\pm 0,06), comprimento do corpo 18,44 mm (\pm 0,46 mm), comprimento da tampa 10,72 (\pm 0,46 mm) e comprimento total de 21,7 mm (\pm 0,3 mm).

4.2 Obtenção do extrato seco de Sene

O extrato seco de Sene (*Cassia angustifolia* Vahl) foi adquirido da empresa Pharmanostra e segundo o laudo (Anexo A) apresenta as seguintes características: pH 4,8 (solução 10% em água), densidade aparente 0,470 g/mL, teor de senosídeos B 2,72%. A avaliação microbiológica foi realizada pelo fornecedor e está dentro da faixa permitida pela OMS (Organização Mundial de Saúde) para a qualidade das matérias-primas vegetais (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1999).

4.3 Caracterização do extrato seco de Sene

4.3.1. Perda por dessecação

Um grama de extrato seco foi exatamente pesado ao 0,1 mg em pesa-filtro, previamente tarado e dessecado por 30 minutos nas mesmas condições do ensaio e

resfriado. Foi colocado em estufa a vácuo (VWR Brand 1400E) à temperatura de 105 °C por 2 horas. Foi resfriado à temperatura ambiente em dessecador e pesado ao 0,1 mg em balança analítica (Sartorius A200S). O procedimento todo foi repetido até peso constante. Os resultados foram expressos como perda da massa percentual, através da média de quatro determinações (Farmacopeia Brasileira 5ª Ed., 2010).

4.3.2. Determinação do teor de cinzas

A um grama de extrato exatamente pesado ao 0,1 mg em cadinho de platina previamente calcinado, esfriado em dessecador e tarado, foi adicionado 1 mL de ácido sulfúrico PA concentrado. Em seguida, o cadinho foi aquecido brandamente até carbonização em mufla (Fornitec 1646) à temperatura de 600° C ± 50 °C. O cadinho foi retirado e resfriado, e em seguida adicionou-se lentamente 1 mL de ácido sulfúrico para umedecimento do resíduo, que voltou a ser carbonizado e incinerado em mufla a 600 °C ± 50 °C. O cadinho contendo o resíduo foi resfriado em dessecador e novamente pesado (balança analítica Sartorius A200S) e incinerado por mais 30 minutos. Este procedimento foi repetido até que a diferença entre as duas pesagens sucessivas ficou abaixo de 0,5 mg (Farmacopeia Brasileira 5ª Ed., 2010).

4.3.3. Análise granulométrica

Para a análise foram separados cinco tamises de malhas de abertura nominal de 180 µm, 150 µm, 106 µm, 75 µm e 63 µm, providos de tampa e fundo coletor. Uma amostra de 2,02 g de extrato seco de Sene foi transferida e distribuída uniformemente no tamis superior. O conjunto foi tampado, colocado em tamisador vibratório (Granulômetro Retsch, modelo AS 200 Basic) e submetido à passagem forçada por vibração por 15 minutos. Após o término do processo, o material (extrato seco) de cada tamis foi cuidadosamente recolhido e o seu peso devidamente determinado (Farmacopeia Brasileira, 5ª Ed., 2010).

4.3.4. Determinação espectrofotométrica dos derivados hidroxiantracênicos no extrato seco de Sene

Os derivados hidroxiantracênicos presentes no extrato foram quantificados por espectrofotometria de absorção no visível segundo metodologia descrita na Farmacopeia Brasileira 5ª ed. (2010). Resumidamente, a análise foi realizada com amostras de extrato seco de diferentes massas. Uma amostra de cerca de 200 mg denominada AMOSTRA 1, e uma amostra de cerca de 53 mg denominada AMOSTRA 2 foram separadamente dispersas em 30 mL de água destilada e aquecidas sob refluxo durante 15 minutos. Em seguida foram resfriadas à temperatura ambiente, filtradas, acidificadas com 1 gota de ácido clorídrico 2 M (PH ~2); e extraídas sucessivamente com clorofórmio (3 x 5 mL). A fase orgânica foi desprezada e a fase aquosa centrifugada (Excelsa 4, FANEN) a 200 rpm por 10 minutos. Quatro mililitros do sobrenadante foram transferidos para balão de fundo redondo e o pH ajustado para 7,0-8,0 com solução de carbonato de sódio 5% (p/v). A esta solução foram adicionados 8 mL de solução de cloreto férrico 10,5% (p/v), sendo levada ao aquecimento sob refluxo 20 minutos, acidificada com 0,4 mL de HCl concentrado, resfriada e extraída por éter etílico (1 x 10 mL + 2 x 7 mL), que é completado a 25 mL. Uma alíquota (5 mL) da fase etérea foi completamente evaporada e o resíduo resuspenso em acetato de magnésio 0,5% (p/v) em metanol. A absorvância foi medida em 515 nm imediatamente ao seu preparo. As determinações foram realizadas em no mínimo duplicata para ambas as amostras. O teor de derivados hidroxiantracênicos foi calculado como senosídeo B, de acordo com a expressão:

$$\% \text{ SB} = (\text{A} \times 0,718) / \text{m}$$

Em que:

SB = derivados hidroxiantracênicos;

A = absorvância da solução amostra;

m = massa de amostra considerando determinação de água;

0,718 = coeficiente de extinção molar

4.4 Preparação e caracterização das cápsulas contendo extrato de Sene

No presente trabalho foram utilizadas dois tipos de cápsulas duras: cápsulas de gelatina (Coni-Snap®), fabricadas pela Capsugel Inc. Greenwood - EUA e cápsulas de hipromelose (Vcaps® Plus), fabricadas pela Capsugel Inc. Puebla - México. Os certificados de análise de ambas as cápsulas vazias estão nos Anexos B e C, respectivamente.

Foram separadas 720 cápsulas duras, 360 de cada tipos de invólucros hipromelose e gelatina. Estas cápsulas foram preenchidas com extrato seco de Sene padronizado, usando o método de enchimento manual em tabuleiro (Encapsulador manual Capsutec – tamanho 0 - 360 cápsulas/partida).

Foi utilizada a seguinte composição para o enchimento das cápsulas:

Extrato seco de *Cassia angustifolia* Vahl, (Sene).....550 mg
Excipiente (Amido).....q.s.p. 1 cápsula

A figura 04 ilustra parte do processo de enchimento manual das cápsulas com extrato seco de Sene em tabuleiro e o aspecto final de parte das cápsulas preparadas.



Figura 04 - Ilustração de parte do processo de preparo das cápsulas e aspecto das cápsulas de hipromelose.

4.4.1. Determinação do peso médio

A determinação de peso médio foi efetuada conforme a Farmacopeia Brasileira 5ª edição (2010), onde 20 cápsulas foram pesadas individualmente, o conteúdo foi removido de cada uma das cápsulas e pesado novamente. O peso do conteúdo de cada cápsula foi determinado pela diferença de peso entre a cápsula cheia e a cápsula vazia. Com os valores obtidos foi determinado o peso médio do conteúdo. Pode-se tolerar não mais que duas unidades fora dos limites especificados ($\pm 7,5\%$) em relação ao peso médio do conteúdo, porém, nenhuma poderá estar acima ou abaixo do dobro das porcentagens indicadas.

4.4.2. Estudo de estabilidade térmica acelerada

Os testes de estabilidade foram realizados no laboratório de estabilidade da Capsugel® (Greenwood, SC, EUA) segundo o guia de métodos analíticos do referido Laboratório, cujas metodologias estão baseadas na descrição da USP 33 (2205) e no ICH – Q1A (R2) Stability Testing of New Drug Substance and Products (ICH, 2003), atendendo aos critérios da RE nº1 de 29 de julho de 2005 - Guia para Estudo de Estabilidade de Medicamentos (BRASIL, 2005).

Amostras de cápsulas vazias e de cápsulas contendo extrato seco de ambos os tipos de cápsulas duras (cápsulas gelatina e hipromelose) acondicionadas em embalagem secundária, frasco de polietileno de alta densidade branco opaco (Vepakum PEAD 60 mL H / L = 43,5 / 63,5 - 60 cápsulas), foram colocadas em dessecador e enviadas por modal aéreo para Greenwood, SC, EUA em container com temperatura ($20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) e umidade controlada ($50\% \pm 5$ de umidade relativa - UR). No laboratório de estabilidade, as amostras foram submetidas a estresse térmico acelerado por 6 meses nas seguintes condições:

- seis frascos contendo 60 cápsulas de cada tipo de invólucro gelatina e hipromelose (três frascos de cápsulas vazias e três frascos de cápsulas cheias) foram colocados em câmara climática (Darwin Chamber Company, modelo PH052) a $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e $65\% \pm 5\%$ UR.

- seis frascos de polietileno de alta densidade contendo 60 cápsulas de hipromelose (três frascos de cápsulas vazias e três frascos de cápsulas cheias) foram colocados em câmara climática (Darwin Chamber Company, modelo PH052) a 40 ± 2 °C e $75\% \pm 5\%$ UR.

Após o período de 6 meses as cápsulas foram submetidas aos seguintes testes de avaliação:

4.4.2.1. Perda por dessecação

A medida do teor de umidade foi realizada utilizando o método de perda por secagem, método 731, segundo a USP 34 (2010). Em pesa-filtro previamente tarado foram colocadas 20 cápsulas e o peso determinado em balança analítica de 0,1 mg de precisão. Em seguida, o pesa-filtro com as cápsulas foi colocado em forno (Blue M Mechanical Oven, modelo MO1490A-1) a 105 ± 2 °C por 3 horas. Após esse período foi retirado e mantido em dessecador por 2 horas e em seguida foi novamente submetido a pesagem em balança analítica. A perda por dessecação foi determinada a partir da diferença entre as massas.

4.4.2.2. Desintegração

O teste de desintegração foi realizado empregando uma amostra de 6 cápsulas duras de cada um dos tipos (cápsulas de gelatina e cápsulas de hipromelose), método 701, segundo a USP 34 (2010), empregando um dissolutor SOTAX DT2. O sistema operou em ciclos de 20-32 ciclos/min, usando como meio dissolutor 900 mL de água destilada em faixa de temperatura de 35° a 39°C. O tempo de desintegração foi determinado em minutos. A avaliação foi realizada nas cápsulas vazias e nas cápsulas cheias.

4.4.2.3. Suscetibilidade à quebra

Esta avaliação foi desenvolvida pelos Laboratórios Capsugel® para avaliação de seus produtos. Para este teste foi empregado um dispositivo constituído de um bloco de aço inox de peso conhecido acionado por um gatilho. Uma cápsula (amostra) bem fechada foi colocada sob uma superfície firme e plana, o dispositivo foi posicionado sobre a cápsula e o gatilho disparado, o bloco de aço inox é lançado sobre a cápsula. Este procedimento foi realizado individualmente para 100 cápsulas.

Ao final, cada cápsula foi analisada, identificando quaisquer buracos, rachaduras, ou pequenas quebras. O procedimento foi realizado nas cápsulas vazias e nas cápsulas cheias, após terem sido esvaziadas.

4.4.2.4. Atividade de água

A atividade de água foi determinada com auxílio em um equipamento Aqualab Dew Point Water Activity Meter 4TE e foi realizada nas cápsulas cheias e vazias. O método utilizado é comumente empregado pela Capsugel e foi baseado no método 42.1.03, item c, da AOAC (2010).

4.4.2.5. Análise dos senosídeos nas cápsulas duras

4.4.2.5.1. Identificação dos senosídeos A e B por CLAE-DAD-EM

A análise da amostra (conteúdo da cápsula de hipromelose) foi realizada em um cromatógrafo líquido de ultra eficiência Shimadzu (Tokyo), modelo Prominence-Nexera, composto pelos seguintes módulos: duas bombas de alta pressão LC-30AD, desgaseificador por membranas DGU-20As, amostrador automático (injetor) SIL-30AC, forno de coluna CTO-30A, detector espectrofotométrico com arranjo de fotodiodos (DAD) SPD-M20A com célula de 210 nL, detector espectrométrico quadrupolo de massas MS ZQ (Micromass-Waters) com ionização por “electrospray” em modo negativo (ES^-) e sistema controlador/aquisição de dados CBM-20A. Varredura do espectro de DAD em 200-800 nm com resolução de 4 nm. Varredura do espectro de massas na faixa de m/z 100-1000 com resolução de m/z 0,4. O potencial do capilar metálico, do cone de amostragem, do extrator e RF do quadrupolo foram respectivamente 2,00 kV, 15,0 V, 1,00 V e 1,0 V. Temperatura da fonte em 150°C e de dessolvatação em 300°C. Condições cromatográficas estabelecidas a partir de Bala et al. (2001) com poucas modificações. Uma coluna Zorbax Eclipse plus C18 2,1 mm x 150 mm x 5 µm foi utilizada nas seguintes condições: fase móvel composta por metanol/água/ácido acético em programação binária: 20:80:0,1 (A) e 80:20:0,1 v/v/v (B). Programação do gradiente de composição: 0-5 min com 20% B, 5-25 min com 20-100% B, mantendo-se por 7 min, retornando a 20% B aos 35 min. com vazão de 0,1 mL/min. Temperatura do forno de colunas: 35°C. O preparo da amostra foi o mesmo descrito na seção seguinte (4.5.2.5.2).

4.4.2.5.2. Determinação quantitativa dos senosídeos A e B por CLAE

Preparo das soluções de padrão: Uma amostra de 5 mg de senosídeo B foi pesada, ao 0,01 mg, em balão volumétrico de 50,00 mL avolumado com MeOH/água 7:3 com solubilização total. A partir desta solução, alíquotas de 5,0 mL foram retiradas, transferidas separadamente para balões de 10,0, 25,0 e 50,0 mL, e o volume completado com o mesmo solvente resultando nas concentrações de 50, 20 e de 10 µg/mL, respectivamente. Das duas primeiras soluções, alíquotas de 5,0 mL foram retiradas, transferidas separadamente para balões de 50,0 mL, e o volume completado com o mesmo solvente resultando nas concentrações de 5,0 e de 2,0 µg/mL, respectivamente. Estas soluções foram injetadas em triplicata nas condições descritas a seguir para determinar a curva de calibração e demais parâmetros de validação.

Preparo de amostra: Cerca de 250 mg, pesadas ao 0,01 mg, do conteúdo da cápsula, foram transferidos para balão volumétrico de 5,0 mL. Cerca de 3 mL de MeOH/água 7:3 foram acrescentados e a mistura foi sonicada durante 5 minutos. O balão foi avolumado com o mesmo solvente e homogeneizado. Triplicatas de amostras de conteúdo das cápsulas foram identicamente ensaiadas.

A análise cromatográfica foi realizada em cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu (Tokyo), modelo Prominence-Nexera, com duas bombas de alta pressão LC-10AD, degaseificador por membranas DGU-12A, injetor automático SIL-10AD, forno de coluna CTO-10A e detector espectrofotométrico com arranjo de fotodiodos (DAD) SPD-M10AVP. Os dados foram adquiridos por interface SCL-10A. A aquisição de dados e controle foi realizada com auxílio do software Shimadzu CLASS-VP versão 6.13 SP2.

As condições cromatográficas foram estabelecidas a partir de Bala et al. (2001) com poucas modificações. Uma coluna Supelcosil – C18 150 mm x 4,6 mm x 5 µm, e uma pré-coluna Supelcosil C18 2 cm, foram utilizadas com as seguintes condições: fase móvel composta por metanol/água/ácido acético em programação binária: 20:80:0,1 (A) e 80:20:0,1 v/v/v (B). Programação do gradiente de composição: 0-5 min com 20% B, 5-25 min com 20-100% B, mantendo-se por 7 min, retornando a 20% B aos 35 min, e mantendo-se por mais 15 min. Gradiente de vazão: 0-25 min 0,6 mL/min, 25 a 32 min 1,0 mL, 32 a 35 min 0,6 mL/min,

mantendo-se por mais 15 min a vazão de 0,6 mL/min. Temperatura do forno de colunas a 25 °C e amostrador a temperatura ambiente. Cada amostra e solução de padrão foram analisadas três vezes.

Os principais critérios de validação avaliados foram: linearidade, precisão ao nível de repetibilidade (interdia e intradia) e exatidão no nível de recuperação.

4.4.2.6. Testes microbiológicos

Os ensaios microbiológicos foram realizados segundo a metodologia descrita na USP 34 (2010). Para a contagem de bactérias aeróbicas totais, amostras de cápsulas vazias e cheias com extrato seco de Sene (10 g) foram homogeneizadas assepticamente num recipiente contendo 90 mL de meio TSB⁺ com caldo caseína, peptona, lecitina e Tween 80. Em seguida o material foi colocado em banho-maria (35 ± 2 °C) com eventual agitação, até que as cápsulas se dissolvessem completamente. Deste material foram retiradas alíquotas diluídas e transferidas para placas de Petri estéreis, e nas quais foram adicionados 15 a 20 mL de meio ágar tríplico de soja. As placas foram agitadas suavemente, deixadas em temperatura ambiente para solidificação, e em seguida foram invertidas e incubadas a 30-35 °C por 48 h, ao final do que foi determinado o número de unidades formadoras de colônia/grama de amostra.

Para a contagem de bolores e leveduras, a amostra foi preparada nas mesmas condições das bactérias aeróbicas totais, acima descritas, somente se diferenciando no meio de crescimento utilizado. Para esta avaliação alíquotas foram retiradas e transferidas para placas de Petri estéreis as quais foram adicionadas 20 a 25 mL de meio ágar Sabouraud dextrose. As placas foram agitadas, deixadas em temperatura ambiente para solidificação, e em seguida invertidas e incubadas a 20-25 °C por 5-7 dias, quando o número de unidades formadoras de colônia/grama de amostra foi determinado.

A pesquisa de patógenos foi realizada para *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*); *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), *Escherichia coli* (*E.coli*) e *Salmonella* spp. A amostragem para cada patógeno foi preparada nas mesmas condições acima para os ensaios de bactérias aeróbicas totais, diferenciando-se somente na etapa de inoculação e condições de incubação, que são específicas e seguiram a metodologia descrita na USP 34 (2010).

5 RESULTADOS

5.1 Características farmacopeicas do extrato seco de Sene

De acordo com o método farmacopeico empregado, o extrato apresentou um percentual de perda por secagem de 2,87% e teor de cinzas de 0,1384%. A distribuição granulométrica está apresentada na Figura 04.

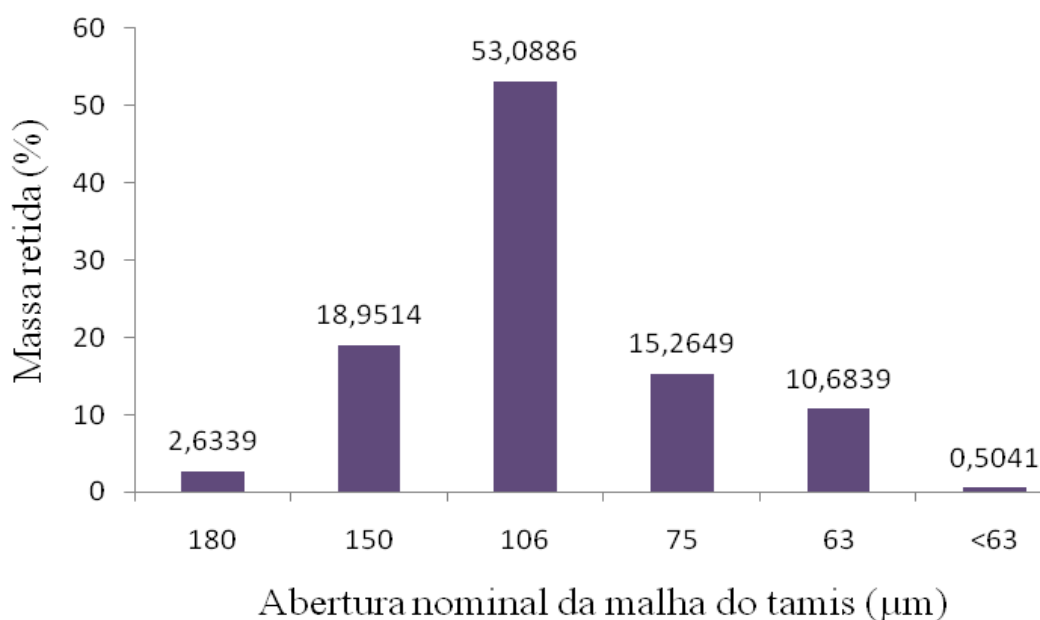


Figura 05 – Distribuição granulométrica do extrato seco de Sene.

5.2. Determinação espectrofotométrica dos derivados hidroxiantracênicos

Os resultados das análises espectrofotométrica dos derivados hidroxiantracênicos no extrato seco de Sene estão indicados na tabela 01, como Amostra 1 e Amostra 2, respectivamente. Os teores de derivados hidroxiantracênicos variaram nas duas diferentes amostras de 0,22 a 0,11%, conforme apresentado na Tabela 01.

Tabela 01 – Teor de derivados hidroxiantracênicos das amostras 1 e 2

Amostra	Peso (mg) (duplicata)	SB(%)* (duplicata)	SB(%) (literatura)
AMOSTRA 1	205,5	0,17	≤ 2,5% para material vegetal* 5-8% para extrato seco**
	206,54	0,22	
AMOSTRA 2	52	0,11	
	52	0,17	
	54,7	0,17	

* SB = percentual de derivados hidroxiantracênicos. ** Farmacopeia Europeia

5.3 Determinação do peso médio das cápsulas contendo extrato seco de Sene

Os pesos médios das cápsulas foram 671 e 672 mg para gelatina e hipromelose, respectivamente. Na tabela 02 estão apresentados os dados extraídos da determinação do peso médio dos dois tipos de cápsulas estudados. De acordo com a Farmacopeia Brasileira 5ª Edição (2010), para cápsulas contendo 300 mg ou mais, os pesos individuais não podem variar mais que $\pm 7,5\%$ em relação ao peso teórico. Nas Figuras 06 e 07 estão representados graficamente o peso teórico, os limites de variação aceitáveis superior (+7,5%) e inferior (-7,5%) e a distribuição do peso individual das 20 cápsulas de cada tipo de invólucro gelatina (A) e hipromelose (B).

Tabela 02 – Dados extraídos da análise de peso médio das cápsulas de gelatina e hipromelose

Dados da análise de Peso médio (n=20)	Tipos de Cápsulas	
	Gelatina	Hipromelose
Máximo (+7,5%)	0,680 g	0,691 g
Mínimo (-7,5%)	0,664 g	0,656 g
Amplitude	0,016 g	0,035 g
Variância	0,000019 (g ²)	0,000082 (g ²)
Desvio Padrão	0,004 g	0,009 g
Coef. de Variação	0,645 %	1,344 %
Valor Teórico	0,664 g	0,667 g
Média (peso médio)	0,671 g	0,672 g

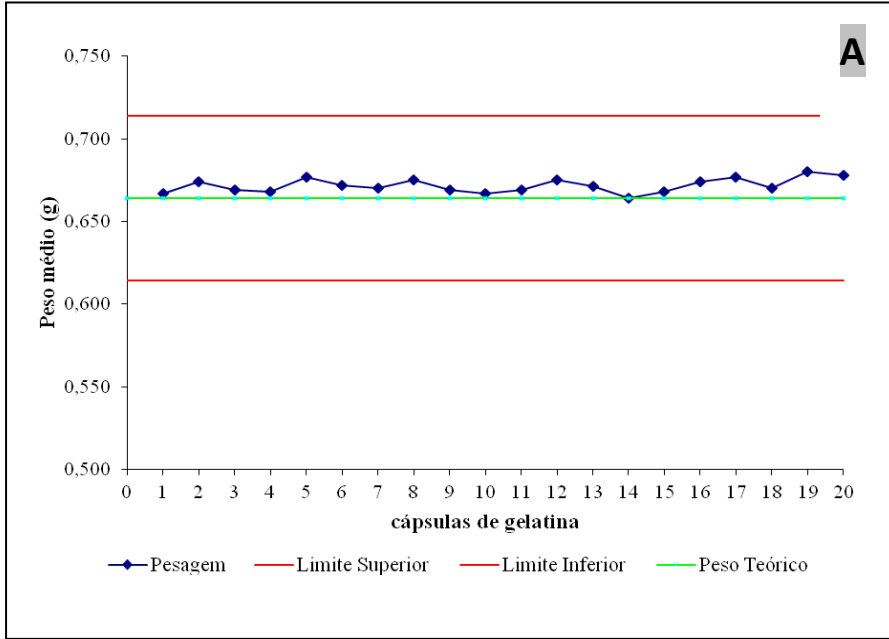


Figura 06 – Representação gráfica da distribuição do peso das cápsulas de gelatina (**A**)

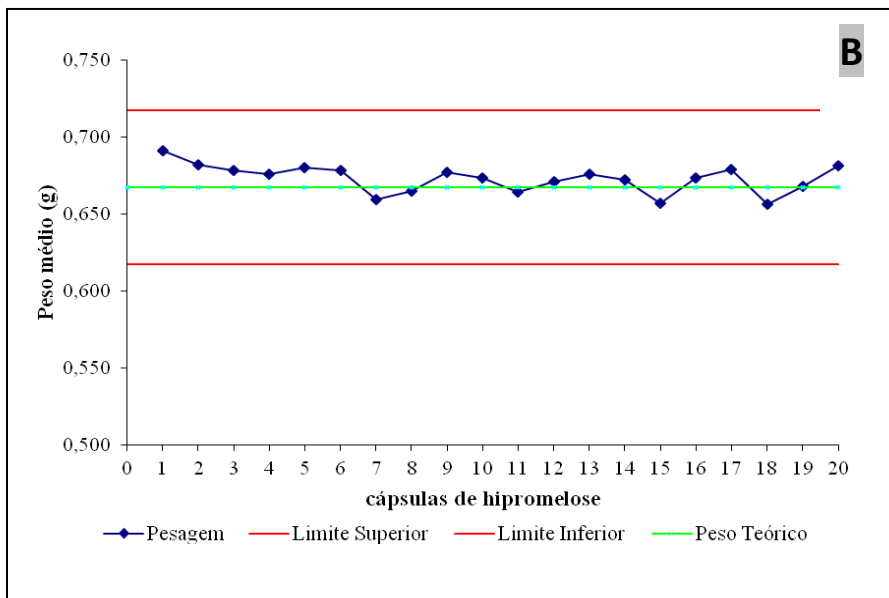


Figura 07 – Representação gráfica da distribuição do peso das cápsulas de hipromelose (**B**).

5.4 Análise das cápsulas duras após estabilidade térmica

5.4.1 Caracterização física das cápsulas duras

Os resultados obtidos para cada determinação realizada nos dois tipos de cápsulas após o teste de estabilidade térmica acelerada estão apresentados na Tabela 03 e Tabela 04.

Tabela 03 – Dados físico-químicos do estudo de estabilidade térmica acelerado das cápsulas duras de gelatina e hipromelose contendo extrato seco de sene.

Cápsulas de gelatina									
Condições de estresse térmico (°C) (%UR)	Cápsulas	Perda por dessecação (%)		Desintegração (min)		Suscetibilidade à quebra (nº de cápsulas)		Atividade de água (a _w)	
Critério de aceitação		Capsula / extrato 13 a 16 / < 5		< 15		< 6 / 100			
Tempo		T ₀	T ₆	T ₀	T ₆	T ₀	T ₆	T ₀	T ₆
30°C ± 2°C 65% ± 5%	Cápsulas vazias	14,4	14,5	2,51	2,53	0	0	-	-
	Cápsulas / extrato de Sene	14,4/2,8	13,2/3,5	2,51	4,35	0	7	0,41/0,33	0,37/0,35
40°C ± 2°C 75% ± 5%	Cápsulas vazias	14,4	15,1	2,51	4,53	0	4	-	-
	Cápsulas / extrato de Sene	14,4/2,8	12,3/5,7	2,51	4,35	0	42	0,41/0,33	0,34/0,43
Cápsulas de hipromelose									
30°C ± 2°C 65% ± 5%	Cápsulas vazias	4,4	4,4	5,11	5,23	0	0	-	-
	Cápsulas / extrato de Sene	4,4/2,8	4,6/3,1	5,11	5,47	0	0	0,36/0,33	0,36/0,34
40°C ± 2°C 75% ± 5%	Cápsulas vazias	4,4	4,3	5,11	5,25	0	0	-	-
	Cápsulas / extrato de Sene	4,4/2,8	4,5/3,6	5,11	6,02	0	1	0,36/0,33	0,35/0,37

T₀ = Avaliação antes de iniciar o estudo de estabilidade térmica. T₆ = Avaliação ao término do estudo de estabilidade térmica acelerada (6 meses). a_w = Atividade de água

Tabela 04 – Dados microbiológicos do estudo de estabilidade térmica acelerado das cápsulas duras de gelatina e hipromelose contendo extrato seco de sene.

Cápsulas de gelatina													
Condições de estresse térmico	Cápsulas	Contagem de bactérias aeróbicas totais (UFC/g)		Contagem de bolores e leveduras (UFC/g)		Pesquisa de Patogênicos							
						<i>S. aureus</i> (UFC/g)		<i>P. aeruginosa</i> (UFC/g)		<i>E. coli</i> (UFC/g)		<i>Salmonella spp.</i> (UFC/g)	
Critério de aceitação		<1000		<100		ausência		ausência		ausência		ausência	
Tempo		T ₀	T ₆	T ₀	T ₆	T ₀	T ₆	T ₀	T ₆	T ₀	T ₆	T ₀	T ₆
30°C ± 2°C 65% ± 5%	Cápsulas vazias	<100	<100	<100	<100	aus.	aus.	aus.	aus.	aus.	aus.	aus.	aus.
	Cápsulas com ext. Sene	<100	<100	<100	12	aus.	aus.	aus.	aus.	aus.	aus.	aus.	aus.
40°C ± 2°C 75% ± 5%	Cápsulas vazias	<100	<100	<100	<100	aus.	aus.	aus.	aus.	aus.	aus.	aus.	aus.
	Cápsulas com ext. Sene	<100	16	<100	34	aus.	aus.	aus.	aus.	aus.	aus.	aus.	aus.
Cápsulas de hipromelose													
30°C ± 2°C 65% ± 5%	Cápsulas vazias	<100	<100	<100	<100	aus.	aus.	aus.	aus.	aus.	aus.	aus.	aus.
	Cápsulas com ext. Sene	<100	<100	<100	<100	aus.	aus.	aus.	aus.	aus.	aus.	aus.	aus.
40°C ± 2°C 75% ± 5%	Cápsulas vazias	<100	<100	<100	<100	aus.	aus.	aus.	aus.	aus.	aus.	aus.	aus.
	Cápsulas com ext. Sene	<100	<100	<100	<100	aus.	aus.	aus.	aus.	aus.	aus.	aus.	aus.

T₀ = Avaliação antes de iniciar o estudo de estabilidade térmica. T₆ = Avaliação ao término do estudo de estabilidade térmica acelerada (6 meses). aus. = ausente.

5.4.2 Análise química do extrato seco e do conteúdo das cápsulas duras por CLAE-DAD-EM

Os cromatogramas obtidos com detecção DAD para as amostras do extrato seco e para o conteúdo da cápsula de hipromelose estão representados na Figura 08, onde se apontam os sinais correspondentes aos senosídeos A e B. A Tabela 05 traz todos os sinais obtidos para a amostra do conteúdo da cápsula de hipromelose, de acordo com os respectivos tempos de retenção (T_R) e abundâncias relativas, além dos máximos de absorvância e os principais fragmentos que aparecem em cada espectro de massas correspondente. Os cromatogramas dos padrões comerciais de senosídeo A e B estão na Figura 08, que mostra os respectivos íons pseudomoleculares $[M^+ - H]^-$ correspondendo ao valor de 861. Os cromatogramas dos senosídeos A e B (Figura 08), contidos nas amostras do extrato seco e no conteúdo das cápsulas de hipromelose, foram selecionados nos cromatogramas conforme este valor de massas, e estão representados na Figura 10.

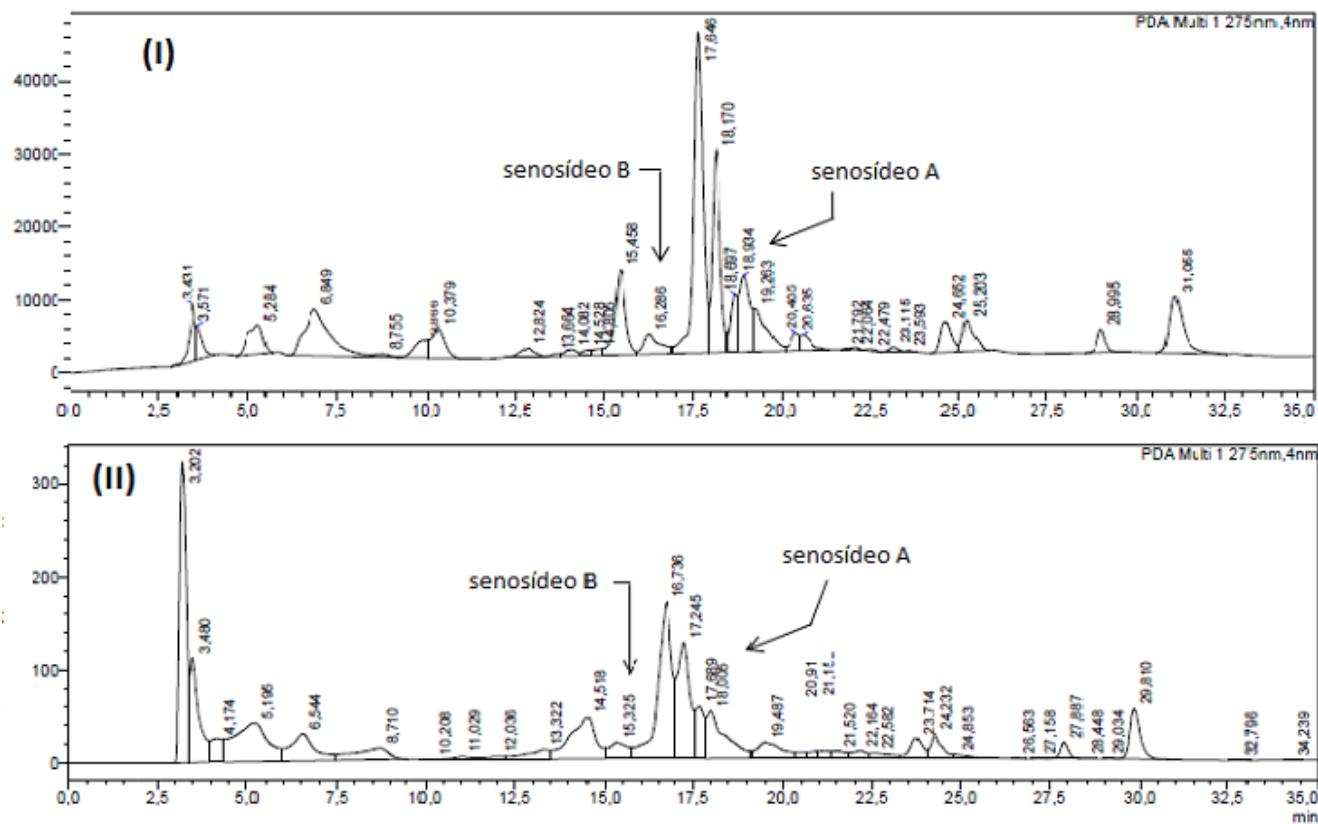


Figura 08 - Cromatogramas por detecção com DAD do extrato seco original (I) e do conteúdo das cápsulas duras de Sene – hipromelose (II). Condições de análise na seção “Materiais e Métodos”. Para T_R dos sinais de (B) ver Tabela 05.

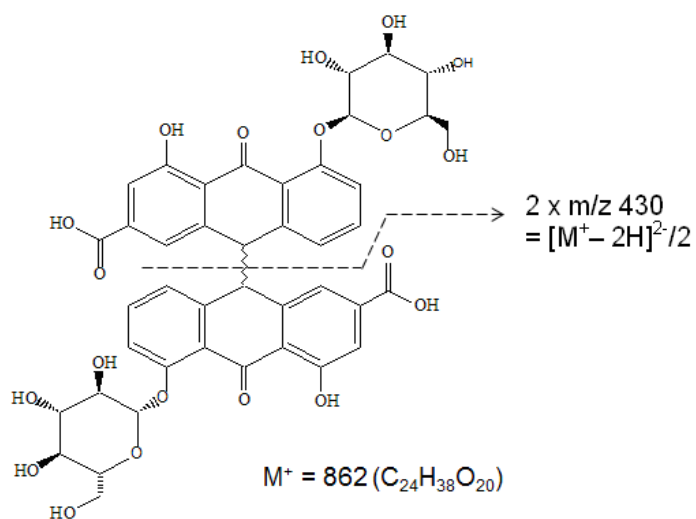
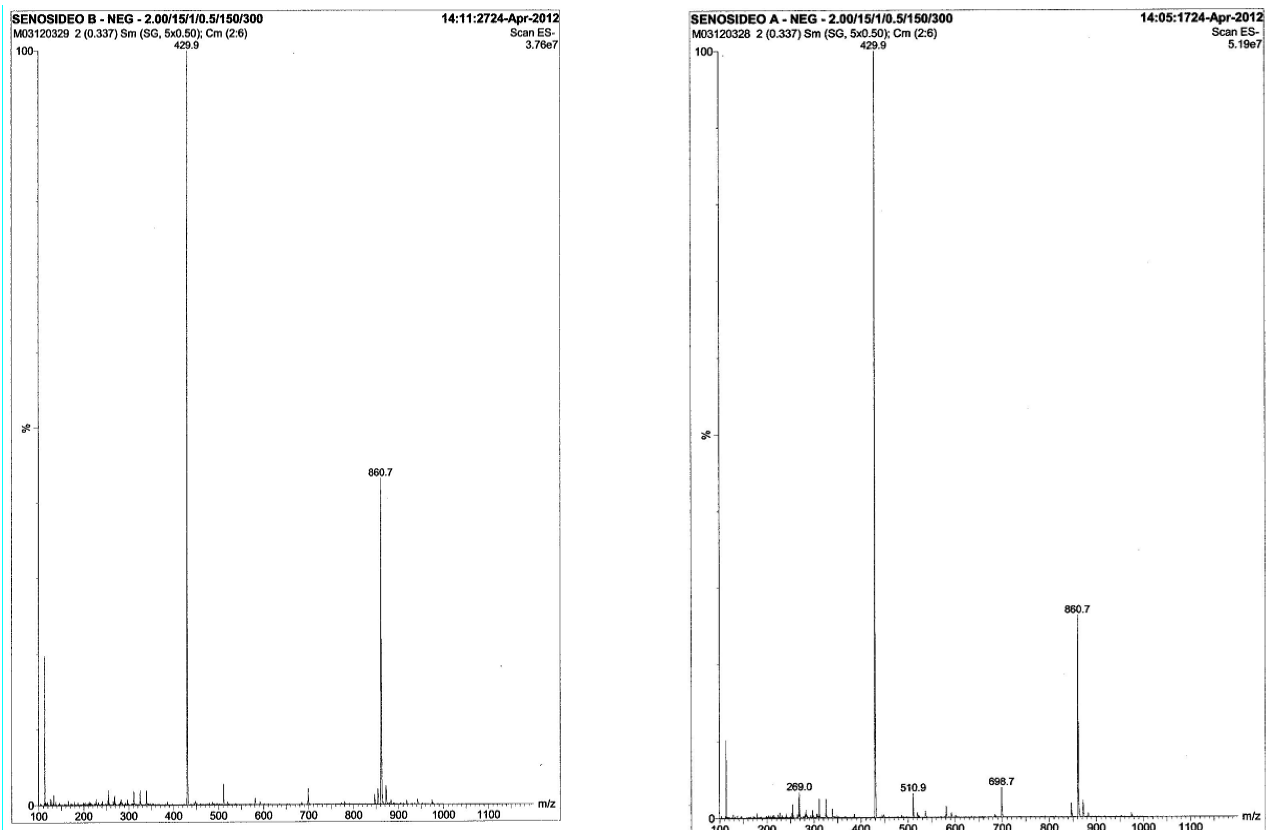


Figura 09 - Espectros de massas dos padrões comerciais de senosídeos A e B e fragmentação principal da molécula de senosídeo. Fragmentações obtidas por inserção direta das amostras na fonte do equipamento (sem eluição cromatográfica). $[M-1]^- = 861$.

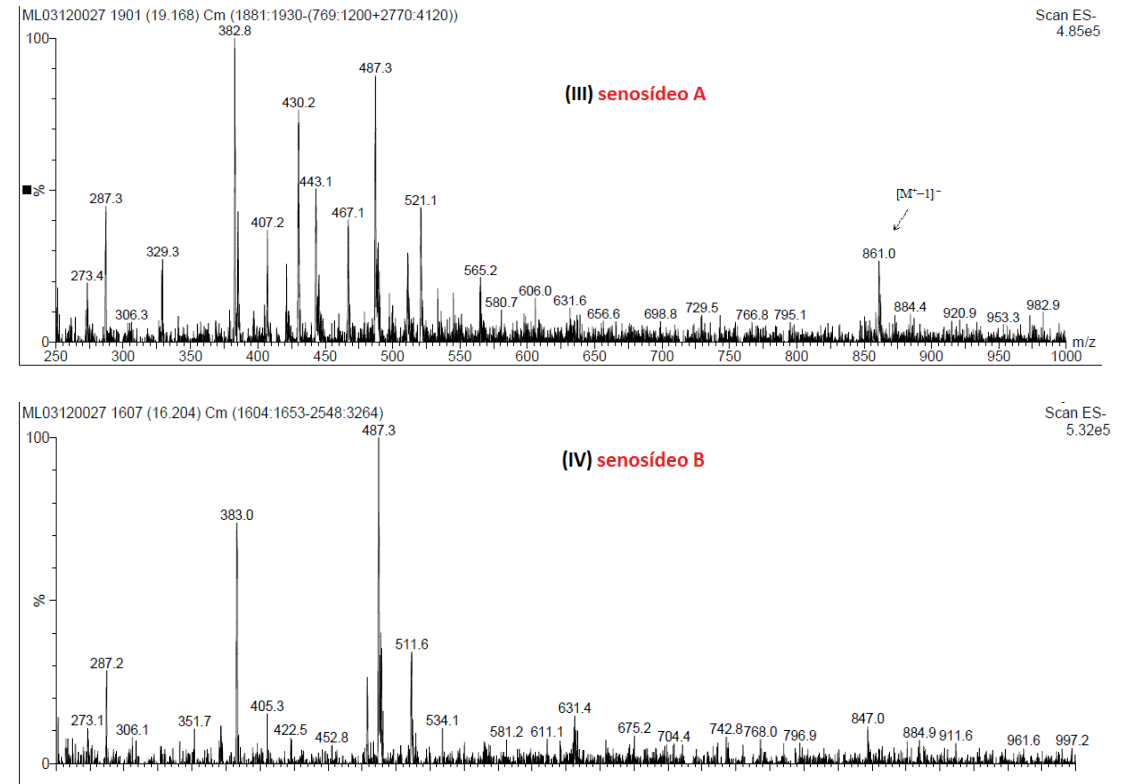
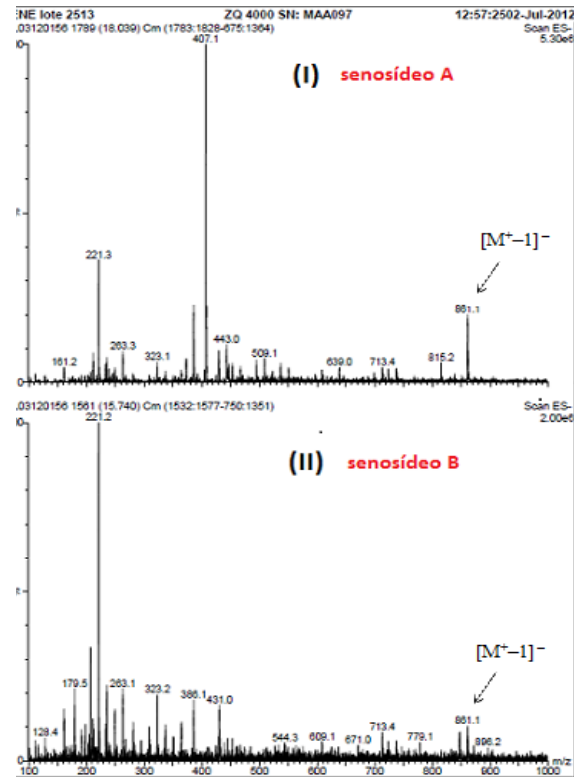


Figura 10 - Espectros de massas dos sinais dos senosídeos A e B nas amostras do extrato seco (I e II) e do conteúdo das cápsulas duras de Sene –hipromelose (III e IV). $[M-1]$ = íon pseudomolecular. Os espectros mais complexos nas duas amostras, com relação aos dos padrões (Figura 10), deriva da fragmentação após a eluição no sistema que, além dos fragmentos das moléculas dos senosídeos, também reflete a formação de adutos entre as substâncias analisadas e componentes da fase móvel. O espectro do senosídeo B na amostra não mostra o íon pseudomolecular, mas a região de fragmentos menores é muito similar à do senosídeo A (ver seção "Discussão").

Tabela 05 – Sinais (>1%) do cromatograma para o conteúdo das cápsulas duras de hipromelose com extrato seco de Sene e sugestão de componentes.

Pico	TR (min)*	Área (%)	Fragmentos***	UV (nm)****	Sugestão de estrutura *****
1	3,43 (3,64)	2,604	719 [M-H] ⁻ , 491, 455, 401, <u>377</u> , 329, 299, <u>263</u> , <u>227</u> , 179, <u>149</u>	275 – 350 - 417	Desconhecida
2	3,57 (3,67)	1,678			
3	5,28 (5,37)	3,387	579 [M-H] ⁻ , 501, <u>465</u> , 439, 383, 249, <u>227</u>	275 – 332	Isorramnetina diglicosídeo
	5,28 (5,45)				
4	6,85 (7.09)	9,610	593, 515, <u>479</u> [M-H] ⁻ , <u>383</u> , <u>227</u>	217, 275, 320	Antraquinona monoglicosídeo
	6,85 (7.10)				
6	9,87	1,855	n.a	240, 271	Desconhecida
7	10,38 (10.45)	3,468	952, 707, 593 [M-H] ⁻ , 537, 486, <u>383</u> , 325, 287, 251, <u>212</u> , 195, 163	271 – 332	Antraquinona monoglicosídeo
13	15,46 (15.66)	7,051	739, 707, 661, <u>625</u> [M-H] ⁻ , 581, 532, 488, <u>383</u> , 329, <u>287</u> , 171	256 – 283 – 354	Quercetina di-glucosídeo
	15,46 (15.68)				
14	(15.45) (16,28)	2,505		268 – 327 – 340	Senosídeo B
Senosídeo B				267 – 292 – 307 – 359	(padrão comercial)
15	17,65 (17.86)	23,362	<u>723</u> , <u>645</u> , <u>609</u> [M-H] ⁻ , <u>565</u> [M- HCO ₂] ⁻ , <u>487</u> [M-2xCH ₃ CO ₂ H] ⁻ , 451, 383, 329, 265, 212, 151	266 – 346	Derivado da Réina
16	18,17 (17.87)	13,247		254 – 355	
17	18,70 (19.24)	2,730	862?	267 – 314 – 339	Desconhecida
18	18,93 (19.24)	6,241	983, 921, 884, <u>861</u> [M-H] ⁻ , 802, 729, 699 [M-H-Gluc] ⁻ , <u>606</u> , <u>430</u> , 584, 521, 498, 467, 442, 385, 357, 310	225 – 265	Senosídeo A
19	19,26 (19.24) **	4,352	862? [M-H] ⁻ (não aparece), <u>431</u>	266 – 343	
Senosídeo A				269 – 340	(padrão comercial)
20	20,41 (21.61)	1,231	857, <u>792</u> , <u>757</u> , <u>738</u> , 738, 714 [M- H] ⁻ (?), 513, 383, 329, 287, 221	257 – 271	Derivado da quercetina (?)
21	20,64	1,268		275 - 335	

Pico	TR (min)*	Área (%)	Fragmentos***	UV (nm)****	Sugestão de estrutura *****
	(21,67)				
27	24,65 (24,00)	2,271	963, <u>940</u> , 738, 661, <u>487</u> [M-H] ⁻ (?), 329, 275, <u>227</u> , 180	263 – 312 – 363	Reína-1-O-(O-acetil)glucosídeo
28	25,20 (25,55)	2,480	625, 533, 490, 413, <u>383</u> , 341, 299, <u>269</u> [M-H] ⁻ , 221, 179, 141	266 – 306 - 343	Emodina ou Aloeemodina
29	29,00	1,474	n.a.	290 – 331 – 432	Desconhecida
30	31,06 (31,30)	5,667	826, 760, 713, 655, <u>567</u> , 487, 445, 397, 283 [M-H] ⁻ , 365, 255, 227	257 – 331 – 432	Fisciona

* Valores de área abaixo de 1% não foram considerados. Valores entre parêntesis = obtido no tratamento individual de cada sinal (podendo variar segundo o ponto fixado para leitura), e no qual o espectro de massas foi obtido. Esta é a razão de se obter espectros muito similares ou idênticos para sinais próximos; o que, no entanto não é decisivo para se afirmar que o pico é devido a uma única substância.

** Diferentes leituras em posições distintas do sinal fornecem espectros de massas distintos em alguns aspectos de fragmentação e intensidades relativas, contudo ainda equivalentes. Este artifício manual pode ser usado para se observar a equivalência de boa parte dos espectros dos senosídeo A ([M-H]⁻ definido e fragmentações esperadas) e do senosídeo B (com valor de [M-H]⁻ e arredores indefinidos). Este aspecto conta a favor do senosídeo B estar representado pelo sinal em 16,28 min, conforme apontado na tabela; e também pelo sinal idêntico obtido no pico correlato no CLAE-EM do extrato seco não encapsulado (resultados não mostrados).

*** Modo negativo de detecção, que fornece íon pseudomolecular = [M - H]⁻ (provável). Valores grifados: predominantes no espectro de massas.

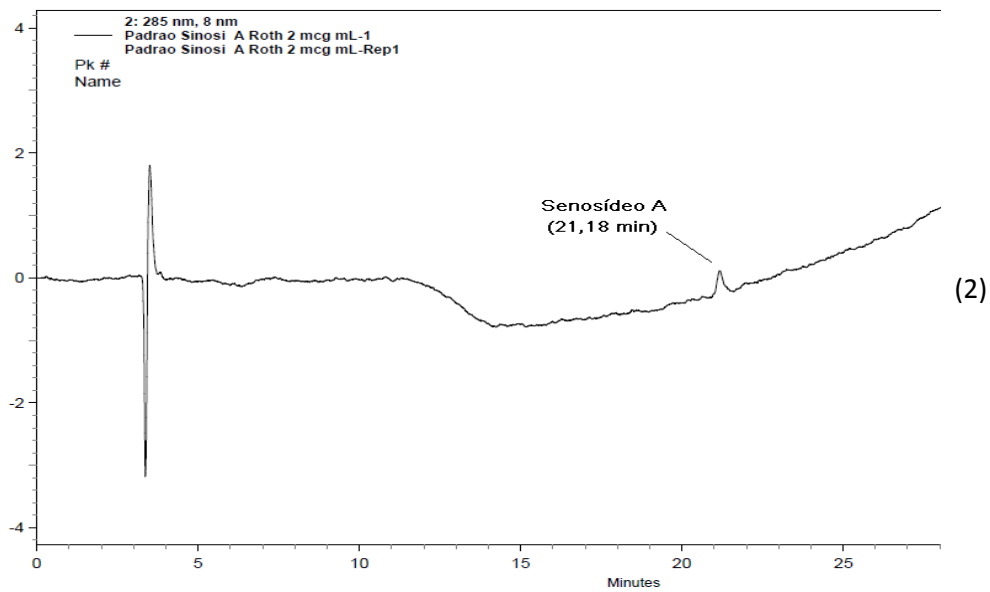
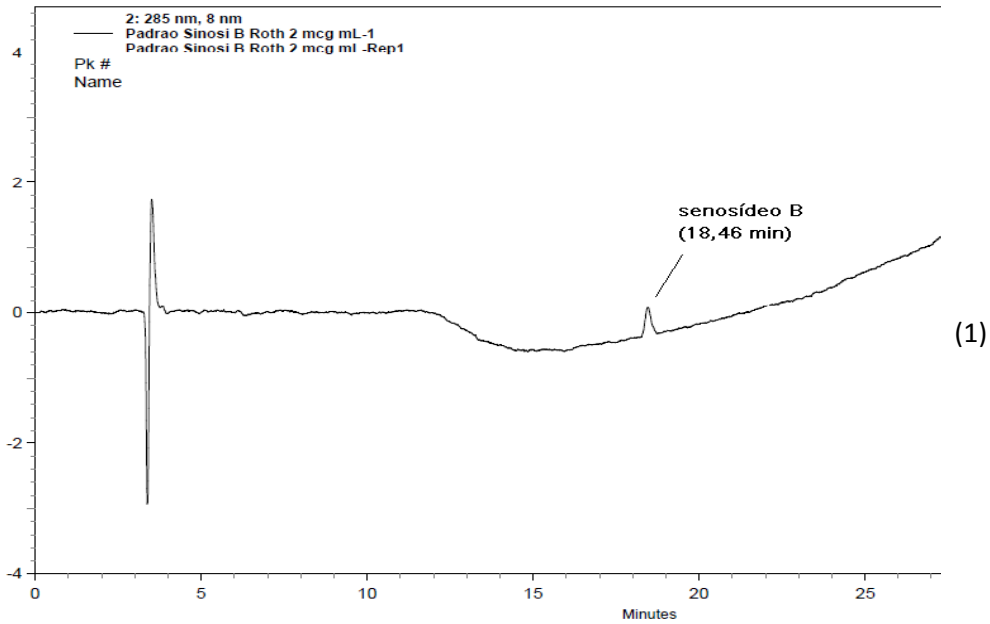
n.a. = não analisado

**** valores de λ máximos em negrito.

***** Para análises comparativas iniciais, ver Stuppner & Sturm (1996); Terreaux et al. (2002); Demirezer et al. (2011);. A possível suposição de isômeros baseia-se na ordem de eluição descrita na literatura para sinais correlatos, e no critério dos derivados glucosídicos possuírem menor retenção na fase estacionária reversa.

5.4.3 Análise quantitativa do teor de senosídeos do conteúdo das cápsulas duras por CLAE

Os cromatogramas dos padrões de Senosídeo A e B e do extrato encapsulado em HPMC fortificado com padrões em CLAE, estão representados na figura 11.



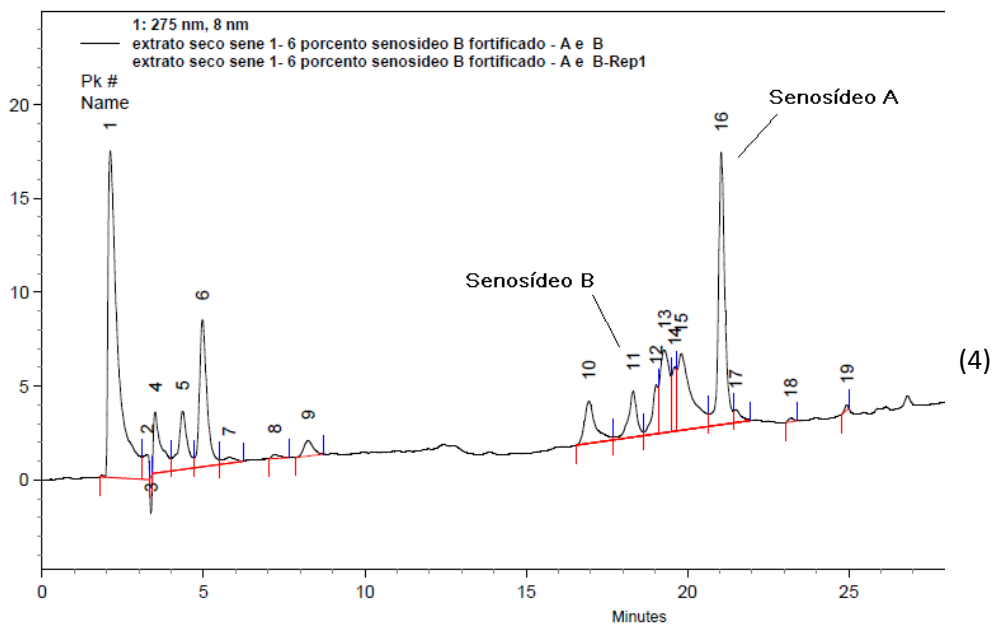
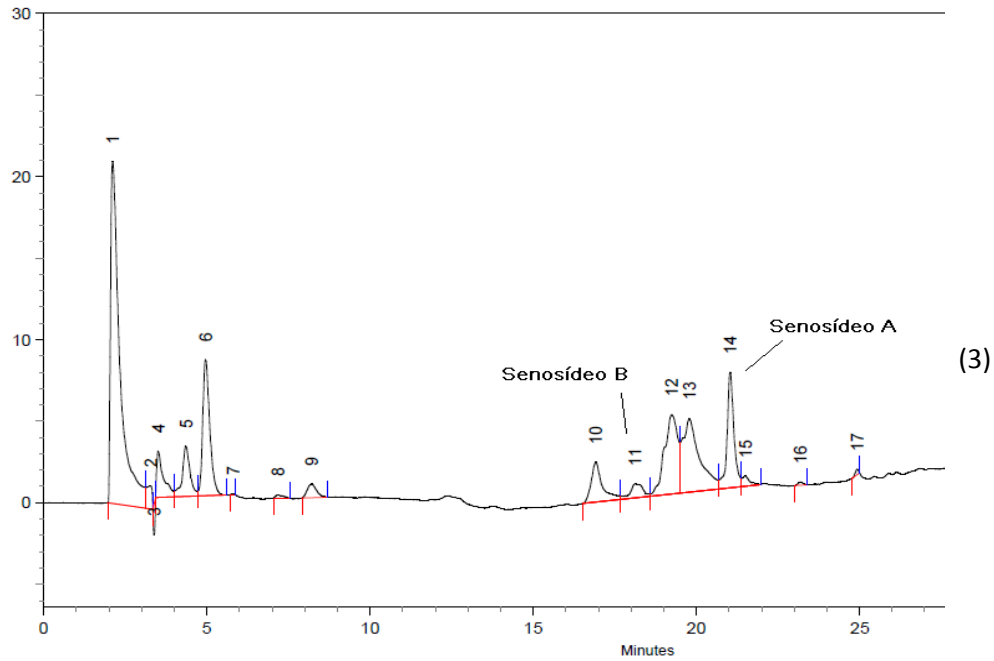


Figura 11 - (1) e (2) = Padrões de senosídeos A e B comerciais injetados na concentração mínima da curva de calibração. (3) = Amostra utilizada como referência. (4) = Amostra de referência (extrato + amido) fortificada com padrões de senosídeos A e B (150 μ l do extrato mais 165 μ l de MeOH 70%).

A avaliação por CLAE das cápsulas de gelatina e de hipromelose realizada com base na metodologia de Bala et al. (2001) apresentou os cromatogramas representados nas Figuras 12 e 13, respectivamente.

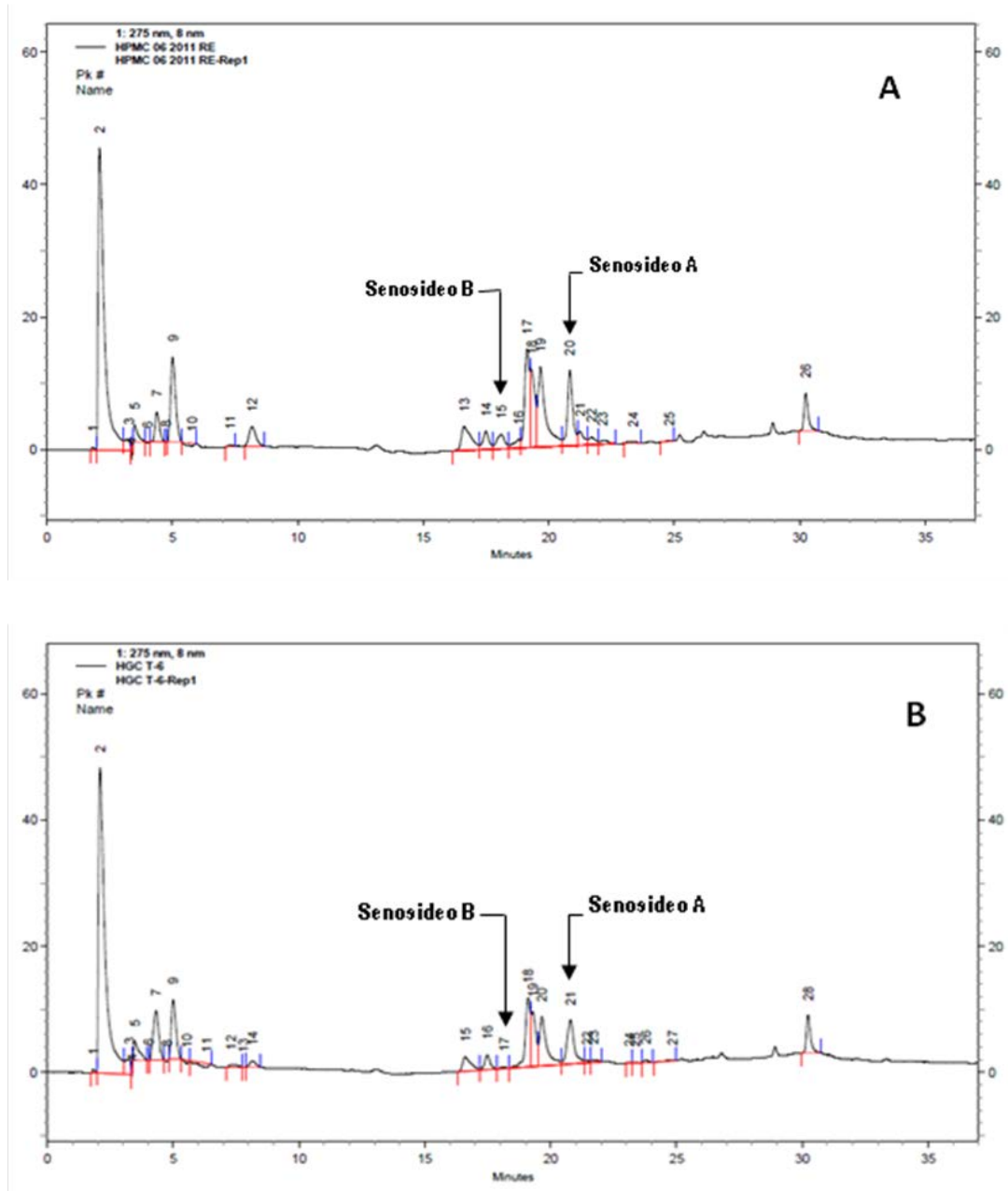


Figura 12 - Cromatogramas obtidos pela análise por CLAE das cápsulas de gelatina contendo extrato seco de Sene submetidas ao ensaio de estabilidade térmica nas condições de 30°C/65% U.R. (A) e 40°C/ 75% U.R. (B).

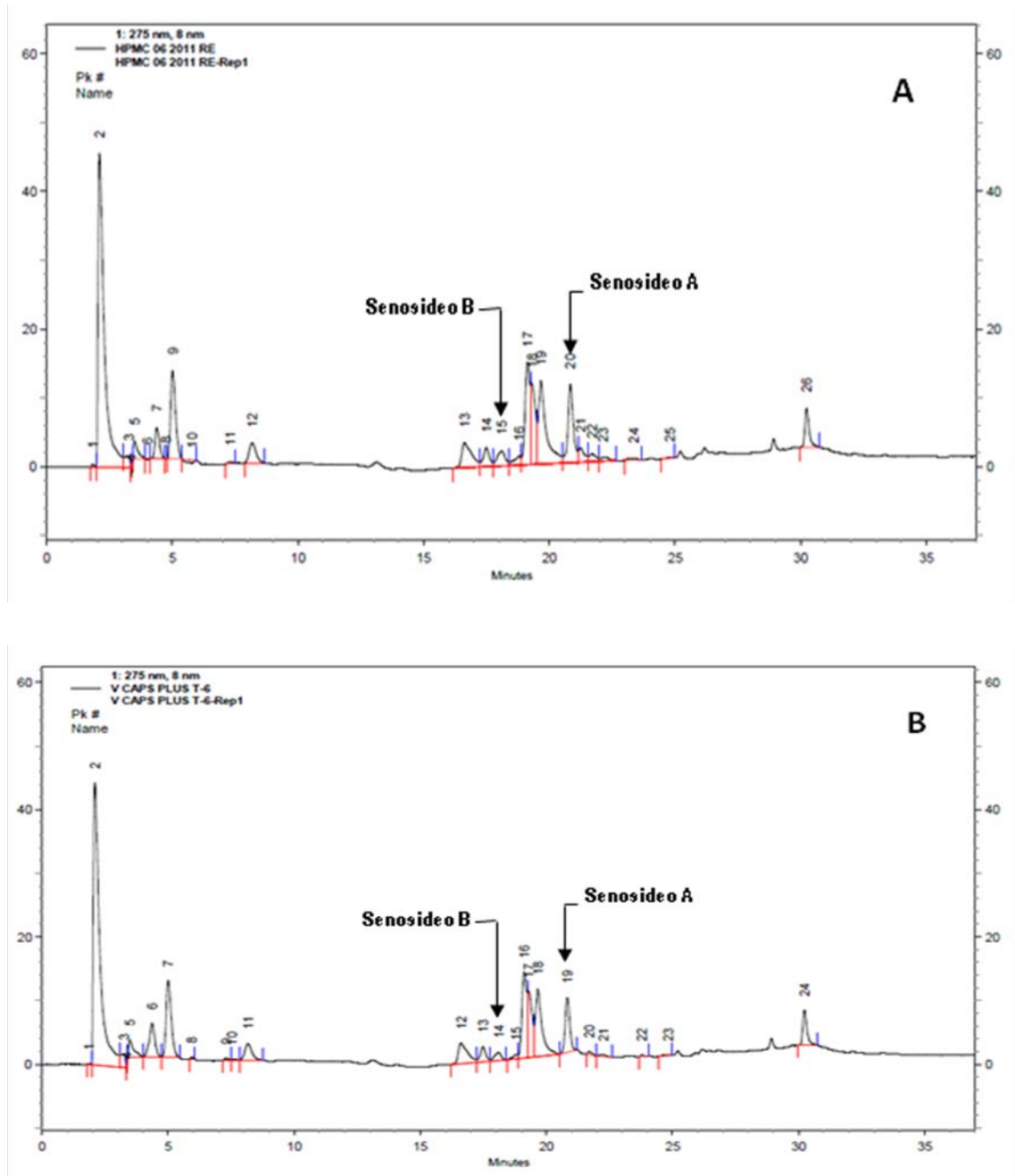


Figura 13 - Cromatogramas obtidos pela análise por CLAE das cápsulas de hipromelose contendo extrato seco de *Senecio* submetidas ao ensaio de estabilidade térmica nas condições de 30°C/65% U.R.(A) e 40°C/ 75% U.R.(B).

Para a avaliação quantitativa por CLAE dos senosídeos A e B nas cápsulas de gelatina e de hipromelose contendo extrato seco de Sene, foi estabelecida uma curva de calibração dos padrões de senosídeo A e B (Figura 14), na qual encontram-se as respectivas equações da reta e seus valores de inclinação e intercepção determinados pelo método de quadrados mínimos no ajuste da dependência linear. Também, se observam os coeficientes de correlação e a sensibilidade relativa do método.

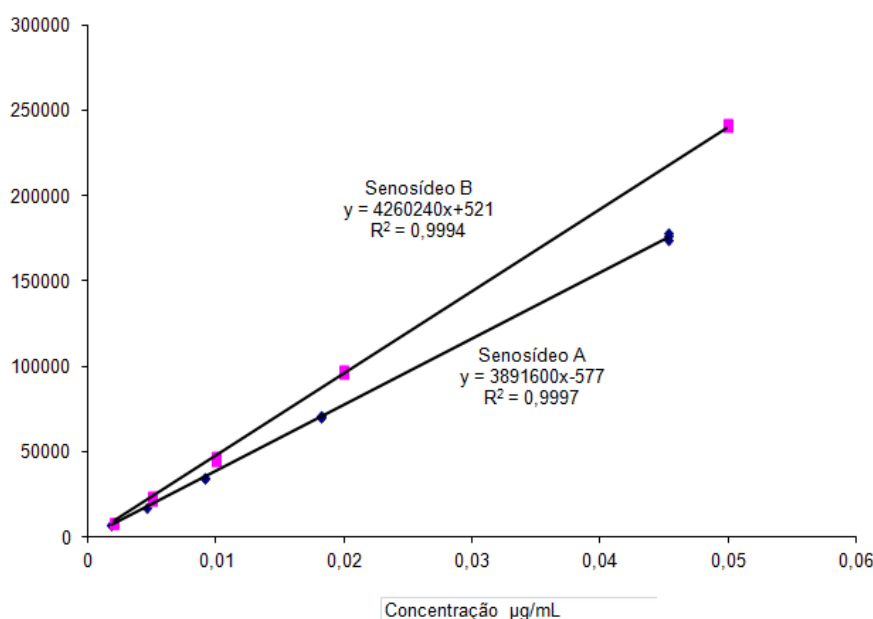


Figura 14 - Representação gráfica das curvas de calibração dos senosídeo A e B.

Os resultados dos teores dos senosídeos A e B presentes no conteúdo das cápsulas duras de gelatina e hipromelose, após estresse térmico nas condições do estudo estão descritos na Tabela 06.

Tabela 06 - Teores de senosídeos A e B determinados por CLAE nas cápsulas de gelatina e hipromelose após estresse térmico, no estudo de estabilidade acelerada.

Tipo de Cápsulas	Condições de estresse térmico	Concentração (g/100g de fitoterápico)	
		Senosídeo A (média±dp)	Senosídeo B (média±dp)
Gelatina	30°C ± 2°C / 65% ± 5%	0,093 ± 0,006	0,021 ± 0,001
	40°C ± 2°C / 75% ± 5%	0,077 ± 0,000	0,02 ± 0,001
Hipromelose	30°C ± 2°C / 65% ± 5%	0,095 ± 0,004	0,022 ± 0,001
	40°C ± 2°C / 75% ± 5%	0,097 ± 0,005	0,017 ± 0,001

dp = desvio padrão

Para avaliar a exatidão do método apenas o critério de recuperação foi avaliado. Para tanto 50, 100, 250 e 500 mg do conteúdo da cápsula de hipromelose foram identicamente ensaiados como na preparação da amostra. As áreas de integração dos sinais foram plotados contra a concentração do extrato inicial e os coeficientes de correlação foram calculados, conforme apresentado graficamente na figura 15.

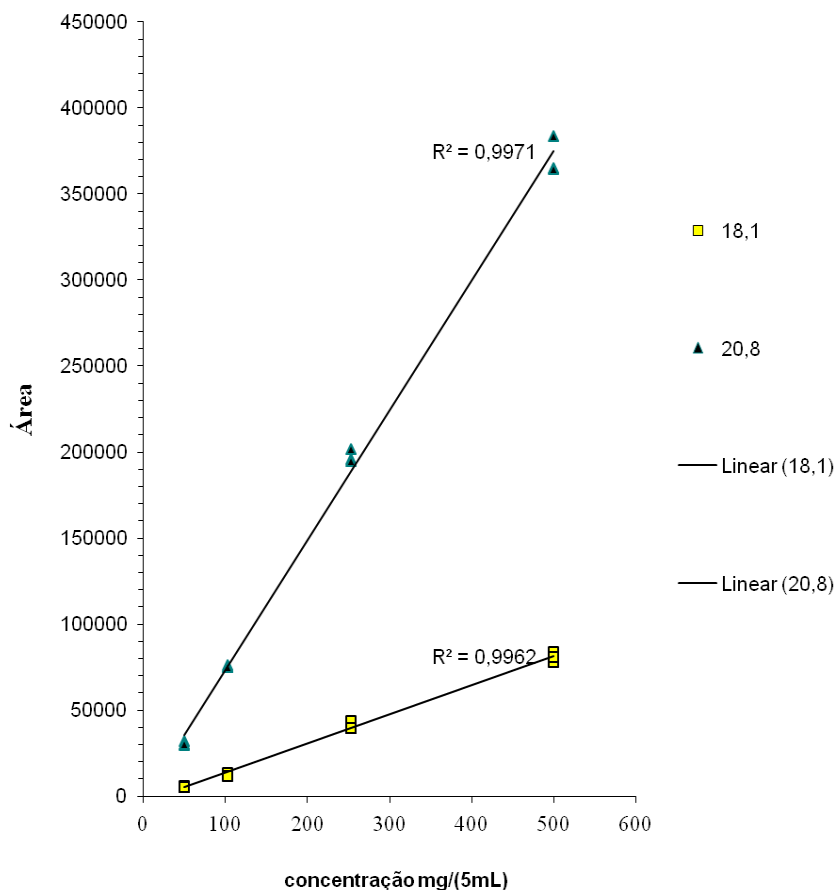


Figura 15 - Representação gráfica do ensaio de recuperação do conteúdo da cápsula de hipromelose nas concentrações de 50, 100, 250 e 500 mg/5mL. Os tempos de retenção 18,1 e 20,8 correspondem aos sinais de senosídeo B e A, respectivamente na amostra avaliada.

A curva de calibração foi determinada com cinco concentrações injetadas em triplicata, e os resultados estão apresentados na tabela 07.

Tabela 07 – Dados de linearidade do método obtidos a partir da curva de calibração dos senosídeos B e A.

	X (mg/mL)	y			y _{médio}	s	C.V. (%)
		(Áreas)					
Senosídeo B	0,0499	209262	211030	207493	209262	1769	0,85
	0,01996	98214	100759	100035	99669	1311	1,32
	0,00998	34499	34941	34056	34499	443	1,28
	0,00499	21564	21233	21377	21391	166	0,78
	0,001996	7683	7471	7895	7683	212	2,76
Senosídeo A	0,04530	176253	173358	177652	175754	2190	1,25
	0,01812	69647	69687	70729	70021	613	0,88
	0,00906	34035	34548	34488	34357	280	0,82
	0,00453	16746	16745	16747	16746	1	0,01
	0,001812	7159	7072	6706	6979	240	3,44

s = desvio-padrão. C.V. = coeficiente de variância

O tratamento estatístico dos resultados obtidos pelo modelo linear dos mínimos quadrados ordinários foi validado pela análise de variância (ANOVA), cujos elementos estão descritos nas Tabelas 08 e 09.

Tabela 08 - Análise de variância pelo método dos mínimos quadrados para os resultados de quantificação do senosídeo B.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Nº graus de liberdade	Média quadrática
Regressão	8,217E+10	1	8,217E+10
Resíduos	8,768E+08	13	6,745E+07
Falta de Ajuste	8,666E+08	3	2,889E+08
Erro Puro	1,023E+07	10	1,023E+06
Total	8,305E+10	14	5,932E+09
% de variação explicada	98,94%		
% máxima de variação explicável	99,99%		

$$F_{\text{calculado}} = 1218. F_{\text{tabelado (P 5\%)}} = 4,67. F_{\text{tabelado (P 1\%)}} = 9,07$$

Coeficientes	Valor	Erro padrão	Intervalo de confiança (95%)	
			mínimo	máximo
Angular	4260240	211408	3803521	4716959
Intercepção*	521	2998	-5956	6998

* Valores de intercepção podem ser nulos, uma vez que os limites do intervalo de confiança são de valores negativo e positivo.

Tabela 09 - Análise de variância pelo método dos mínimos quadrados para os resultados de quantificação do senosídeo A.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Nº graus de liberdade	Média quadrática
Regressão	5,651E+10	1	5,651E+10
Resíduos	1,200E+07	13	9,232E+05
Falta de Ajuste	1,384E+06	3	4,615E+05
Erro Puro	1,062E+07	10	1,062E+06
Total	5,652E+10	14	4,037E+09
% de variação explicada	99,98%		
% máxima de variação explicável	99,98%		

$$F_{\text{calculado}} = 61205. F_{\text{tabelado (P 5\%)o}} = 4,67. F_{\text{tabelado (P 1\%)o}} = 9,07$$

Coeficientes	Valor	Erro padrão	Intervalo de confiança (95%)	
			mínimo	máximo
Angular	3891600	27246	3832740	3950461
Intercepção*	-577	351	-1335	181

* Valores de intercepção podem ser nulos, uma vez que os limites do intervalo de confiança são de valores negativo e positivo.

6 DISCUSSÃO

Com relação às características físico-químicas do extrato seco, o percentual de perda por dessecação ficou dentro da especificação estabelecida pela Farmacopeia Europeia 6ª Ed. (2007), para extrato seco de Sene, que é de no máximo 5%. O resultado encontrado está um pouco acima (0,2%) do resultado apresentado no laudo do extrato (2,67%), possivelmente devido a absorção de umidade durante a manipulação.

O teor de cinzas nas farmacopeias consultadas (USP, Europeia e Brasileira) estabelecido para o material vegetal é de no máximo 12%. A especificação no laudo do extrato é de < 5% e o resultado de 0,44%. O valor encontrado foi muito pequeno e dentro do esperado, já que o material de estudo não deve apresentar resíduo orgânico. A distribuição granulométrica (figura 05), segundo a Farmacopeia Brasileira 5ª Ed. (2010), classifica o material como 'pó finíssimo'.

A análise dos constituintes hidroxiantracênicos (tabela 01) mostrou resultados muito abaixo do limite estabelecido pela Farmacopeia Brasileira 5ª Ed. (2010), que é de 2,5%. Vale ressaltar que este valor é estabelecido para a material vegetal, reduzida a pó; desta forma não há parâmetro de comparação, uma vez que utilizamos o extrato seco. No entanto, considerando que o extrato seco deve apresentar uma maior concentração de componentes ativos, este valor realmente apresentou um resultado muito abaixo do esperado. A análise foi realizada em duas concentrações diferentes, pois quando analisamos em uma concentração duas vezes maior do que preconizada pela Farmacopeia (200 mg), observamos que a etapa de filtração por gravidade foi extremamente dificultada e lenta (cerca de 5 horas), destacando-se o aspecto coloidal formado pelo material na solução de análise. A formação deste sistema coloidal possivelmente deve-se à presença de um adjuvante de secagem, sendo o dióxido de silício coloidal o mais frequentemente empregado, entre outros como a celulose microcristalina e hidroxipropilmetilcelulose (PETROVICK, 2006). Devido a este fato, e partindo do princípio que quanto menor o conteúdo de adjuvante menor seria a interferência na etapa de filtração, repetiu-se a análise reduzindo a amostragem a um terço da massa estabelecida pela Farmacopeia (cerca de 50 mg). O resultado obtido, no entanto, também se revelou

muito abaixo do estabelecido. É possível que o sistema coloidal formado também tenha retido parte dos derivados hidroxiantracênicos, comprometendo assim a análise. Estes resultados demonstram que o método não apresentou eficiência na determinação dos hidroxiantracênicos, sugerindo que um método mais específico, como a CLAE seja mais eficiente para a análise dos senosídeos. Vale ressaltar que a Farmacopeia Europeia apresenta uma metodologia similar a Farmacopeia Brasileira, com modificações nas diluições no preparo da amostra, para o doseamento de senosídeos no extrato seco de Sene, e a especificação neste caso é de 5 a 8% de hidroxiantracênicos glicosilados.

A determinação de peso médio mostrou que o peso médio encontrado para a cápsula de gelatina apresentou uma variação percentual de 1,2% para o valor máximo e 1,9% para o valor mínimo do peso médio. As cápsulas de hipromelose apresentaram variação percentual de 2,59% e 2,79% para o valor máximo e mínimo respectivamente, em relação ao peso médio. As amplitudes comparadas dos resultados também demonstraram que o peso médio das cápsulas de hipromelose variou mais do que o peso médio das cápsulas de gelatina (Tabela 02 e Figuras 06 e 07). No entanto, os percentuais encontrados estão dentro do valor preconizado pela Farmacopeia Brasileira 5 Ed. (2010), que é de $\pm 7,5\%$, para cápsulas com peso maior que 300 mg, demonstrando que as cápsulas de ambos os tipos de materiais variaram o peso médio dentro de percentagens aceitáveis.

Nos resultados das análises físicas realizadas nas cápsulas duras após o estresse térmico acelerado (Tabela 03 e 04), observou-se que as cápsulas de hipromelose apresentaram um melhor desempenho, após o estresse térmico acelerado em quase todos os testes físico-químicos quando comparadas com as de gelatina, exceto para atividade de água que não apresentou diferença. Com relação à susceptibilidade de quebra, as cápsulas de gelatina cheias foram reprovadas no teste, em especial as cápsulas submetidas às condições de 40°C/75% U.R. onde quase 50% das cápsulas apresentaram quebras. O limite estabelecido pelo Guia de Controle de Qualidade do Laboratório de Controle da Capsugel é de 6 cápsulas em 100. Por outro lado, as cápsulas de hipromelose foram aprovadas, como demonstraram os resultados obtidos.

As cápsulas de gelatina cheias após seis meses, em ambas as condições, apresentaram um teor de perda por dessecação abaixo do aceitável, indicando a

perda de umidade para o extrato. Apresentaram um aumento no tempo de desintegração, mas permanecendo dentro da especificação. Tais resultados são devidos aos efeitos de *crosslinking* já bem definidos e descritos para cápsulas de gelatina (OFNER et al., 2001, VENUGOPAL; SINGH, 2001; BROWN et al., 1998). A gelatina, quando exposta à temperatura acima de 105°C e elevada umidade, produz a chamada gelatina insolúvel, que foi atribuída ao mecanismo de condensação *crosslinking* de um grupo amino para um ácido carboxílico. Adicionalmente tem sido sugerido que a diaminação oxidativa entre os dois grupos amino adjacentes do resíduo de lisina, na estrutura molecular da gelatina, formaria um aldeído e depois um *crosslink* durante a exposição a elevadas temperaturas (OFNER et al., 2001). A perda de solubilidade da gelatina em água leva a uma conseqüente redução da taxa de dissolução, o que explica o aumento no tempo de desintegração das cápsulas de gelatina cheias e também da vazia que foi submetida à temperatura e umidade elevadas.

A atividade de água (a_w) é definida como a razão entre a pressão de vapor de um produto e do vapor da água pura na mesma temperatura. Esta razão é numericamente igual a 1/100 no produto em sistema bem fechado (AOAC, 2010). Como o extrato de Sene é higroscópico, esperava-se que as cápsulas cheias realmente apresentassem uma atividade de água. No entanto, não há diferença entre a atividade de água inicial e após o período de seis meses, em ambas as cápsulas (tabela 03). Ambas as amostras apresentaram atividade de água < 0,5 e este resultado implica em baixa velocidade de crescimento microbiano e baixa atividade enzimática, conforme descrito na Farmacopeia Americana 34 Ed. (2010). O que é corroborado pelos resultados da avaliação microbiológica que foram muito abaixo do limite especificado para contagem de bactérias aeróbias totais e contagem de bolores e leveduras, mesmo tendo estes aumentado após o estresse térmico. A presença dos patógenos, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. foi negativa, conforme esperado pelo tipo e qualidade das matérias-primas, além do manuseio dentro dos padrões de boas práticas de manipulação de produtos farmacêuticos.

Os resultados da avaliação física de ambas as cápsulas após estresse térmico demonstrou que as cápsulas de hipromelose apresentaram maior estabilidade para o extrato de Sene do que as cápsulas de gelatina, indicando seu

uso adequado como invólucro para produtos fitoterápicos, especialmente aqueles com alta higroscopicidade. Tal fato foi evidenciado pelo teor de senosídeo B determinado nas cápsulas de ambos os tipos após o estresse térmico oxidativo, onde se observou um decaimento deste componente, quando comparado ao teor inicial, sendo este muito abaixo do descrito na Farmacopeia Europeia 6^a Ed. (2007), indicado na Tabela 01. Upadhyay et al. (2011), estudando a estabilidade de senosídeos em diferentes materiais de embalagem por seis meses e encontraram valores percentuais próximos, em termos decimais, aos obtidos neste estudo. Neste estudo, contudo, os autores determinaram o teor de senosídeos por cromatografia em camada fina de alta eficiência (HPTLC).

Vale ressaltar que o teor dos senosídeos A e B nas cápsulas de hipromelose, comparativamente aos encontrados na cápsula de gelatina, mostraram uma maior estabilidade nas duas condições estudadas. No caso do senosídeo A, que apresenta uma maior estabilidade, não foi observada diferença no teor nas duas condições (Tabela 06).

Os resultados obtidos para cada concentração do padrão (x , mg/mL) foram expressos na Tabela 06 em termos de áreas do sinal (Y , área), desvio padrão e coeficiente de variação (CV%). Observou-se uma dependência crescente e provavelmente linear e os coeficientes de variação (CV%) atenderam exigências da ANVISA (BRASIL, 2003) quanto à precisão do método, ficando abaixo de 5% (Tabela 07).

Na Figura 14, a relação entre as áreas dos sinais e suas respectivas concentrações de partida é representada em uma curva de calibração. Esta foi estimada linearmente pelo método dos quadrados mínimos, e pode ser expressa por $Y = ax + b$. O valor de coeficiente de correlação (R^2) encontrado ao nível de 0,99, foi adequado que, por estar próximo de 1 (um), resulta num ajuste aceitável na correlação entre a concentração e a resposta do método. Portanto foi obtida uma correlação linear. Aumentando a massa do conteúdo até 500 mg continuou obtendo a mesma razão de sinal cromatográfico, indicando que não houve saturação da concentração. Por isso, foi feita a opção por 250 mg. A ANVISA recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99 e o INMETRO um valor acima de 0,90 (RIBANI et al., 2004). O coeficiente da equação de correlação foi de 4260240 para o coeficiente angular (a) e de 521 para o (b). Estes dados validaram o intervalo de

concentração dos senosídeos para a determinação quantitativa, estabelecendo assim a faixa de trabalho (linear) entre 2 e 50 µg/mL.

O tratamento estatístico dos resultados obtidos pelo modelo linear de calibração foi validado por meio da análise de variância (ANOVA), cujos elementos estão descritos nas Tabelas 08 e 09. Quanto maior a soma quadrática da regressão, melhor o ajuste, ao implicar que a relação com os resíduos seja pequena. Esta relação foi satisfatoriamente encontrada (P ao nível acima de 99% de confiança) na análise estatística ao comparar o valor de F calculado com o tabelado. Através das médias quadráticas dos resíduos é possível calcular os erros relacionados para o coeficiente linear e o angular e seus respectivos intervalos de confiança (Tabelas 08 e 09). Como os limites do intervalo de confiança do coeficiente linear apresentaram valor negativo e positivo, seu valor médio pode ser nulo (= zero).

Na avaliação química do extrato de Sene foram selecionadas duas técnicas de análise, a espectrofotometria e a cromatografia líquida de alta eficiência. É fato que o longo e antigo uso do Sene levou ao desenvolvimento e aperfeiçoamento de seu controle de qualidade com foco na análise da droga vegetal, embasado especialmente em medidas colorimétricas, acopladas a uma diversidade de métodos de extração que culminaram nos procedimentos estabelecidos e preconizados nas principais Farmacopeias como a Americana, a Inglesa, a Japonesa, a Europeia, a Portuguesa e a Brasileira. Às medidas das absorvâncias e coeficientes de extinção em comprimentos de ondas específicos do UV-Visível, com referência ao senosídeo B como padrão externo, somou-se, mais recentemente, a técnica de CLAE. Esta técnica, antes já adotada na Farmacopeia Japonesa (apud SUN; SU, 2002), agora figura também na edição mais recente da Farmacopeia Brasileira – adota com padrões de referência ambos os senosídeos A e B, nos limites mínimos de concentração na matriz vegetal, de 0,6% e 0,5%, respectivamente; critério este complementado com o mínimo de 2,5% de derivados hidroxiantracênicos totais (FARMACOPEIA BRASILEIRA 5ª Ed., 2010).

A inserção da quantificação diferenciada dos senosídeos é uma novidade em relação às edições anteriores da Farmacopeia Brasileira, que apenas preconizavam as quantidades mínimas de 4% de derivados hidroxiantracênicos e 2,5% de heterósidos (FARMACOPEIA BRASILEIRA 4ª Ed., 1988). Em parte, esta exigência adicional representa uma evolução técnica já prevista, com base nas

potencialidades do método de CLAE e seu inegável avanço nos últimos anos como ferramenta analítica, especialmente quando a matriz em análise já possui um marcador químico estabelecido – o que é comum ocorrer com plantas medicinais de uso universal. No presente caso do Sene, é possível se encontrar uma diversidade ampla de publicações científicas sobre o uso de CLAE para qualificar e quantificar extratos de origens diversas (exemplos no Quadro 02); a maioria delas tratando da separação ideal dos senosídeos A e B, dentre outros componentes, na busca por condições ótimas de quantificação e padronização do extrato.

Por outro lado, o advento da crescente utilização dos extratos secos pelas empresas que operam em larga escala trouxe também a exigência de se adequar a etapa do preparo da amostra para a análise por CLAE, por processos que podem divergir completamente daqueles aplicados sobre a droga vegetal. Os extratos secos são obtidos a partir da secagem dos extratos fluidos com auxílio de suportes sólidos inertes (adjuvantes), constituindo uma etapa tecnológica que permitiria o melhor manuseio e fabricação da forma farmacêutica sólida (SOUZA, 2007).

A coexistência dos senosídeos (e provavelmente seus correlatos) com outros compostos naturalmente presentes na matriz vegetal (incluindo enzimas glicosilases) difere substancialmente daquela do conteúdo de senosídeos dali extraídos e presentes no extrato seco. Este fato faz emergir a questão relacionada ao impacto que esta etapa de preparação do extrato seco pode causar na estabilidade destes marcadores antraquinônicos glicosilados. Em um dos raros estudos relacionados a este ponto, Goppel e Franz (2004) observaram comparativamente, por CLAE quantitativo (padrões externos: senosídeo B, isorhamnetina e réina), o decaimento dos conteúdos de senosídeos nas folhas e no extrato metanólico comercial de Sene, segundo diferentes condições de armazenamento (25-40°C e 60-75% U.R.; até 600 dias), conforme preconizadas pelo International Conference on Harmonization (ICH), atentando para um tratamento idêntico no preparo das amostras. Como observação geral, os autores demonstraram que as substâncias antranóides degradam-se conforme diferentes padrões, envolvendo em geral hidrólise dos açúcares, que diminuiria os teores de glicosídeos (aumentando os teores de agliconas), e decomposições oxidativas, quando temperaturas mais altas estavam envolvidas (Figura 06). Os senosídeos A e B foram sempre as substâncias mais suscetíveis, degradando-se rapidamente. Entre

eles, o senosídeo B sempre foi o mais suscetível, com maior velocidade de decomposição. Também a perda de uma molécula de glicose e quebra oxidativa dos senosídeos dímeros em duas moléculas, foram mais favoráveis do que a perda sequencial de glicosídeos, para gerar as senidinas (dímeros sem glucoses), então encontradas em concentrações muito baixas ao final dos experimentos.

Em outro estudo, Yokun e Kruep (2002) desenvolveram um método analítico por CLAE, para determinar os senosídeos (uso de padrões: senosídeos A e B) em cápsulas moles de gelatina, contendo extrato seco de Sene padronizado formulado com adjuvante hidrofílico ou hidrofóbico. Os autores observaram que os senosídeos nas cápsulas formuladas com material hidrofílico degradaram muito rapidamente, chegando a 70% após 12 meses a 25 °C/60% U.R.; também com o senosídeo B degradando bem mais rapidamente que o senosídeo A. Esta decomposição não foi observada para o material hidrofóbico, que acarretou bem menores alterações. Este estudo por CLAE foi motivado exatamente pelo insucesso dos autores ao aplicar o método farmacopeico da Farmacopeia Americana que emprega a fluorimetria para dosagem dos derivados antracênicos, e o método não apresentou repetibilidade nos resultados, muito provavelmente devido às dificuldades no preparo das amostras.

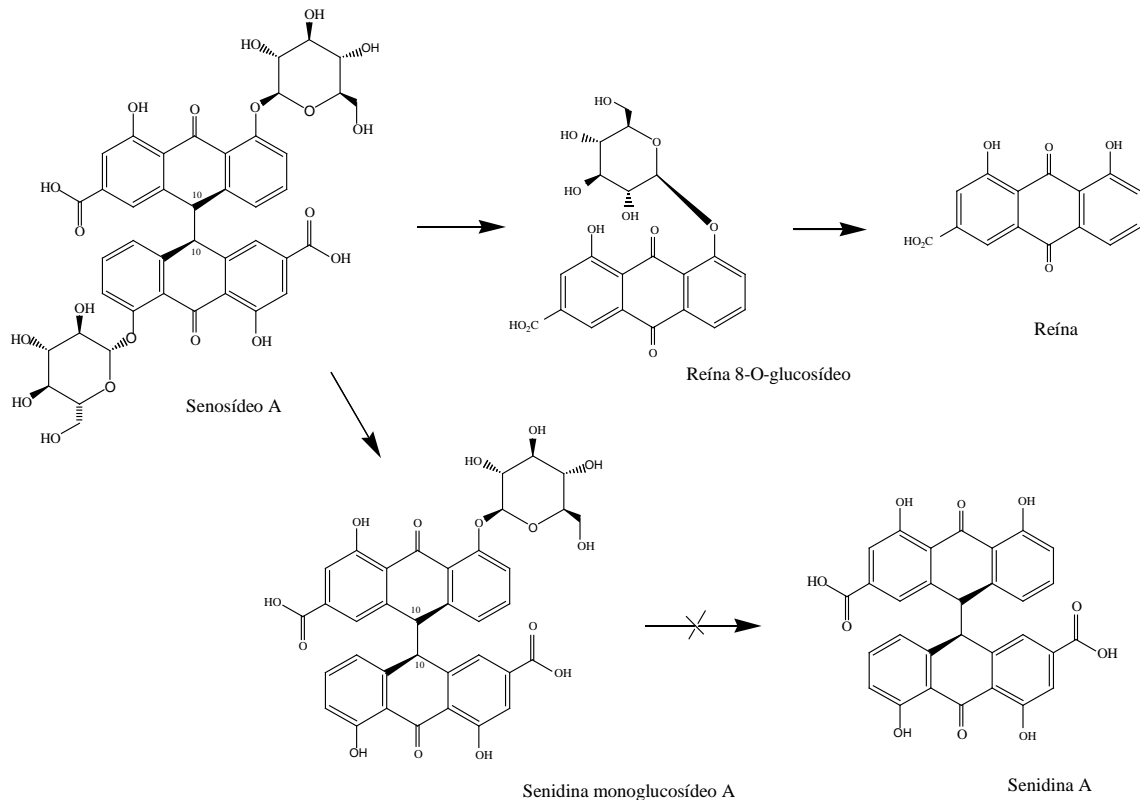


Figura 16 - Via de degradação dos senosídeos quando submetidos a 40°C/75% U.R. e decomposição do extrato a 70°C . Fonte: Adaptado de Goppel e Franz (2004).

Estes resultados encontrados por Yokun e Kruep (2002) são bastante similares aos obtidos no presente estudo, na preparação da amostra para a análise colorimétrica. É interessante notar também que o menor teor de senosídeo B encontrado no presente estudo também encontra paralelo nos resultados de Yokun e Kruep (2002) e Goppel e Franz (2004), mencionados acima.

Num estudo totalmente voltado para o desenvolvimento e a validação do método por CLAE, Sun e Su (2002) quantificaram os senosídeos A e B (padrões: comerciais) em soluções preparadas a partir de extrato de Sene em forma de comprimidos, comercializados por uma empresa. Os autores prepararam a amostra a ser analisada sonicando os comprimidos pulverizados em solução de bicarbonato de sódio, seguido de filtração em membrana de Nylon. A separação ótima foi obtida por um método robusto, reproduzível, com alta recuperação. Contudo, nem a formulação do comprimido nem a empresa são citadas na publicação.

Os resultados do presente estudo, relacionados ao teor de derivados hidroxiantracênicos e de senosídeos, mostram a necessidade de uma melhor investigação especialmente no que tange a preparação de amostra e escolha das técnicas de avaliação de quantificação dos senosídeos em extratos secos utilizados na produção de medicamentos fitoterápicos a base de Sene. No que tange ao tipo de cápsula a ser empregada, buscando uma melhor estabilidade para este extrato, o estudo demonstrou que as cápsulas de hipromelose são mais indicadas para a utilização também em produtos fitoterápicos. A literatura já relata que as cápsulas de hipromelose apresentam um melhor desempenho farmacêutico em produtos com caráter higroscópico (KU et al., 2010; HONKANEN et al., 2002) e o resultados apresentados neste estudo demonstraram que a cápsula de hipromelose também apresentou melhor performance do que as cápsulas de gelatina, convencionalmente empregadas no mercado para veicular fitoterápicos.

7 CONCLUSÃO

- Após estresse térmico, as cápsulas (cheias de extrato) de hipromelose demonstraram ser fisico-quimicamente mais estáveis do que as de gelatina.
- Após estresse térmico, as cápsulas de hipromelose conferiram maior estabilidade química para o extrato seco de sene que as cápsulas de gelatina, quanto ao teor de senosídeos A e B.
- Os resultados do trabalho apontam para a maior eficiência da cápsula de hipromelose no que tange a manutenção do aspecto farmacotécnico de elaboração do fitoterápico.
- A técnica de CLAE quantitativa para análise dos senosídeos A e B mostrou ser eficiente e reprodutível passível portando, de ser empregada como uma ferramenta para a análise de fitoterápicos derivados de Sene. No entanto, ainda é necessário estabelecer uma melhor padronização no preparo da amostra para esta técnica, bem a necessidade de aprofundamento nas investigações relativas à quantificação dos derivados hidroxiantracênicos e dos senosídeos A e B no extrato seco e no produto farmacêutico nas diferentes técnicas descritas nas Farmacopeias.
- Em seu conjunto, os resultados indicam que a hipromelose pode ser uma alternativa viável na produção de cápsulas de medicamentos fitoterápicos contendo extratos secos, especialmente aqueles com alta higroscopicidade.

7.1 Perspectivas futuras

- Avaliação dos derivados hidroxiantracênicos no extrato seco de Sene e nas cápsulas submetidas ao estresse térmico, segundo outras metodologias, como, por exemplo, a descrita na Farmacopeia Europeia, monografia específica para extrato seco de Sene.
- Determinação dos senosídeos A e B no extrato seco nas mesmas condições realizadas para as cápsulas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKTAR, W.; POI, R.; BHATTACHARYYA, A. Status of sennosides conten in various Indian herbal formulations: Method standardization by HPTLC. **Bangladesh J. Pharmacol.** v.3, p.64-68, 2008.

ALONSO, J. R. **Tratado de Fitomedicina**. Buenos Aires: ISIS Ediciones, p.888, 1998.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**. 18^a Ed. Rev.3, Maryland, AOAC, p.3000, 2010.

AUTERHOFF, H.; KINSKY, G. Die Wertbestimmung von Sennesblättern. **Arch. Pharm.** V.298, p.810, (1965).

BALA, S.; UNIYAL, G. C.; DUBEY, T.; SINGH, S. P. (2001). An improved method for the analysis of sennosides in *Cassia angustifolia* by High-Performance Liquid Chromatography. **Phytochem. Anal.** 12, p.277-280 (2001).

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 899 de 29 de maio de 2003. Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 02 jun. 2003. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/e-legis/> Acesso em: 06 de mar. 2012.

_____. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 1 de 29 de julho de 2005. Guia para Realização de Estudos de Estabilidade de Medicamentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 01 ago. 2005. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/e-legis/> Acesso em: 20 de jan. 2010.

_____ (a). Portaria nº. 971 de 03 de maio de 2006. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS). **Diário Oficial (da) República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 04 maio 2006. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/portariafito.pdf>. Acesso em: 20 de jan. 2010.

_____ (b). Decreto nº. 5813 de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. **Diário Oficial (da) República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 23 jun. 2006. Seção 1, p.2. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/portariafito.pdf>. Acesso em: 20 de jan. 2010.

_____. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa nº 5, de 11 de dezembro de 2008. Dispõe sobre a lista de medicamentos

fitoterápicos de registro simplificado. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 11 dezembro 2008. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/e-legis/> Acesso em: 20 de jan. 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Áreas de Atuação/Medicamentos/Medicamentos Fitoterápicos/Definição. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/fitoterapicos/index.htm>. Acesso em: 20 de jan. 2010.

_____. (a). Farmacopéia Brasileira. 5ªed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/index.htm/ Acesso em: 09 de jun. 2010.

_____. (b). Resolução- RDC Nº. 14, de 31 de março de 2010. Registro de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 05 abr. 2010. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/e-legis/> Acesso em: 14 de set. 2011.

BORNTRÄGER H. Schneller Nachweis der Aloë in Elixiren, Liqueuren und im Bier. **Zeitschrift für Analytische Chemie. Fresenius Zeitschr.** v.19(1), p. 165-167, 1880.

BRENDEL, W. D.; BERGER, L. Wertbestimmung von folia – und fructus sennae sowie deren zubereitungen. **Planta Med.** v.25(4), p.124-127, 1974.

BRENDEL, W. D.; SCHNEIDER, D. Wertbestimmung von folia und fructus sennae sowie deren zubereitungen. **Planta Med.** v.25(1), p.63-67, 1974.

BROWN, J.; MADIT, N.; COLE, E.T.; WILDING, I.R.; CADÉ, D. The effect of cross-linking on the *in vivo* disintegration of hard gelatin capsules. **Pharmaceutical Research** 15(7):1026-30, 1998.

BURKE MARKETING RESEARCH. **1000 Patients Give Their Opinion on the Capsule**. Resultado de Pesquisa, Chicago, 1992.

CADE, D.; SCOTT, R.; HE, X. **Polymer Film Composition for Capsules**. Estados Unidos da América Patent US 6,517,865 B2. 11 de fevereiro de 2003.

CAPSUGEL. **Technical Reference File - Vcaps® Plus Capsules 2008**, Greenwood, Estados Unidos da América, 2008.

_____. **Technical Reference File - Hard Gelatin Capsules 2009**, Greenwood, Estados Unidos da América, 2009.

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

CENTRAX BULAS. Disponível em: www.bulas.med.br/index.pl?act=search&q=Sene. Acesso em 12 de outubro de 2010.

CHERNOVIZ, P. L. N. A Grande Farmacopeia Brasileira - **Formulário e Guia Médico**. Vol II (reedição 1841), ed. Itatiaia, Rio de Janeiro, 1996, p. 335-338.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. (2008). O estado da arte da Cromatografia associada à Espectrometria de Massas acoplada à Espectrometria de Massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Quimica Nova** v.31 (3), p.623-636.

CHRIST, VON B.; PÖPPINGHAUS, T.; WIRTZ-PEITZ, F. (1978). Isolierung und strukturaufklärung eines neuen Sennosids aus *Cassia senna* L. **Arzneim.-Forsch.** v.28 (1), p. 225-231, 1978.

COLE, E. T.; SCOTT, R.A.; CADE, D.; CONNOR, A. L.; WILDING, I. R. *In Vitro* and *in vivo* Pharmacoscintigraphic Evaluation of Ibuprofen Hypromellose and Gelatin Capsules. **Pharmaceutical Research**, v.21, n.5, p.793-798, 2004.

CONSELHO REGIONAL DE FARMÁCIA - CRF/SP. **Fitoterapia. Cartilha**, São Paulo: Comissão Assessora de Fitoterapia do CRF-SP. São Paulo, 2009.

DÁVID, Á. Z.; MINCISOVICS, E.; PÁPAI, K., LUDÁNYI, K.; ANTAL, I.; KLEBOVICH, I. HPLC–MS Analysis of sennosides A and B in aqueous extracts of *Sennae folium* prepared by a new microwave extraction method. **Acta Chromatographica**, v.21, n.3, p.473-482 (2009).

DEMIREZER, L. O.; KARAHAN, N.; UCATURK, E.; KURUUZUM-UZ, A.; GUVENALP, Z.; KAZAZ, C. HPLC fingerprint os sennosides in laxative drugs with isolation of standard substances from some Senna leaves. **Records of Natural Products**. v.5 (4), p.261-270, 2011.

DEQUEKER, R.; LEMLI, J.; CUVEELE, J. Recherches sur lês drogues a principes anthraquinoniques. **Planta Med.** v.12, p.51-56, 1964.

DRESSEN, M.; EYSSEN, H.; LEMLI, J. The metabolism of sennoside A and B by the intestinal microflora: *in vitro* and *in vivo* studies on the rat and the mouse. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v.33, p.679-681, 1981.

DUBLANC, J.; MOTHÈS, F. **Cápsulas de Gelatina**. France Patent 5648, 1834.

DUEZ, P.; VANHAELEN, M.; VANHAELEN-FASTRE, R.; HANOCQ, M.; MOLLE, L. (1984). Comparison between high-performance thin-layer chromatography-fluorometry and high-performance chromatography for the determination of sennosides A and B in Senna (*Cassia* spp.) pods and leaves. **J. Chromatogr.** p.303, 391-395, 1984.

EUROPEAN PHARMACOPEIA. Directorate for the quality of medicines & healthcare of the council of Europe-EDQM. **The European Pharmacopeia**. 6^a ed. Council OF Europe: Strasbourg, France, v.2, p.2869, 2007.

FAIRBAIN, J. W.; FRIEDMANN, C. A.; RYAN, A. H. Vegetable purgatives containing anthracene derivatives. Part X. **J. Pharm. Pharmacol.** v.10, Suppl. 186T-192T, 1958.

FAIRBAIRN, J. W.; SALEH, M. R. I. Vegetable purgatives containing anthracene derivatives. Part IV. **J. Pharm. Pharmacol.** v.5, p.317-326, 1953.

FAIRBAIRN, J. W.; SCHRESTHS, A. B. The distribution of anthraquinone glycosides in *Cassia senna* L. **Phytochemistry.** v.6, p.1203-1207, 1967.

FAIRBAIRN, J. W.; MOSS, M. J. R. The relative purgative activities of 1,8-dehydroxyanthracene derivatives. **J. Pharm Pharmacol.** v.22, p.584-593, 1970.

FARMACOPEIA BRASILEIRA, 4ª ed. São Paulo, Atheneu, 1988.

FARMACOPEIA DOS ESTADOS UNIDOS DO BRASIL. 2ª Edição. São Paulo, Ind. Graf. Siqueira, (Código Farmacêutico Brasileiro), p. 709, 1959.

FARMACOPEIA PORTUGUESA 8ª Edição. Lisboa: Infarmed - Ministério da Saúde, 2005.

FERREIRA, A. O. **Manipulação de Fitoterápicos**. Anfarmag. Disponível em: <http://sinamm.no-ip.info/webdesk/Apostilas/Manipulacao%20fitoterapicos_marca%20agua_parte%202.pdf> . Acesso em 12 de outubro de 2010.

FRIEDRICH, H.; BAIER, S. Untersuchungen über die inhaltsstoffe der sennesblätter. **Planta Med.** v.23, p.74-87, 1973.

GOPPEL, M.; FRANZ, G. (2004). Stability controlo f Senna leaves and Senna extracts. **Planta Med**, v.70, p.432-436.

GÖRLER, K.; MUTTER, S.; WESTPHAL, C. Hochdruckflüssigkeitschromatographische Untersuchungen von Sennazubereitungen. **Planta Med.** v.37, p.308-315 (1979).

GRIEVE, M. **A Modern Herbal**, 1931. Disponível em: <http://www.botanical.com/botanical/mgmh/s/senna-42.html>. Acesso em 07 março de 2012.

GUIMARÃES, J.; MEDEIROS, J.; VIEIRA, L. Programa fitoterápico farmácia viva no SUS-Betim, Minas Gerais. **Divulgação em Saúde Pública para Debate** v.36, p. 41-47, 2006.

HABIB, A.; EI-SEBAKHY, N. Spectrophotometric estimation of sennosides and rhein glycosides in senna and its preparations. **J. Nat. Prod.** v.43(4), p.452-458, 1980.

HAUPTMANN, H.; NAZÁRIO, L. L. Some constituent of the leaves of *Cassia alata* L. **J. Am. Chem. Soc.** v.72, p.1492-1495, 1950.

HAYASHI, S.; YOSHIDA, A.; TANAKA, H.; MITANI, Y.; YOSHIZAWA, K. (1980). **Chem. Pharm. Bull.** v.28(2), p.406-412, 1980.

HONKANEN, O. **Biopharmaceutical Evaluation of Orally and Rectally Administered Hard Hydroxypropyl Methylcellulose Capsules**. 2004. Dissertação Acadêmica, University of Helsinki, Faculty of Pharmacy, Division of Biopharmaceutics and Pharmacokinetics and University Pharmacy. Helsinki, 2004.

HONKANEN, O.; LAAKSONEN, P.; JANNE, M.; SARI, E.; RAIMO, T.; MARTII, M. Bioavailability and in vitro oesophageal sticking tendency of hydroxypropyl methylcellulose capsule formulations and corresponding gelatine capsule formulations. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. v.15, p. 479-488, 2002.

ICH - International Conference on Harmonization - Guidance for Industry: Q1A(R2) Stability Testing of New Drug Substances and Products. Current Step 4 version dated 6 February 2003 <http://www.ich.org/products/guidelines/quality/article/quality-guidelines.html>. Acesso em 12 de janeiro de 2010.

KHAFAGY, S. M.; GIRGIS, A. N.; KHAYYAL, S. E.; HELMI, M. A. Estimation of sennosides A, B, C and D in Senna leaves, pods and formulation. **Planta Med**. v.21, p.304-309, 1972.

KOBASHI, K.; NISHIMURA, T.; KUSAKA, M.; HATTORI, M.; NAMBA, T. Metabolism of sennosides by human intestinal bacteria. **Planta Med**. v.40(3), p.225-236, 1980.

KOMOLAFE, O. O. Ion-pair partition chromatography analysis of anthraquinone glycosides of Senna and pharmaceutical preparations of Senna. **J. Chromatogr. Sci**. v.16, p.496-499, 1978.

_____. High Pressure Liquid Chromatographic analysis of sennosides A and B purgative drugs. **J. Pharm. Sci**. v.70(7), p.727-730, 1981.

KHORANA, M. L.; SABGHAVI, M. M. (1964). Two new glycosides from *Cassia angustifolia* pods. **J. Pharm. Sci**. v.53, p.110-113, 1964.

KRAUS Von L. Übersicht der analytischen methoden zur bestimmung von anthrachinondrogen. **Planta Med** v.7, p.427-446, 1959.

KRINSKY, D.L. ; LAVALLE, J. ; HAWKINS, B. **Natural Therapeutic Pocket Guide**. Hudson: AphA (American Pharmaceutical), 2003.

KU, M. S.; LI, W.; DULIN, W.; DONAHUE, F.; CADE, D., BENAMEUR, H.; HUTCHISON, K. Performance qualification of a new hypromellose capsule: Part I. Comparative evaluation of physical, mechanical and processability quality attributes of Vcaps Plus®, Quali-V® and gelatin capsules. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 386, p.30-41, 2010.

KUSSMAUL, W; BECKER, B. Die kolorimetrische der Sennaglycoside. **Helv. Chim. Acta** v.30, p.59-63, 1947.

LADDHA, K. S. A modified method for the isolation of Rhein from Senna. **Med. Nat. Prod.** v.71 (2), p.128-129, 2009.

LAWRENCE, J. F.; FREI, R. W. A quantitative assay for sennosides by fluorogenic derivatization on thin-layer chromatograms. **J. Chromatogr.** v.79, p.223-228, 1973.

LEMLI, J. The estimation of anthracene derivatives in senna and rhubarb. **J. Pharm. Pharmacol.** v.17, p.227-234, 1965.

_____. The chemistry of Senna. **Fitoterapia.** v.57(1), p.33-40, 1986.

LEMMENS, L. Determination of dihydroxyanthrones by densitometry after thin-layer chromatographic separation. **J. Chromatogr.** v.132, p.263-265, 1977.

LIAO, W.; CHIU, K.; MABUNI, C.; SOLIMAN, M. (1998). Analysis of sennosides A and B from Dieter's tea by HPLC-diode array spectrophotometry and negative ion electrospray Mass Spectrometry. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.61, p.317-324, 1998.

LONGO, R; MEINARDI, G. Quantitative chromatographic determination of the active principles of senna (sennoside A, sennoside B). **Boll. Chim. Farm.** v.104(8), p.503-510, 1965.

MARTINDALE. **The Extra Pharmacopoeia**, 27^a ed. The Pharmaceutical Press, London. p.1342-1343, 1977.

MERLE, J.; BARTHES, D. BESSON, J. Étude par chromatographie liquid haute performance de L'évolution des sennosides A et B em solution. **Il Farmaco**, v.39(7), p. 233-242, 1984.

METZGER, W.; REIF, K. Determination of 1,8-dihydroxyanthranoids in senna. **J. Chromatogr. A**, **740**, p.133-138, 1996.

OFNER III, C M., ZHANG, Y.; JOBECK, V. C.; BOWMAN, B. J. Crosslinking studies in gelatin capsules treated with formaldehyde and in capsules exposed to elevated temperature and humidity. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.90, (1), p.79-88, 2001.

OGURA, T., FURUYA, Y., MATSUURA, S. HPMC capsules: an alternative to gelatine. **Pharm. Technol. Eur.** v.10, p.32-42, 1998.

OSHIMA, Y.; TAKAHASHI, K. Separation method for sennosides. **J. Chromatogr.** **258**, 292-296, 1983.

OSHIO, H.; IMAI, S.; SUGAHARA, T.; MIYAMOTO, M.; TSUKUI, M. (1972). Investigation of Rhubarbs. II. Isolation of Sennoside E, a new purgative compound. **Chem. Pharm. Bull.** v.20(3), p.621-622, 1972.

PACHÚ, C. O. **Processamento de Plantas Medicinais para Obtenção de Extratos Secos e Líquidos**. Tese de doutorado em engenharia de processos. 2007. Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 2007.

PETROVICK, G.F. **Desenvolvimento e avaliação tecnológica de granulado revestido contendo produto seco obtido por spray-drying de *Achyrocline satureioides* Lam (D.C.) Asteraceae (marcela)**. 2006. Dissertação do programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

PLANTAMED. Disponível em:

http://www.plantamed.com.br/plantaservas/especies/Cassia_occidentalis.htm.

Acesso em 07 março de 2012.

RAI, P. P.; TURNER, T. D.; MATLIN, S. A. High-pressure liquid chromatography of naturally occurring anthraquinones. **J. Chromatogr.** v.110, p.401-402, 1975.

READER'S DIGEST BRASIL, RIO DE JANEIRO. **Segredos e Virtudes das Plantas Medicinais**, p.416, 1999.

RIBANI, M.; Bottoli, C.; Collins C.; Jardim, I.; Melo, L. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, (5), p.771-780, 2004.

SAGARA, K.; OSHIMA, T.; YOSHIDA, T. Rapid and simple determination of sennoside A and B in Rhei rhizoma by ion-pair High-Performance Liquid Chromatography. **J. Chromatogr.** v.403, p.253-261, 1987.

SCHULZ, V.; HÄNSEL, R.; BLUMENTHAL, M.; TYLER, V. E. **Rational Phytotherapy - A Reference guide for Physicians and Pharmacists**. 5^a ed. Springer, Berlin, 2004. 417p.

SHAH, S. A.; RAVISHANKARA, M. N.; NIRMAL, A.; SHISHOO, C. J.; RATHOD, I. S.; SUHAGIA, B. N. Estimation of individual sennosides in plant materials and market formulations by an HPTLC method. **J. Pharm. Pharmacol.** v.52, p.445-449, 2000.

SHEU, S-J.; LU, C-F. Determination of eight constituents of Hsiao-cheng-chi-tang by high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr. A 704**, p.518-523, 1995.

SHIBATA, S.; TAKITO, M.; TANAKA, O. Paper chromatography on anthraquinone pigments. **Journal of Am. Chem. Soc.** v.72, p.2789-2790, 1950.

SOUZA, C. R. F. **Produção de extratos secos padronizados de plantas medicinais brasileiras: estudo da viabilidade técnica e econômica do processo em leite de jorro**. 2007. Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Paulo-Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2007.

STOLL, A.; BECKER, B.; KUSSMAUL, W. Die Isoierung der anthraglycoside aus sennadrogen. **Helv. Chim. Acta.** v.252, p.1892-1902, 1949.

STUPPNER, H.; STURM, H. LC-MS and CZE of dianthrones from *Cassia angustifolia* and *acutifolia*. **Chromatographia**. v.42(11/12), p.697-703, 1996.

SUN, S-W.; SU, H-T. Validated HPLC method for determination of sennosides A and B in senna tablets. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v.29, p. 881-894, 2002.

TAIZO, Y.; MATSUURA S.; AKAI K. **Capsule shell compositions and their use**. London Patent EP 0 714 656 A1. P.06-11, 1995.

TERREAUX, C.; WANG, Q.; IOSET, J-R.; NDJOKO, K.; GRIMMINGER, W.; HOSTETTMANN, K. Complete LC/MS analysis of a Tinneveli Senna pod extract and subsequent isolation and identification of two new benzophenone glucosides. **Planta Med**, v.68, p.349-354, 2002.

THE AMERICAN BOTANICAL COUNCIL, The Complete German Commission e Monographs – **Therapeutic Guide to Herbal Medicines**, 1.ed., Boston, 1998.

UNITED STATES PHARMACOPEIA, USP 33, The United States Pharmacopeia Convention, 28^a.ed., Rockville, p.274, 2005.

UNITED STATES PHARMACOPEIA, USP 34, The United States Pharmacopeia Convention, 29^a.ed., Rockville, p.52, 56, 276, 304, 2010.

UPADHYAY, A.; CHANDEL, Y.; NAYAK, P. S. ; KHAN, N. A. Sennoside contents in Senna (*Cassia angustifolia* Vahl.) as influenced by date of leaf picking, packaging material and storage period. **Journal of Stored Products and Postharvest Research**, v.2, n.5, p.97-103, 2011.

VERMA, R. K.; UNİYAL, G. C.; SINGH, S. P.; SHARMA, J. R.; GUPTA, M. M. Reverse-phase High-Performance Liquid Chromatography of Sennosides in *Cassia angustifolia*. **Phytochem. Anal.** v.7, p.73-75, 1996.

VENUGOPAL, K.; SINGH, S. Evaluation of gelatins for cross-linking potential. **Pharmaceutical Technology**, v.1, p.32-37, 2001.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO monographs on selected medicinal plants**. Geneva, 1999, v.1.

WHO, IUCN & WWF. J. LEAMAN, D. **Medicinal Plant Conservation**. Newsletter of the Medicinal Plant Specialist Group of the IUCN Species Survival Commission. Geneva, v.9,10, p.88, 2004. Disponível em: cmsdata.iucn.org/downloads/mpc10.pdf. Acesso em: 06 de jul. 2012.

XU, L.; CHAN, C.; LAU, C.; YU, Z.; MOK, D. K. W.; CHEN, S. Simultaneous determination of eight anthraquinones in Semen Cassiae by HPLC-DAD. **Phytochem. Anal.** v.23, p.110-116, 2012.

YOKUN, P. F.; KRUEP, D. A. A Method for the determination of sennosides in soft gelatin capsules. In: **AAPS Journal. Annual Meeting**, banner 2002-001594, 2002.

ZWAVING, J. H. High-voltage paper electrophoresis for the separation of 1,8-dihydroxyanthracene derivatives in senna and rhubarb. **J. Chromatogr.** v.97, p.109-111, 1974.

ANEXO A – Laudo de Análise do Extrato Seco de Sene


CERTIFICADO DE ANÁLISE


INSUMO:		SENNE EXTRATO SECO		Pág 1	
ORIGEM/PROCEDÊNCIA:		BRASIL/BRASIL	DATA DE ANÁLISE:		31/08/2011
LOTE PHARMA NOSTRA:		11082792A	LOTE FABRICANTE:		071098
DATA DE FABRICAÇÃO:		Julho/2011	DATA DE VALIDADE:		Julho/2013
DCB:		09926			
CONDIÇÕES DE ARMAZENAGEM:		TEMPERATURA 15°C A 30°C			
OBS 1:	Nome comum: Sene				
OBS 2:	Nome científico: Cassia angustifolia				
OBS 3:	Parte utilizada: Foliolo				
OBS 4:	Família botânica: Fabaceae				
DATA DE EMISSÃO:	00/00/0000	NF:	000.000	ORDEM FRACIONAMENTO:	3769-11
TESTES		ESPECIFICAÇÕES		RESULTADOS	
Descrição*		Pó fino e higroscópico mostarda a castanho com odor aromático		Pó fino higroscópico castanho com odor aromático	
Solubilidade*		Praticamente insolúvel na água fria, em etanol e demais solventes orgânicos		Conforme	
pH*		4,5 - 7,0 (Solução 10% em água)		4,80	
Perda por Dessecação*		≤ 5,0% (2 horas / 105°C)		2,67%	
Cinzas Totais*		≤ 5,0%		0,44%	
Elementos Estranhos*		Ausentes		Ausentes	
Densidade Aparente*		0,450 - 0,900 g/mL (Sem compactação)		0,470 g/mL	
Doseamento de Senosídeo - B*		1,00% - 6,00%		2,72%	
TESTES MICROBIOLÓGICOS					
Contagem total de bactérias*		≤ 1000 UFC/g		< 10 UFC/g	
Fungos*		≤ 100 UFC/g		< 10 UFC/g	
Salmonella sp*		Ausente		Ausente	
Escherichia coli*		Ausente		Ausente	
Staphylococcus aureus*		Ausente		Ausente	
Pseudomonas aeruginosa*		Ausente		Ausente	

*Resultados obtidos em análise realizada no Laboratório de Controle de Qualidade Pharma Nostra (UNIDADE ANÁPOLIS). E os demais foram transcritos conforme certificado de análise do fabricante.

LEGENDA DAS REFERÊNCIAS: FB (Farmacopéia Brasileira) / USP (United States Pharmacopoeia) / EP (European Pharmacopoeia) / BP (British Pharmacopoeia) / JP (Japanese Pharmacopoeia) / MG (Método Geral farmacopéico) / Fabricante (especificação e metodologia conforme o fabricante do insumo) / Informativo (resultado fornecido como Informativo pelo LCQ Pharma Nostra).

CONCLUSÃO: (X) Aprovado () Retrovado


Responsável pelo Lab. Controle de Qualidade
Daniele Rocha Carbone - CRF-GO Nº 7007


Responsável Técnico
Antônio Gabriel Uschinsky - CRF-GO Nº 1822

ANEXO B – Certificado de Análise da Cápsula de Gelatina

TO THE ATTENTION OF:

The World's Leader in Two-Piece Capsules™

CAPSUGEL
Your Natural Partner™

CERTIFICATE OF ANALYSIS

Page 1 of 3

The capsules are produced under very carefully controlled conditions. Controls are performed continuously throughout the process and guarantee that capsules conform to the highest quality standards. The capsules described below conform to the specifications as defined in the current edition of the Capsugel Technical Reference File for Empty Hard Gelatin Capsules.

PRODUCT DESCRIPTION Empty Hard Gelatin Capsules			
Customer: STOCK		Capsugel Lot Number: 90178341	
Product Name:		Customer Reference:	
Product Code:		Product Size: Size 0, CS	
Manufacturing Date: 03 May 2011		Type: Cont-Snap	
Expiration Date: 03 May 2016		Capsugel Part Number: 60HCS001209	
BODY		CAP	
Code: 0000		Code: 0000	
Name: NATURAL		Name: NATURAL	
IMPRINTING			
Logo:			
Design / Roll Code:			
Ink:			
Body Composition		Cap Composition	
GELATIN	qsp 100%	GELATIN	qsp 100%

Due to the nature of raw materials, their sourcing and technology improvements, the colorant composition data indicated are target values and actual values may vary to insure the consistency of lot color. Capsugel supports the expiry date if recommendations for warehousing and transportation are observed (recommended: 15°C-25°C and 35%-65% relative humidity).

Ingredient / Reference	E Nr	C.I. Nr	Function STRUCTURE	Regulatory References EP, USP, BR
GELATIN				

ANALYTICAL DATA

Characteristics	Test Method	Units	Specifications	Results
Identification of gelatin	WI-0107A		Positive	pass *
Sulphated ash	WI-0108A	%	Less than 7	0 *
Arsenic	WI-0104D	ppm	Less than 1	0.0023 *
Lead	WI-0104E	ppm	Less than 1	0.0000 *
Cadmium	WI-0104A	ppm	Less than 0.5	0.0013 *
Mercury	WI-0104C	ppm	Less than 0.1	0.0000 *
Lubricant content	WI-0095A	%	Less than 0.5	0.016 *
Sulphur dioxide	WI-0093A	ppm	Less than 50	3.0 *
Disintegration time	WI-0101A	min/sec	Less than 15:00	2:47 *
Acetic acid	WI-0094A	ppm	Less than 5000	3779 *
Loss on drying	WI-0119	%	Between 13.0 to 16.0	14.3
Average weight	WI-0118	mg	Between 90 to 102	94
Escherichia coli	WI-0111		Absence in 1 gram	pass *
Salmonella	WI-0113		Absence in 10 grams	pass *
Staphylococcus aureus	WI-0114		Absence in 1 gram	pass *
Pseudomonas aeruginosa	WI-0112		Absence in 1 gram	pass *
Total Yeast and Mold Count	WI-0116	cfu/g	Less than 100	< 10 *
Total Aerobic Microbial Count	WI-0115	cfu/g	Less than 1000	< 10

* Reduced frequency testing

CERTIFICATE OF ANALYSIS

Page 2 of 3

Customer: STOCK

Capsugel Lot Number: 90178341

Physical Characteristics:

"This product conforms to established A.Q.L.'s for Physical Attributes."
 "Appearance - Clean empty capsules, meeting the specified requirements of color and size."
 "Odor - Fine and insignificant odor."
 "Tact for odor, solubility and activity conforms to Japanese Pharmacopoeia requirements."
 "The reported disintegration time is subjective, and is provided to indicate Pass/Fail status for 15 minutes."

TS/EBSE Regulations:

Capsugel can use blends of several pharmaceutical gelatins. When bovine gelatin is used by Capsugel, it is in full compliance with all pharmaceutical regulatory statutes. Specifically, Capsugel fully complies with the following when applicable:

Commission Directive 2003/83/EC, compliance is demonstrated by "Certificate of Suitability".

Regulation (EC) No 853/2004 on specific hygiene rules for food of animal origin.

Regulation (EC) No 999/2001 as regards specified risk material, Commission Regulation (EC) No 722/2007.

United States: FDA, September 1997 Guidance for Industry.

United States: FDA - 21 CFR Parts 211, 224, 300, 300, 330, 400, 895, and 1271 related to Use of Materials Derived from Cattle Medical Products.

United States: FDA - 21 CFR Parts 189 and 700 related to Use of Materials Derived From Cattle in Human Food and Cosmetics.

Japanese Ministry of Health, Labor and Welfare (MHLW) - "Food Sanitation Law", No. 10 in MHLW notification on January 14, 2004.

Japanese Ministry of Health, Labour and Welfare (MHLW) - Notification No. 210 of MHLW, issued on May 20, 2003.

The raw material is derived from healthy animals slaughtered in a slaughterhouse, which have been inspected by an official veterinarian and have been deemed fit for human consumption.

Preservative Status:

Capsules are manufactured without the addition of preservatives.
 Capsules are manufactured without ethylene oxide treatment or (Ethylene Oxide is not used for terminal microbial control of empty capsule).
 Capsules are manufactured without irradiation treatment.

CAPSUGEL - FUE SIA
 Quality Assurance
 F0090178341/001/001



Approval Date & Time: 09 May 2011 05:14:22 EST

Approver:
 Luz del Carmen Sanchez
 Lab Department Head

The World's Leader in Two-Piece Capsules™

***CERTIFICATE OF ANALYSIS***

Page 3 of 3

Customer: STOCK

CapsugelLotNumber: 90178341

Carretera a Veracruz No. 1080
C.P. 72270 Puebl. Pue. México
Tel: (52)(222) 372-1524
Fax: (52)(222) 3721504

ANEXO C – Certificado de Análise da Cápsula de Hipromelose

TO THE ATTENTION OF:

The World's Leader in Two-Piece Capsules™



CERTIFICATE OF ANALYSIS

Page 1 of 2

The capsules are produced under very carefully controlled conditions. Controls are performed continuously throughout the process and guarantee that capsules conform to the highest quality standards. The capsules described below conform to the specifications as defined in the current edition of the Capsugel™ Technical Reference File for Empty Vcaps® Plus Capsules.

PRODUCT DESCRIPTION Empty Vcaps® Plus Capsules			
Customer: STOCK		Capsugel Lot Number: 70639971	
Product Name:		Customer Reference:	
Product Code:		Product Size: Size 0, CS	
Manufacturing Date: 08 Apr 2010		Type: Coni-Snap	
Expiration Date: 08 Apr 2015		Capsugel Part Number: 60HCS001370	
BODY		CAP	
Code: V43.900		Code: V43.900	
Name: NATURAL TP		Name: NATURAL TP	
IMPRINTING			
Logo:			
Design / Roll Code:			
Ink:			
Body Composition		Cap Composition	
Hypromellose	QSP 100%	Hypromellose	QSP 100%

Due to the nature of raw materials, their sourcing and technology improvements, the colorant composition data indicated are target values and actual values may vary to insure the consistency of lot color. Capsugel supports the expiry date if recommendations for warehousing and transportation are observed (recommended: 15°C-25°C and 25%-65% relative humidity).

Ingredient / Reference	E Nr E414	C.I. Nr	Function STRUCTURE	Regulatory References 2008/64/EC, EEC/JP, USP/NF
Hypromellose				

ANALYTICAL DATA

Characteristics	Test Method	Units	Specifications	Results
Identification of hypromellose	WI-0102A		Positive	pass *
Sulphate dash	WI-0108E	%	Less than 6	2 *
Arsenic	WI-0104H	ppm	Less than 1.5	0.000 *
Lead	WI-0104F	ppm	Less than 1	0.026 *
Cadmium	WI-0104E	ppm	Less than 0.5	0.000 *
Mercury	WI-0104G	ppm	Less than 0.1	0.020 *
Disintegration time	WI-0101B	min/sec	Less than 15:00	5:10 *
Acetic acid	WI-0094B	ppm	Less than 5000	194.2 *
Aspect	WI-0098A		Conforms	pass *
Description	WI-0098B		Conforms	pass *
Loss on drying	WI-0119	%	Less than 9	4.3
Average weight	WI-0118	mg	Between 90 and 102	97
Escherichia coli	WI-0111		Absence in 1 gram	pass
Salmonella	WI-0113		Absence in 10 grams	pass *
Staphylococcus aureus	WI-0114		Absence in 1 gram	pass
Pseudomonas aeruginosa	WI-0112		Absence in 1 gram	pass
Total Yeast and Mold Count	WI-0116	cfu/g	Less than 100	<10 *
Total Aerobial Microbial Count	WI-0115	cfu/g	Less than 1000	<10

* Reduced frequency testing

The World's Leader in Two-Piece Capsules™

**CERTIFICATE OF ANALYSIS**

Page 2 of 2

Customer: STOCK

CapsugelLotNumber: 70639971

Physical Characteristics:

"This product conforms to established A.Q.L.'s for Physical Attributes."

"Appearance - Clean empty capsules, meeting the specified requirements of color and size."

"Odor - Free of disagreeable odor."

"The reported disintegration time is subjective, and is provided to indicate Pass/Fail status for 15 minutes."

Preservative Status:

Capsules are manufactured without the addition of preservatives.

Capsules are manufactured without ethylene oxide treatment or (Ethylene Oxide is not used for terminal microbial control of empty capsule.)

Capsules are manufactured without irradiation treatment.

CAPSUGEL -
GREENWOOD
Quality Assurance
R070639971003005

10031209 0205 000E

Approval Date & Time: 08 Jun 2011 01:11:12 PM

Approver
Shontoria G. Smith
Supervisor In-Process QA

535 North Emerald Road
Greenwood, SC 29646
Toll Free: 800 845-6973
phone: 864 942-6644
fax: 864 942-4029