



UNIVERSITAT DE BARCELONA



UNIVERSITAT DE BARCELONA
FACULTAT DE FARMÀCIA

CONTROL DE QUALITAT DEL GUARANÀ

Treball de fi de grau

Àmbit principal: Farmacognòsia i Fitoteràpia

Àmbits secundaris: Farmacologia i Terapèutica i Química Analítica

Helena Izquierdo Borau

JULIOL 2012



Aquesta obra està subjecta a una [licència Creative Commons](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Índex

| | |
|---|----|
| Agraïments | 2 |
| Resum/Abstract | 3 |
| 1. Introducció | 4 |
| 2. Objectius | 5 |
| 3. Material i mètodes / disseny del treball | 6 |
| 4. Desenvolupament del treball | 8 |
| 4.1. Descripció botànica del guaranà | 8 |
| 4.2. Components químics del guaranà | 9 |
| 4.3. Farmacologia i usos del guaranà | 11 |
| 4.4. Identificació microscòpica i macroscòpica de la droga | 14 |
| 4.5. Assaigs de puresa de la droga | 17 |
| 4.6. Identificació de la droga per cromatografia en capa fina | 18 |
| 4.7. Valoració quantitativa de la cafeïna | 21 |
| 4.8. Proposta de monografia del guaranà per a la Farmacopea Europea | 24 |
| 5. Discussió | 27 |
| 6. Conclusions | 29 |
| 7. Bibliografia | 30 |
| 8. Annex 1. Certificat de puresa de la cafeïna CRS | 32 |
| 9. Annex 2. Desenvolupament del mètode d'identificació del guaranà per cromatografia en capa fina | 33 |
| 10. Annex 3. Desenvolupament del mètode de valoració de la cafeïna per HPLC | 39 |

Agraïments

En primer lloc, vull agrair al Dr. Salvador Cañigueral i la Dra. Roser Vila l'oportunitat que m'han donat al confiar en mi per dur a terme aquest projecte. Sense la seva confiança no hagués pogut endinsar-me en l'àmbit de la farmacognòsia i conèixer-la més a fons.

També vull donar les gràcies a l'Enric Gibert de la Unitat de Farmacologia i Farmacognòsia per haver-me ajudat en la part experimental i haver-me ensenyat tot el que sap.

He d'agrair a la Unitat de Farmacologia i Farmacognòsia de la Universitat de Barcelona haver-me permès tenir accés a tots els recursos necessaris per dur a terme aquest treball.

D'altra banda, no vull deixar de mencionar i d'agrair els consells i les ajudes que tantes persones, de manera desinteressada, m'han brindat per poder tirar endavant el projecte.

I sobretot, vull agrair als meus pares que sempre em donin suport i m'ajudin amb la seva experiència.

Resum / Abstract

En aquest treball es fa una revisió del guaranà, una planta coneguda pels seus efectes psicoestimulants, amb l'objectiu d'elaborar una monografia per al control de qualitat de la llavor de guaranà per a la Farmacopea Europea. A partir de la bibliografia s'estableixen les característiques morfoanatòmiques diagnòstiques per a la identificació de la droga vegetal i, a partir de la bibliografia i d'assaigs duts a terme al laboratori, s'estableixen els mètodes cromatogràfics que es proposaran per a la identificació i per a la quantificació del contingut de cafeïna. Finalment, es proposa un text per a la monografia de la llavor de guaranà.

The aim of this project has been to study the guarana, a plant known for its psychostimulant effects, in order to propose a monograph for the quality control of guarana seed to the European Pharmacopeia. On the one hand, the diagnostic macroscopic and microscopic characters for the identification of the herbal drug have been established by means of a literature review. On the other hand, the chromatographic methods for the identification of guarana seed and the assay for its caffeine content have been established from the literature review and the experimental work carried out in the laboratory. As a result, a text for the monograph of guarana seeds has been proposed.

1. Introducció

El guaranà o *Paullinia cupana* Kunth H.B.K. var. *sorbilis* (Mart.) Ducke., és una planta nativa de l'Amazones utilitzada tradicionalment pels indis maué de Brasil. Segons una de les seves llegendes tradicionals, els indis maué es consideren fills del guaranà. Expliquen que en l'origen dels temps hi havia tres germans, dos nois i una noia, Uniaí. Uniaí va tenir un fill que creixia com el més fort, però els seus oncles, gelosos, el van assassinar. Quan Uniaí en va trobar el cos, va decidir plantar-lo a la terra perquè fos la llavor de la planta més poderosa, capaç de guarir totes les malalties i donar força en la guerra i en l'amor. De l'ull dret del nen en va néixer el guaranà, i per això els fruits de la planta semblen ulls. Uns dies després, Uniaí va trobar sota la planta el seu fill, alegre i fort, renascut de la terra. Era el primer indi maué.

Des de fa uns anys, el guaranà s'ha fet popular a causa dels seus efectes psicoestimulants. El seu ús s'ha estès a la indústria alimentícia i farmacèutica, on s'ha convertit en un dels components de les begudes energètiques, els preparats psicoestimulants utilitzats per estudiar i en un dels coadjuvants en els preparats pel tractament del sobrepès. El principal responsable de l'acció farmacològica i l'acció del guaranà és l'elevat contingut de cafeïna en les llavors. L'increment del seu consum ha comportat que s'hagin de fer assaigs de qualitat dels preparats que el contenen i ha posat de manifest la necessitat de tenir un mètode de referència per al guaranà.

Aquest treball respon a l'encàrrec per part de la Farmacopea Europea de desenvolupar una monografia per al control de qualitat de la llavor de guaranà que inclogui els assajos de puresa, d'identificació i de valoració de la cafeïna.

Per dur a terme el treball, d'una banda, s'ha revisat la principal literatura publicada sobre el tema, a partir de la qual s'ha establert la descripció botànica del guaranà, els seus components químics, la farmacologia i els usos i, finalment, la identificació microscòpica i macroscòpica de la droga. D'altra banda, per a l'elaboració de la monografia ha calgut fer, al laboratori, els assajos de puresa de pèrdua per dessecació i cendres totals, desenvolupar un mètode per cromatografia en capa fina per identificar les llavors del guaranà i un altre per cromatografia HPLC per valorar quantitativament la cafeïna que contenen.

Pel que fa a la integració dels diversos àmbits, el treball observa el guaranà des del punt de vista de la Farmacognòsia, n'explica les característiques botàniques i farmacològiques i recorre als mètodes de química analítica per al seu estudi.

2. Objectius

L'objectiu general d'aquest treball és fer una proposta de monografia per al control de qualitat de la llavor de guaranà per a la Farmacopea Europea.

Els objectius específics són:

- Proposar mètodes d'identificació macroscòpica i microscòpica a partir de la informació bibliogràfica.
- Desenvolupar i proposar un mètode d'identificació per cromatografia en capa fina.
- Proposar un mètode de valoració de la cafeïna.
- Proposar, a partir de dades bibliogràfiques i/o experimentals, límits d'acceptació per a la, pèrdua per dessecació, cendres totals, matèries estranyes i contingut de cafeïna.

3. Material i mètodes

1. Metodologia de la part bibliogràfica

La cerca d'informació per dur a terme aquest treball ha consistit, quasi exclusivament, en la consulta de llibres, revisions i articles, que aportessin informació sobre el guaranà o sobre els mètodes analítics utilitzats.

La localització de les fonts s'ha fet mitjançant servidors electrònics com l'*SciVerse Scimedirect*, cercadors bibliogràfics com el *Google Academic* i bases de dades com el *PubMed*. Per a la cerca s'ha recorregut a paraules clau com guaranà, *Paullinia cupana*, farmacologia, composició química o assaigs clínics, i en alguns casos s'ha acotat amb límits com els anys de publicació o el tipus d'article.

Finalment, també s'han consultat les monografies existents sobre el guaranà en la Farmacopea Brasileira i en la Francesa.

2. Metodologia de la part experimental

2.1. Matèria vegetal

Les llavors de guaranà utilitzades han estat cedides pel laboratori Arkopharma (Espanya), per la professora Amélia T. Henriques de la Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul (UFRGS) (Porto Alegre, Brasil) i pel Dr. K. Helliwell de l'empresa Ransom Naturals (Hitchin, Regne Unit) (**Taula 1**).

| Referència interna | Proveïdor | Lot del proveïdor | Referència interna | Proveïdor | Lot del proveïdor |
|--------------------|---------------------|-------------------|--------------------|---------------------|-------------------|
| M-11099 | Arkopharm | 1070017212 | M-11121 | U.F.R.G.S. (Brasil) | Guaraná 1 |
| M-11100 | Arkopharm | 1100011959 | M-11122 | U.F.R.G.S. (Brasil) | Guaraná 2 |
| M-11101 | Arkopharm | 1100018092 | M-11186 | Ransom | 38419 |
| M-11102 | Arkopharm | 1090010733 | M-11187 | Ransom | 39769 |
| M-11119 | U.F.R.G.S. (Brasil) | P0A | M-11188 | Ransom | 39846 |
| M-11120 | U.F.R.G.S. (Brasil) | Guaraná Orgánico | M-11189 | Ransom | 42924 |
| | | | M-11190 | Ransom | 46156 |

Taula 1. Identificació de les mostres.

2.2. Substàncies de referència

Cafeïna (C0750), teofil·lina (T7770) i teobromina (T4500) de *Sigma-Aldrich*.
(+)-catequina (0976 S) d'*Extrasynthèse*.

Cafeïna CRS lot 4 d'*EDQM*. El certificat de puresa s'adjunta a l'annex 1.

2.3. Reactius

Acetat d'etil PAI, acetona PA-ACS-ISO, àcid acètic glacial HPLC, àcid fòrmic PA-ACS, àcid sulfúric PA-ISO, etanol 96% v/v PAI, metanol PAI, toluè (PAR) PAI de Panreac.

2.4. Reactius de derivatització

Vanil·lina *Ph Eur* de Fluka.

2.5. Instrumental

Per fer les cromatografies s'ha utilitzat el software WinCATS. La sembra de patrons i mostres s'ha fet amb Semi-Automatic TLC Sampler Linomat 5 (CAMAG). Per la cromatografia en capa fina d'alta resolució (HPTLC), les plaques utilitzades han estat les plaques de vidre 20x10 cm recobertes amb silica gel 60 F₂₅₄ (Merck) i s'han desenvolupat en una Automatic Development Chamber ADC 2 (CAMAG) i la cambra s'ha saturat amb paper de filtre (CAMAG). Per la cromatografia en capa fina (TLC), les plaques utilitzades han estat d'alumini 20x20 cm recobertes de silica gel 60 F₂₅₄ (Merck) i s'han desenvolupat en una Twin Trough Chamber 20x20 cm (CAMAG). Les plaques s'han revelat en un Chromatogram Immersion Device III (CAMAG) i s'han escalfat al TLC Plate Heter III (CAMAG). Les imatges dels cromatogrames s'han registrat amb un Reprostar 3 (CAMAG).

El sistema utilitzat per fer la cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC) és un UFLC Shimadzu de la sèrie 20 que consisteix en desgasificador DGU-20As, bombes LC-20AD, injector automàtic SIL-20AC HT, detector PDA SPD-M20A, forn per la columna CTO-20A, controlador de mòduls CBM-20A i software LC Solutions (Shimadzu Corporation) versió 1.23 SP1.

3. Disseny experimental del treball

El disseny del treball s'ha basat en els apartats que ha de tenir una monografia de la Farmacopea Europea. Així doncs, d'acord amb el que requereix una monografia, el que s'ha fet ha estat estudiar la llavor de guaranà per poder-ne fer la identificació, macroscòpica, microscòpica i per cromatografia en capa fina d'alta resolució, per poder-ne conèixer la puresa, a través dels assaigs de pèrdua per dessecació i cendres totals i per valorar-ne el contingut de cafeïna.

4. Desenvolupament del treball

4.1. Descripció botànica del guaranà

El guaranà o paul·línia, el nom botànic del qual és *Paullinia cupana* Kunth H.B.K. var. *sorbilis* (Mart.) Ducke., és una planta nativa de la zona de l'Amazones de la família de les *Sapindaceae*.

La planta del guaranà és un arbust enfiladís, llenyós i semierecte que pot arribar a fer entre 10 i 12 metres d'altura.

Les seves fulles són alternes, compostes, peciolades i imparipinnades, amb 5 foliols lanceolats i dentats (**Figura 1**).

Les inflorescències s'agrupen en raïm. Les seves flors tenen un periant ben desenvolupat amb calze i corol·la. El calze consta de cinc sèpals hirsuts i la corol·la de quatre pètals blanquinosos amb apèndixs basals.

Les flors són unisexuales monoiques. Les masculines tenen 8 estams obdiplostemon, és a dir, disposats en dos anells. Els de l'anell exterior se situen davant dels pètals i els de l'anell interior s'alternen amb aquests. Les femenines tenen el gineceu tricarpel·lar amb un ovari súper per carpel.

El fruit és una càpsula esfèrica amb el pericarp de color vermell i brillant. La càpsula és dehiscent i conté entre una i tres valves amb una sola llavor a l'interior de cada valva (**Figura 2**). Les llavors són ovalades, de petites dimensions i estan envoltades per un aril de color blanc o vermell. Queden a la vista quan el fruit madur s'obre parcialment.^{1,2,3}



Figura 1. *Paullinia cupana*
Font (4).



Figura 2. Fruit del guaranà amb la llavor al seu interior.

4.2. Composició química del guaranà

Els components principals de les llavors del guaranà són les metilxantines i els polifenols.

4.2.1 Metilxantines

Les metilxantines o bases xàntiques són alcaloides derivats de la purina en què l'anell pirimidínic es troba condensat amb un anell imidazòlic. Les metilxantines reben aquest nom a causa dels radicals dels grups nitrogen dels dos anells. La base xàntica més abundant a la natura és la cafeïna (1, 3, 7-trimetilxantina), seguida de la teobromina (3, 7-dimetilxantina) i la teofil·lina (1, 3-dimetilxantina) (**Figura 3**).

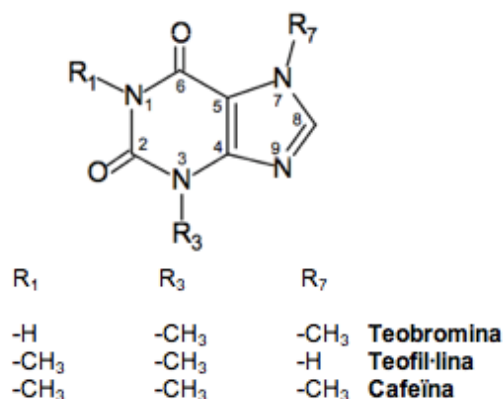


Figura 3. Metilxantines

Font (8).

La llavor del guaranà és, principalment, rica en cafeïna (3,5-5%).¹ Les altres bases xàntiques, la teofil·lina i la teobromina, s'hi troben de manera de manera minoritària, en un 0,2-0,3% i 0,03% respectivament.^{1,5}

La composició de la llavor fresca i dessecada és molt similar tant en les seves parts exteriors com en les interiors.⁶ Malgrat això, la distribució de les metilxantines no hi és uniforme. La cafeïna, en ser la majoritària, es troba repartida per tots els teixits, de manera més abundant als cotiledons i menys abundant al tegument. En canvi, la teofil·lina i la teobromina s'hi troben en menys quantitat excepte en dos teixits: el pericarp, on abunda la teobromina, i els septes, on la teofil·lina és l'alcaloide majoritari.⁷

4.2.2. Polifenols

Els altres compostos majoritaris són els polifenols, entre els quals destaquen la catequina, l'epicatequina (**Figura 4**) i els oligòmers proantocianidínic (tanins condensats), que poden constituir al voltant del 10% de la droga. Entre els oligòmers proantocianidínic, cal esmentar epicatequeïna-(4β→8)-epicatequina o proantocianidina B2, catequeïna-(4α→8)-catequina o proantocianidina B3 i

catequeïna-(4 α →8)-epicatequina o proantocianidina B4 (**Figura 5**).⁸ De manera minoritària també s'hi troba epicatequina gal·lat.⁹

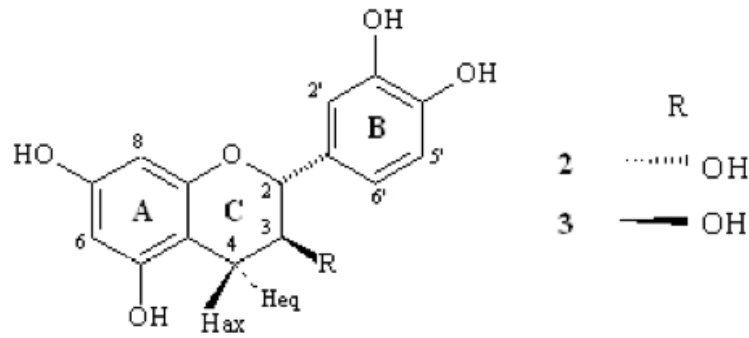


Figura 4. Epicatequina(2). Catequina (3)
Font (8).

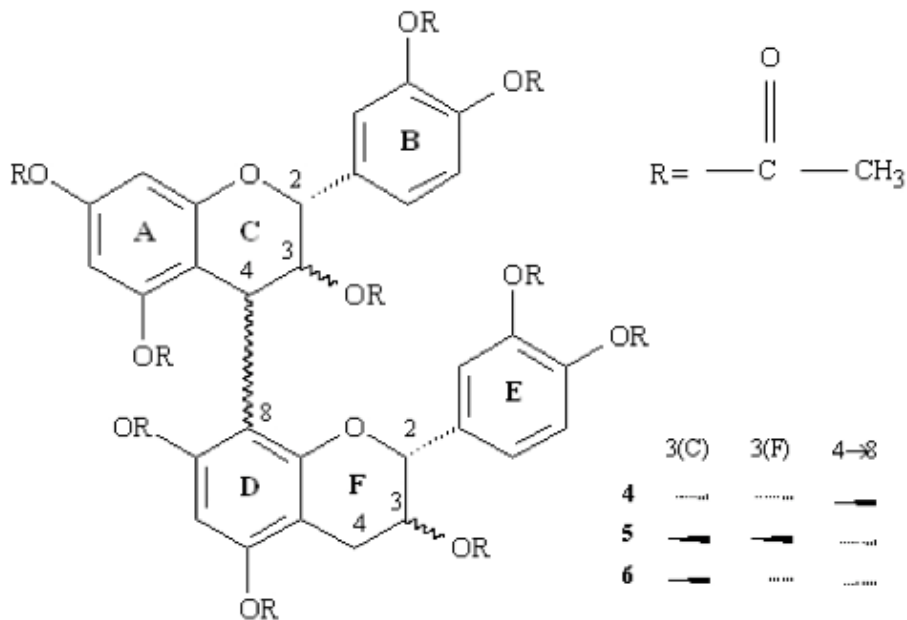


Figura 5. Proantocianidina B₂ (4). Proantocianidina B₃ (5). Proantocianidina B₆ (6)
Font (8).

4.2.3. Altres

De manera minoritària, la llavor també conté altres compostos com les saponines, minerals (fòsfor, potassi, ferro i calci), vitamines (tiamina, vitamina A), proteïnes i sucres.^{3, 5, 10}

4.3. Farmacologia i usos del guaranà

Les propietats farmacològiques del guaranà es deuen, quasi exclusivament, a la presència de la cafeïna. Tot i així, alguns autors creuen que els tanins, a través de determinats mecanismes d'acció, també hi incideixen.^{11,12,13}

4.3.1. Accions i mecanismes de la cafeïna

La cafeïna és un alcaloide, que a través de diferents mecanismes d'acció, du a terme un gran nombre d'accions. Tot i ser responsable de moltes accions, les que estan directament relacionades amb el consum de guaranà són la psicoestimulant i la termogènica.

a) *Antagonisme no selectiu dels receptors adenosínics*

Les metilxantines són substàncies psicoestimulants. Estimulen el sistema nerviós central a través de mecanismes relacionats amb els receptors adenosínics i els dopaminèrgics de manera dosidependent. Està ben estudiat que les metilxantines són antagonistes no selectives dels receptors d'adenosina A_1 i A_{2A} i agonistes indirectes dels receptors de dopamina.^{14,15} L'adenosina és una purina endògena formada per la unió d'un nucleòsid amb un anell de ribosa. No es considera un neurotransmissor clàssic ja que no s'emmagatzema en vesícules sinàptiques i la seva alliberació no és dependent del calci. És un inhibidor del sistema nerviós i de la neurotransmissió en general, que produeix sedació, relaxació i ansiòlisi.¹⁶ Fins a dia d'avui, se n'han clonat 4 receptors, l' A_1 , l' A_{2A} i l' A_{2B} i l' A_3 , amb un elevat grau d'homologia entre ells, i cadascun amb una localització cerebral específica. Són receptors acoblats a proteïna G amb set dominis transmembrana.¹⁷ Els receptors A_1 i A_{2A} són els més abundants i pels quals l'adenosina té més afinitat.¹⁴ El primer es localitza a diverses zones del cervell com l'hipocamp, el còrtex cerebral, els nuclis tal·làmic, els nuclis estriats i el globus pàl·lid. El segon es localitza quasi exclusivament als nuclis estriats, tant al ventral com al dorsal.¹⁶

La potència de l'acció de les diferents metilxantines depèn de la seva afinitat pels receptors adenosínics: la cafeïna té l'acció més potent, seguida per la teofil·lina i, finalment, la teobromina.¹⁶ La cafeïna s'uneix de manera competitiva als receptors A_1 i A_{2A} , bloqueja la unió de l'adenosina amb ells i anul·la la inhibició d'aquesta sobre la neurotransmissió, augmentant així els nivells de diversos neurotransmissors, entre ells la dopamina.¹⁷ Els efectes conductuals de la cafeïna, per tant, estan relacionats amb una eliminació dels efectes moduladors negatius de l'adenosina sobre els receptors de dopamina, eliminació que estimula l'activitat dopaminèrgica.¹⁵ La localització d'aquests dos receptors en el nucli estriat és el que es relaciona amb els efectes motors de la cafeïna.¹⁴ A dosis baixes, les bases xàntiques s'uneixen als receptors adenosínics del còrtex cerebral augmentant l'activació cortical i la velocitat de transmissió dels estímuls i accelerant els processos centrals i/o perifèrics. D'aquesta manera provoquen positivament canvis en l'humor i en la capacitat

intel·lectual de l'individu i en milloren el rendiment mental i físic amb un augment de l'energia, la confiança, la imaginació i la capacitat de concentració.^{16,17} Així doncs, l'extracte de guaranà, a causa del seu elevat contingut en cafeïna, té la capacitat d'estimular les funcions cerebrals, disminuint la fatiga i estimulants la memòria.^{11,18}

D'altra banda, la cafeïna també interfereix en la regulació del son a través d'algun mecanisme modulador del cicle son-vigília. L'adenosina juga un paper important com a promotor del son endogen i, per això, la cafeïna, com a antagonista, potencia un estat d'excitació, desvetllament i insomni. Tot i així, la capacitat de la cafeïna de produir insomni depèn, en gran mesura, de la sensibilitat de l'individu.¹⁷

A dosis altes, els efectes positius induïts per la cafeïna queden desmarcats per l'aparició d'ansietat psíquica i física (amb simptomatologia com tremolors i palpitations), de disfòria i de nerviosisme. Es creu que l'aparició de simptomatologia subjectiva relacionada amb l'ansietat es deu a l'estimulació indirecta de la via dopaminèrgica.^{16,19}

b) *Inhibició de l'AMP fosfodiesterasa*

La cafeïna inhibeix l'enzim encarregat de degradar l'AMPc, l'AMP fosfodiesterasa. D'aquesta manera, s'acumula AMPc a nivell intracel·lular, cosa que inhibeix l'acció de la Proteïna Quinasa A (PKA) i comporta un augment de la transmissió sinàptica mediada per catecolamines, sobretot per la noradrenalina.¹⁹ Aquesta activació simpàtica de la noradrenalina comporta una activació de la lipasa sensible encarregada de promoure la lipòlisi i estimula la termogènesi. A part de l'acció termogènica, la cafeïna actua a nivell cerebral reduint la gana, provocant una disminució de la ingesta calòrica diària²⁰ i estimulants l'oxidació de greixos, cosa que augmenta el nombre d'àcids grassos lliures en sang, que seran eliminats.¹³

c) *Augment del calci intracel·lular*

Les metilxantines potencien l'alliberament de calci de dins el reticle endoplasmàtic de les cèl·lules musculars cardíques i esquelètiques. Per tant, tenen una acció ionotrópica positiva sobre el múscul cardíac, espasmolítica sobre la fibra llisa i tònica sobre el múscul estriat.¹⁹

4.3.2. Accions i mecanismes de les catequines

La catequina i l'epicatequina, el seu diastereòmer, tenen accions sobre el metabolisme, amb mecanismes que augmenten el catabolisme lipídic, i acció antioxidant i antimicrobiana.

a) *Inhibició del catecol O-metiltransferasa (COMT)*

La catequina i l'epicatequina tenen la capacitat d'inhibir l'enzim catecol O-metiltransferasa (COMT). La funció del COMT és degradar les catecolamines, com la noradrenalina, perquè es puguin excretar per l'orina. En ser inhibida, la noradrenalina no es degrada i provoca una estimulació constant del sistema nerviós

simpàtic. Això es tradueix en un increment de la despesa energètica i, també, de l'oxidació de greixos. S'activa la β -oxidació a causa d'un augment en l'expressió gènica de dos enzims β -oxidatius, l'Acetil-CoA oxidasa (ACO) i l'Acyl-CoA deshidrogenasa.^{13,21,22,23} D'altra banda, a part d'augmentar el catabolisme lipídic, les catequines disminueixen l'absorció de lípids.²⁴

b) *Antioxidant*

L'activitat antioxidant de la catequina i l'epicatequina està relacionada amb la presència de radicals hidroxils al seu anell benzènic B. Aquests radicals fan que les molècules de catequina i epicatequina tinguin la capacitat d'eliminar espècies reactives d'oxigen (ROS) i de quelar metalls. A més, aquesta acció antioxidant es veu potenciada perquè aquestes dues molècules també actuen sobre algunes dianes cel·lulars i moleculars relacionades amb la transducció de senyals associats amb la mort i la supervivència cel·lular.²⁵ Els extractes de guaranà, fins i tot a baixes concentracions, han demostrat tenir un elevat poder antioxidant *in vitro*, inhibint la peroxidació espontània d'homogenats de cervell de rata. Aquest poder antioxidant guarda una relació proporcional amb la concentració de tanins a l'extracte.^{9,18}

c) *Antimicrobià*

La hipòtesi establerta per l'activitat antimicrobiana de les catequines és que els grups hidroxils de l'anell benzènic B es transformen en grups carbonils. Aquests grups carbonils tenen la capacitat de travessar els fosfolípids de la membrana cel·lular, provocant-hi danys que van seguits d'altres danys en les funcions fisiològiques dels bacteris.²⁶ Les catequines del guaranà són efectives tant davant de bacteris gram-positius com de gram-negatius.²⁶ S'ha comprovat que en *E. coli* l'acció antibacteriana és dosiddependent.⁹

4.3.3. Usos del guaranà

El guaranà ha estat tradicionalment utilitzat per nombroses accions sense que n'hi hagués una base científica. Aquest ús tradicional es deriva de la llegenda que n'explicaven els indis sateré-maué, que el relacionaven amb una planta que dona vida i que cura els humans. Així doncs, de manera tradicional s'ha utilitzat com a adaptogen, afrodisíac, antiateroscleròtic, antidiarreic, antineuràlgic, diürètic i tònic.^{1,18,27} D'altra banda, altres usos seus sí que han estat estudiats i tenen una base científica. Entre aquests trobem l'acció psicoestimulant comprovada a través de diversos assaigs clínics que han permès afirmar que el guaranà millora les funcions cognitives com la memòria secundària i genera un estat d'alerta i satisfacció.^{12,28} Finalment, l'ús per a la pèrdua de pes l'avalen alguns assaigs fets amb cafeïna.^{21,29} L'únic assaig clínic en sobrepès fet amb guaranà és un assaig en què se'l barreja amb efedra, planta que conté efedrina. Els resultats obtinguts sobre la pèrdua de pes són positius per a la barreja però es desconeix com actuaria el guaranà sol.²⁰

4.4. Identificació macroscòpica i microscòpica del guaranà

La droga vegetal està constituïda per les llavors del fruit de *Paullinia cupana* var. *sorbilis*.^{30,31,32} A la Farmacopea Brasileira es considera que la droga és la llavor desproveïda del tegument³⁰ i, en canvi, a la Farmacopea Francesa es considera que la droga és la llavor sencera i dessecada.³²

4.4.1. Descripció macroscòpica de les llavors³⁰

Les llavors mesuren aproximadament 12 mm de diàmetre i la seva forma és més o menys esfèrica segons el nombre de llavors que conté el fruit. La seva forma és esfèrica o subesfèrica quan és l'única llavor del fruit i és convexa en ambdós costats en el cas que n'hi hagi hagut entre 2 o 3. Estan cobertes per un tegument que els dóna un aspecte glabre i d'un color negre brillant i, on hi havia l'aril, hi queda una gran taca de color blanc (**Figura 6**).

Per elaborar la pasta de guaranà la llavor s'ha de desproveir del tegument, moment en què queden a la vista l'embrió poc desenvolupat i dos grans cotilèdons carnosos, desiguals, de color castany fosc.

4.4.2. Descripció microscòpica de les llavors^{30,31}

a) *Tegument*

Vista superficial

S'hi aprecien cèl·lules epidèrmiques amb les parets ondulades i engruixides de color groc, mentre que el lumen es veu de color negre.

Secció transversal

Les cèl·lules epidèrmiques formen una sola capa de cèl·lules allargades d'entre 80-120 µm disposades en palissada. Les cèl·lules del parènquima són tangencialment allargades i es troben disposades en llacuna (**Figura 7**). Entre elles s'hi diferencien cèl·lules pètries o esclèrides, que són polièdriques amb la paret cel·lular ampla i amb feixos vasculars incrustats al teixit (**Figura 8**). A la capa més interna del tegument les cèl·lules s'espesseixen i no tenen nucli. Les capes de cèl·lules de l'hílum estan quasi exclusivament formades per esclèrides isodiamètriques.

b) *Embrió*

Vista superficial

S'hi aprecien cèl·lules epidèrmiques uniseriades, allargades amb les parets primes.

Secció transversal

Es veu la capa de cèl·lules epidèrmiques cotiledonars.

Dessota es diferencien les cèl·lules del parènquima cotiledonar. Tenen forma poligonal o arrodonida amb un diàmetre entre 40 i 80 µm. Les que queden més properes a les cèl·lules epidèrmiques tenen les parets de color groc marronós, i les que se n'allunyen tenen les parets incolores (**Figura 9**). Al parènquima trobem un elevat nombre de grans de midó, tant simples com compostos. Poden ser esfèrics o ovoides amb un diàmetre d'entre 10 i 25 µm. El seu fil central pot ser puntiforme o irradial (**Figura 10**).

4.4.3. Descripció microscòpica de la pols^{30,31,32}

A la pols, de color marró vermellós i, a vegades, amb alguna tonalitat groguenca hi ha d'haver:

- fragments de cèl·lules epidèrmiques del tegument, en vista superficial i secció transversal.
- fragments de cèl·lules del parènquima del tegument, en vista superficial.
- fragments del parènquima embrionari, en part amb les parets cel·lulars de color groc.
- cèl·lules pètries o esclèrides soles o formant agrupacions.
- grànuls de midó sols o aglutinats.



Figura 6. Vista macroscòpica de les llavors de guaraná de 3 de les mostres estudiades.

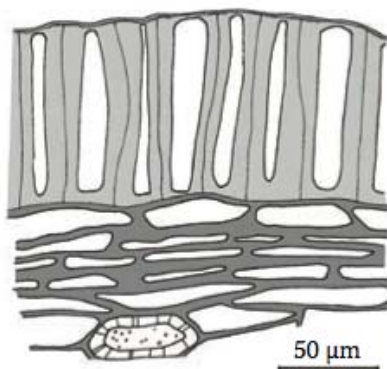


Figura 7. Vista transversal de les cèl·lules epidèrmiques i parenquimàtiques del tegument de la llavor del guaraná.

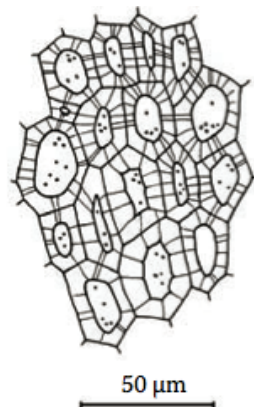


Figura 8. Cèl·lules pètries del tegument de la llavor del guaraná. Font (30).

Font (30).

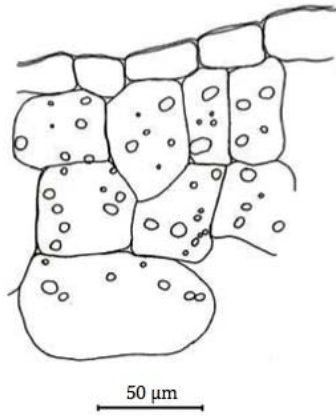


Figura 9. Vista transversal de les cèl·lules epidèrmiques i parenquimàtiques de l'embrió de la llavor del guaraná.
Font (30).

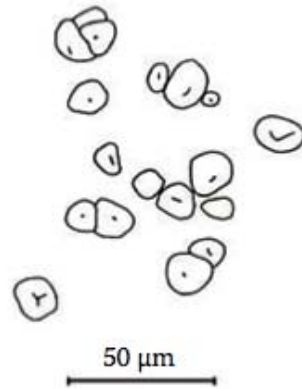


Figura 10. Grans de midó presents a l'embrió de la llavor del guaraná.
Font (30).

4.5. Assaigs de puresa

4.5.1. Pèrdua per dessecació

El mètode utilitzat per fer la pèrdua per dessecació ha estat el descrit a la monografia *Loss on drying* (01/2008:20232) de la Farmacopea Europea 7.5. Les condicions de l'assaig han estat les següents: 1 gram de mostra escalfada durant 1 hora a 100-105°C.

4.5.2. Cendres totals

El mètode utilitzat per fer les cendres totals ha estat el descrit a la monografia *Total ash* (01/2008:20416) de la Farmacopea Europea 7.5. Les condicions de l'assaig han estat les següents: 1 gram de mostra escalfada durant 1 hora a 600°C.

Les dades obtingudes de cada mostra pels dos assajos es mostren a la **Taula 2**:

| Referència interna | Pèrdua per dessecació (%) | Cendres totals (%) |
|--------------------|---------------------------|--------------------|
| M-11099 | 6.8 | 6.7 |
| M-11100 | 6.9 | 6.3 |
| M-11101 | 6.6 | 6.2 |
| M-11102 | 6.6 | 6.3 |
| M-11119 | 8.9 | 5.1 |
| M-11120 | 7.9 | 3.7 |

| Referència Interna | Pèrdua per dessecació | Cendres totals |
|--------------------|-----------------------|----------------|
| M-11121 | 8.1 | 4.1 |
| M-11122 | 8.9 | 3.7 |
| M-11186 | 7.1 | 4.3 |
| M-11187 | 7.1 | 4.9 |
| M-11188 | 8.5 | 6.6 |
| M-11189 | 7.6 | 4.2 |
| M-11190 | 8.4 | 4.8 |

Taula 2. Resultats dels assaigs de puresa, pèrdua per dessecació i cendres totals, realitzats per cada mostra.

4.6. Identificació de la droga per cromatografia en capa fina

4.6.2. Introducció a la cromatografia en capa fina : TLC i HPTLC^{33,34}

La identificació dels components de la llavor del guaranà s'ha fet amb mètodes cromatogràfics, concretament amb la cromatografia en capa fina (TLC) i amb la cromatografia en capa fina d'alta resolució (HPLTC).

Tant la TLC com l'HPTLC són cromatografies planars en què la fase estacionària està dipositada sobre una superfície plana. La fase estacionària consisteix en una fase sòlida adsorbent, formada per una capa de partícules d'uns mil·límetres de gruix fixades sobre un suport sòlid d'alumini, vidre o plàstic, on es col·loquen els substrats en dissolució, i la fase estacionària consisteix en una fase líquida. Els soluts es col·loquen 1 cm o 1.5 cm per sobre d'un dels extrems de la placa i a continuació s'elueix la fase mòbil per capil·laritat fent que els diferents soluts se separin al llarg de la fase estacionària en forma de taques.

Per a les anàlisis qualitatives, les taques de solut es caracteritzen per la distància que han recorregut amb relació a la distància recorreguda per la fase mòbil. El paràmetre que caracteritza aquesta relació s'anomena factor o índex de retenció (R_f) i s'expressa:

$$R_f = \frac{\text{distàncies del punt d'aplicació—fins a la taca}}{\text{distàncies del punt d'aplicació—fins al front del dissolvent}}$$

Els valors d' R_f estan compresos entre el 0 i l'1 i són característics per cada substància en unes mateixes condicions experimentals (composició de la fase mòbil, tipus de fase estacionària i temperatura).

4.6.2. Mètode HPTLC per a les llavors de guaranà

Per desenvolupar el mètode d'HPTLC adient per a la identificació de les llavors de guaranà, s'han estudiat diferents paràmetres. Per cada paràmetre s'han treballat diferents opcions per tal d'escollir la millor en cada cas. Tal com s'explica amb detall a l'annex 2, els diferents paràmetres que s'han treballat i l'opció escollida per cadascun són:

- *Preparació dels extractes de les mostres:* S'han estudiat quatre mètodes d'extracció i el seleccionat ha estat l'extracte metanòlic elaborat amb ajut d'ultrasons.
- *Substàncies de referència:* S'han estudiat quatre patrons i els dos escollits han estat la cafeïna i la catequina.
- *Fase mòbil:* S'han estudiat quatre fases mòbils i l'escollida ha estat una solució de toluè:acetona:àcid fòrmic (9:9:2).

- *Sistema de derivatització (revelador):* S'han estudiat quatre mètodes de derivatització i l'escollit ha estat la vanil·lina sulfúrica per immersió.
- *Volum de mostra:* S'han estudiat tres volums d'aplicació i l'escollit és el de 3.0 µL.
- *Temps de saturació:* S'ha estudiat saturar o no la cambra i, finalment, s'ha escollit no saturar-la.

a) *Preparació dels extractes de les mostres*

Les llavors de guaranà es molen per obtenir-ne la pols. A 1 g de pols s'afegeixen 10 mL de metanol. S'homogeneïtza. La solució es sotmet a sonicació durant 10 minuts. Es centrifuga (4000 rpm durant 10') i se n'agafa el sobrenedant. La concentració final dels extractes de les mostres és de 0.1 g/mL metanol.

b) *Preparació de les substàncies de referència*

La solució de cafeïna es prepara amb 12.5 mg dissolts en 10 mL d'etanol 60% (V/V) i la de catequina amb 0.5 mg en 1 mL de metanol. S'homogeneïtzen. La seva concentració final és de 0.625 mg/mL la cafeïna i 0.25 mg/mL la catequina.

c) *Condicions cromatogràfiques*

Les condicions cromatogràfiques del mètode desenvolupat són: plaques de vidre 20x10 cm recobertes amb silica gel 60 F₂₅₄ com a fase estacionària, una solució de toluè:acetona:àcid fòrmic (9:9:2 V/V/V) com a fase mòbil i una distància de migració de 6 cm. Per cada solució de les substàncies de referència i les mostres se sembren 4.0 µL. La placa es desenvolupa sense prèvia saturació en una cambra automàtica d'HPTLC.

d) *Detecció*

La detecció es fa, en primer lloc, a la placa un cop desenvolupada amb la fase mòbil i sota 254 nm UV. En segon lloc, la placa es revela per immersió en una solució de vanil·lina sulfúrica (preparar una solució de vanil·lina en etanol (10 g/L) i afegir-hi gota a gota 2 mL d'àcid sulfúric per cada 100 mL de la dissolució). Es deixa assecar i s'escalfa a 100°C durant 5 minuts. S'observa sota llum blanca.

e) *Resultats*

Per a la identificació qualitativa del guaranà s'observen dos cromatogrames: el de la placa desenvolupada observada sota 254 nm UV i el de la placa derivatitzada observada sota llum blanca. La combinació de les dues plaques permet obtenir un perfil cromatogràfic característic amb la identificació de cafeïna i catequina a les mostres de guaranà (**Figura 11**).

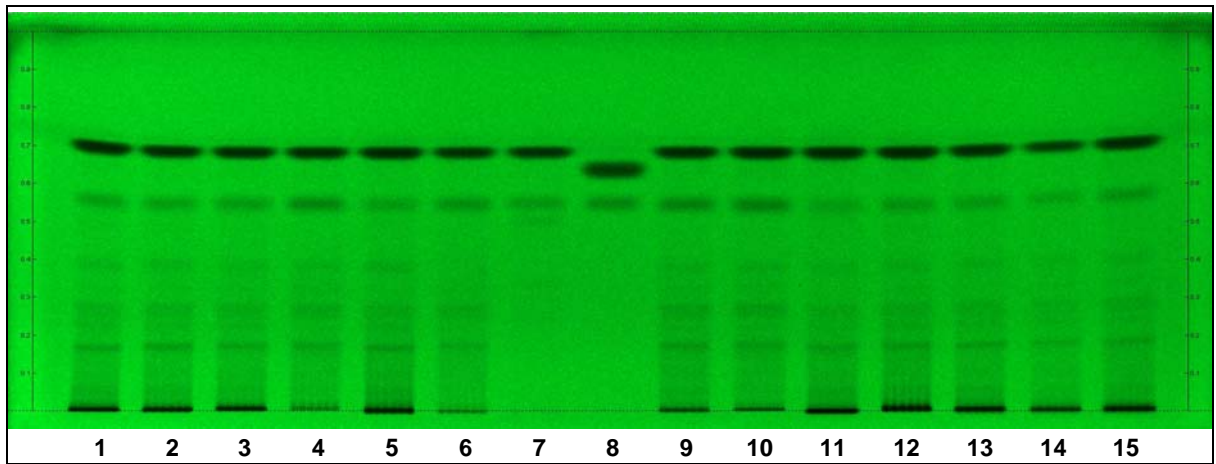


Figura 11a.

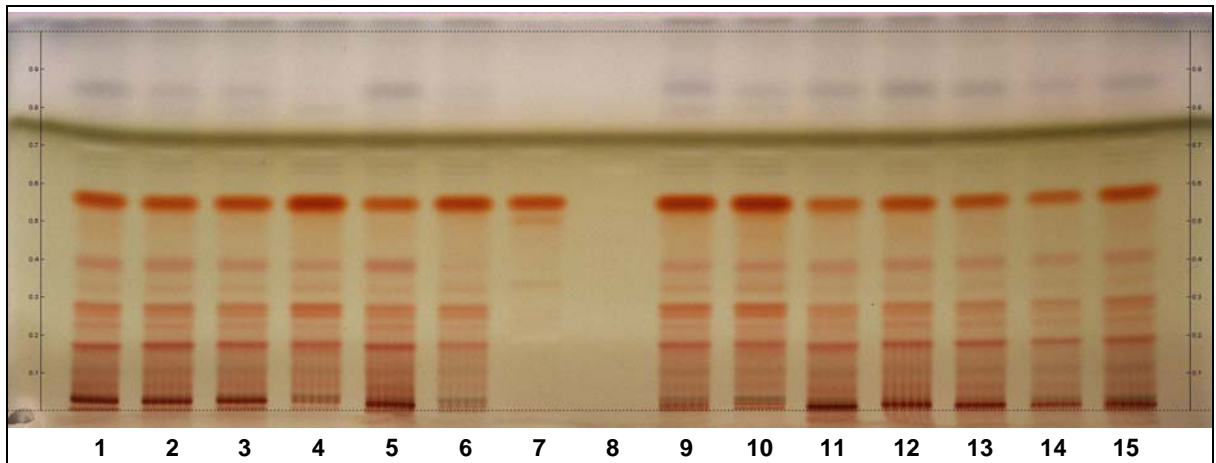


Figura 11b.

| <i>Posició</i> | <i>Mostra</i> | <i>Posició</i> | <i>Mostra</i> |
|----------------|--------------------------|----------------|---------------|
| 1 | M11099 | 9 | M11121 |
| 2 | M11100 | 10 | M11122 |
| 3 | M11101 | 11 | M11186 |
| 4 | M11102 | 12 | M11187 |
| 5 | M11119 | 13 | M11188 |
| 6 | M11120 | 14 | M11189 |
| 7 | Cafeïna i catequina | 15 | M11190 |
| 8 | Teofil·lina i teobromina | | |

Figura 11. Cromatogrames HPTLC desenvolupats amb toluè:acetona:àcid fòrmic (9:9:2) i amb un volum d'aplicació de 4 µL. La **Figura 11a** correspon a la placa desenvolupada i observada sota 254 nm UV. A la posició 7 s'hi aprecien la catequina i la cafeïna (de menys a més Rf). La **Figura 11b** correspon a la placa derivatitzada i observada sota llum blanca. A la posició 7 s'hi aprecia la catequina.

4.7. Valoració quantitativa de la cafeïna

4.7.1. Introducció a la cromatografia líquida d'alta resolució^{33,35}

La cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC) és un tipus de cromatografia en columna utilitzada per separar els components d'una mescla. El mecanisme de separació utilitzat en la nostra anàlisi ha sigut el d'adsorció, basat en la separació dels components segons la seva major o menor tendència a l'adsorció amb les partícules de la fase estacionària. La cromatografia d'adsorció pot ser de fase normal, quan la fase estacionària és polar i l'eluent és menys polar, o de fase inversa, quan la fase estacionària és apolar i la fase mòbil és més polar. En aquest tipus de separació, es dona un procés d'elució en què les molècules de la fase mòbil competeixen amb les de solut de la fase estacionària per ocupar els llocs actius de la fase estacionària. L'elució és isocràtica quan es fa amb un sol dissolvent o bé de gradient quan es necessita crear un gradient de concentració entre més d'un dissolvent.

Un cromatògraf de líquids consta d'una columna, a l'interior de la qual hi ha la fase estacionària, i pot tenir una precolumna a l'entrada, que la protegeix de la degradació. La injecció és el punt crític per tal d'obtenir una bona separació dels components de la mescla. La mostra i el dissolvent s'injecten dins la columna amb les bombes i vàlvules d'injecció, que n'han de permetre un flux constant. Els compostos són eluïts a través de la columna, cadascun amb un temps de retenció característic segons la seva capacitat d'adsorció en la fase estacionària. Quan els compostos surten de la columna són detectats per tal de ser reconeguts i mesurats. El detector mesura de manera constant una propietat de la fase mòbil que pateix canvis quan surt acompanyada d'un compost eluït. Aquest canvi en la propietat que es mesura es converteix en un senyal, proporcional a la concentració o al flux màssic, que es pot detectar per diversos mètodes, sent el més comú el fotomètric en què es mesura l'absorció de llum UV del compost eluït.

4.7.2. Mètode de valoració de la cafeïna a la llavor de guaranà per HPLC

Tal com s'explica amb detall a l'annex 3, per desenvolupar l'assaig HPLC adient per fer la valoració quantitativa del guaranà s'han estudiat dos mètodes de preparació de la mostra i dues fases mòbils diferents. En primer lloc, es van comparar dos mètodes de preparació de la mostra, partint de la hipòtesi que eren equivalents pel que feia a resultats: el proposat a la monografia de la nou de Cola de la Farmacopea Europea i, un altre, dissenyat per nosaltres, que requeria menys manipulació de la mostra. Els resultats van confirmar que els dos mètodes eren equivalents i el seleccionat va ser el proposat per nosaltres ja que la manipulació de la mostra era notablement menor. En segon lloc, es van comparar dues fases mòbils: una mescla de metanol i aigua (25:75 V/V) proposada a la monografia de la nou de Cola de la Farmacopea Europea i una mescla de metanol i aigua (35:65 V/V) proposada a la monografia de

la llavor de guaranà de la Farmacopea Francesa. L'elecció es va fer segons la separació dels pics d'epicatequina i cafeïna. A la fase de metanol i aigua (35:65 V/V) no van sortir prou separats i, per tant, es va escollir l'altra fase, la de metanol i aigua (25:75 V/V) que sí que en permetia una bona separació

a) *Preparació dels extractes de les mostres*

A 0.5 g de pols, pesats en un baló de 100 mL, s'hi afegeixen 40 mL de metanol. S'escalfa a reflux (70°C, 30 min). Es deixa refredar a T^a ambient. Es filtra a través de cotó a un matràs aforat de 100 mL. El cotó amb el residu de la droga es posa al baló i s'hi afegeixen 40 mL de metanol. Es repeteix el procediment d'extracció per reflux i el filtrat a través de cotó. Es dilueix fins a 100 mL, netejant el baló i el cotó. S'homogeneïtza. S'agafa una alíquota de 10 mL i es posa en un matràs de 50 mL. S'hi afegeixen 30 mL d'aigua. Es dilueix fins a 50 mL amb la fase mòbil. Se'n filtra una alíquota a través d'un filtre de 0.45 µm abans de fer la injecció.

b) *Preparació de les substàncies de referència*

La primera dissolució de referència és la de cafeïna CRS es prepara en un matràs aforat de 100.0 mL on es dissolen 30.0 mg amb 100 mL de fase mòbil. Per a la segona dissolució de referència s'agafen 5.0 mL de la solució de cafeïna CRS i es dilueixen amb fase mòbil en un matràs aforat de 50.0 mL. L'última dissolució de referència es prepara amb 15.0 mg d'epicatequina CRS dissolta amb fase mòbil en un matràs aforat de 25.0 mL. Es mesclen 10.0 mL d'aquesta solució amb 5.0 mL de la solució de cafeïna CRS inicial en un matràs aforat de 50.0 mL i es dissolen amb fase mòbil.

c) *Condicions cromatogràfiques*

Les condicions cromatogràfiques amb què es treballa són les següents: columna cromatogràfica SunFire™ C₁₈, 250 x 4.6 mm, 5 µm; fase mòbil de metanol i aigua (25:75 V/V), flux de la fase mòbil d'1 mL/min i volum d'injecció de 10 µL.

d) *Detecció*

La detecció es fa amb un detector fotomètric a 272 nm, la longitud d'ona on hi ha el màxim d'absorbància de la cafeïna.

e) *Resultats*

La valoració es fa pel mètode de patró extern. A través del patró de cafeïna es fa una relació senyal-concentració de la cafeïna present en la solució de mostra. L'anàlisi s'ha fet per duplicat per cada mostra. Les dades de concentració de cafeïna en tant per cent obtingudes per cadascuna d'elles són les següents es mostren a la **Taula 3:**

| Referència interna | Quantitat de cafeïna (%) | Referència interna | Quantitat de cafeïna (%) |
|--------------------|--------------------------|--------------------|--------------------------|
| M-11099 | 4.08 | M-11121 | 4.24 |
| M-11100 | 3.54 | M-11122 | 4.50 |
| M-11101 | 3.74 | M-11186 | 3.79 |
| M-11102 | 4.23 | M-11187 | 3.93 |
| M-11119 | 3.54 | M-11188 | 3.80 |
| M-11120 | 4.06 | M-11189 | 3.85 |
| | | M-11190 | 3.94 |

Taula 3. Resultats de l'anàlisi quantitativa de cafeïna respecte a droga dessecada, expressats en tant per cent. Les anàlisis s'han fet per duplicat.

4.8. Proposta de monografia per la Farmacopea Europea

XXXX:2669

GUARANA

Paulliniae sorbilis semen

DEFINITION

Seeds of *Paullinia cupana* Kunth H.B.K. var. *sorbilis* (Mart.) Ducke (= *P. sorbilis* C. Mart.), dried rapidly by heating.

Content: minimum 3.5 per cent of caffeine (Mr 194.2) (dried drug)

IDENTIFICATION

A. The seed is more or less spherical, about 12 mm in diameter, shiny, glabrous, dark brown with a big light coloured spot corresponding to the hilum.

B. Microscopic examination (2.8.23)

The powder is reddish-brown. Examine under a microscope using *lactic reagent R*. The powder shows the following diagnostic characters: numerous rounded simple or compound starch granules, episperm cells with lobed and regularly thickened walls in palisade arrangement in transverse section, endosperm cells with cellulose walls and filled with starch, more or less polyhedral sclereids with channelled walls.

C. Thin-layer chromatography (2.2.27)

Test solution. To 1 g of the powdered drug (355) (2.9.12) add 10 mL of *methanol R*, sonicate for 10 min and centrifugate for 10 min.

Reference solution (a). Dissolve 12.5 mg of *caffeine R* in 10 mL of *ethanol R* (96 per cent) (V/V).

Reference solution (b). Dissolve 0.5 mg of (+)-*catechin R* in 10 mL of *methanol R*.

Plate: HPTLC silica gel plate R (2-10 µm).

Mobile phase: *toluene R*, *acetone R*, *formic acid R* (9:9:2) (V/V).

Application: 4 µL as bands of 8 mm.

Development: over a path of 6 cm.

Drying: in a current of warm air.

Detection A: examine in ultraviolet light at 254 nm.

Results A: see below the sequence of zones present in the chromatograms obtained with the reference solution and test solution. Furthermore, other faint zones may be present in the chromatogram obtained with the test solution.

| Top of the plate | |
|-------------------------------------|--------------------------------------|
| Caffeine: an intense quenching zone | An intense quenching zone (caffeine) |
| Catequin: a quenching zone | A quenching zone (catechin) |
| Reference solution | Test solution |

Detection B: Treat for immersions with a 10 g/L solution of *sulfuric vanillin R* in *ethanol (96 per cent)* plus 2 mL of sulphuric acid for 100 mL of solution; then heat at 100°C for 5 min and examine in white light.

Results B: see below the sequence of zones present in the chromatograms obtained with the reference solution and test solution. Furthermore, other faint zones may be present in the chromatogram obtained with the test solution.

| Top of the plate | |
|--|---|
| Catequin: an intense red-brownish zone | An intense red-brownish zone (catequin) A red-pinkish zone |
| | One or two red-brownish zones A red-brownish zone |
| Reference solutionn | Test solution |

TESTS

Loss on drying (2.2.32): maximum 10.0 per cent, determined on 1.000 g of the powdered drug (355) (2.9.12) by drying in an oven at 105°C.

Total ash (2.4.16): maximum 7.0 per cent.

ASSAY

Liquid chromatography (2.2.29)

Test solution. In a 100.0 mL round-bottomed flask, introduce 0.500 g (m_1) of the powdered drug (355) (2.9.12) and add 40 mL of *methanol R*. Heat in a water-bath at 70°C under a reflux condenser for 30 min. Allow to cool and filter through a plug of absorbent cotton in a 100.0 mL volumetric flask. Transfer the absorbent cotton with the drug residue into the round-bottomed flask. Add 40 mL of *methanol R* and proceed as before and filter in the same volumetric flask. Dilute to 100.0 mL with *methanol R*, while rinsing the round-bottomed flask and the filter. Shake to homogenate the solution. Transfer 10.0 mL of this solution into a 50.0 mL volumetric flask, add 30 mL of *water R* and dilute to 50.0 mL with the mobile phase. Filter an aliquot through a 0.45 µm filter before injecting.

Reference solution (a): In a 100.0 mL volumetric flask, dissolve 30.0 mg of caffeine CRS in the mobile phase and dilute to 100.0 mL with the mobile phase.

Reference solution (b): Transfer 5.0 mL of the *reference solution (a)* into a 50.0 mL volumetric flask and dilute to 50.0 mL with the mobile phase.

Reference solution (c): In a 25.0 mL volumetric flask, dissolve 15.0 mg of epicatechin CRS in the mobile phase and dilute to 25.0 mL with the mobile phase. Transfer 10.0 mL of this solution and 5 mL of the *reference solution (a)* into a 50.0 mL volumetric flask and dilute to 50.0 mL with the mobile phase.

Column:

- size: $l = 0.25 \text{ m}$, $\varnothing = 4.6 \text{ mm}^1$;
- stationary phase: octadecylsilyl silica gel for chromatography R (5 μm).

Mobile phase: methanol R, water R (25:75 V/V).

Flow rate: 1 mL/min.

Detection: spectrophotometer at 272 nm.

Injection: 10 μL

System suitability: reference solution (c):

- resolution: minimum 2.5 between the peaks due to caffeine (retention time = about 11 min) and epicatechin.

Calculate the caffeine content using the following expression:

$$\frac{A_1 \times m_2 \times p}{A_2 \times m_1 \times 10}$$

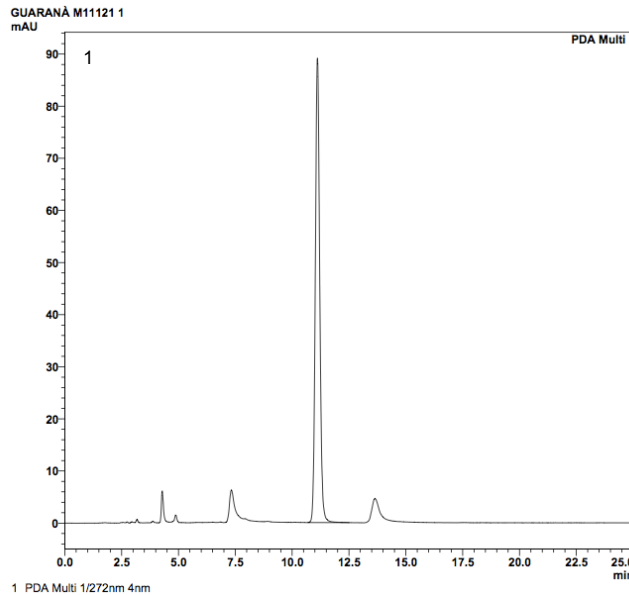
A_1 = area of the peak due to caffeine in the chromatogram obtained with the *test solution*;

A_2 = area of the peak due to caffeine in the chromatogram obtained with the *reference solution (b)*;

m_1 = mass of the drug to be examined in the test solution, in grams;

m_2 = mass of caffeine CRS in the *reference solution (a)*, in grams;

p = purity of the caffeine CRS in percentage



1. Caffeine

Figure 2669.1- Chromatogram of the test solution for the assay of guarana seed.

¹ The column SunFire™ is suitable

5. Discussió

La droga del guaraná és la seva llavor. A la Farmacopea Brasileira es considera que la llavor ha d'haver-se desproveït del tegument i, en canvi, a la Farmacopea Francesa es considera que ha d'estar sencera i dessecada. Un cop revisada la bibliografia per elaborar la monografia del guaraná, s'ha seguit el model europeu en què es considera que la droga del guaraná és la llavor sencera dessecada. Pel que fa a la descripció microscòpica de la llavor, també s'ha seguit la informació donada a la monografia de la Farmacopea Francesa.

Els assaigs de puresa s'han dut a terme seguint els procediments descrits a la Farmacopea Europea. Per la pèrdua per dessecació s'ha obtingut un valor màxim d'un 10 per cent, el mateix que s'estableix a la Farmacopea Francesa i similar al de la Brasileira, que fixa un 9.5 per cent. Per les cendres totals, els valor obtingut ha estat un màxim d'un 7.0 per cent. Aquest valor crida l'atenció comparat amb els que s'han establert tant a la Farmacopea Francesa, màxim d'un 4.0 per cent, com a la Brasileira, màxim d'un 3.0 per cent. El valor de la Farmacopea Brasileira s'explica pel fet que consideren que la droga és la llavor sense tegument i, per tant, perden massa. Però amb la Farmacopea Francesa no s'ha pogut establir una relació causal per a la diferència de valor.

A partir del mètode per cromatografia en capa fina d'alta resolució per a la identificació del guaraná, els resultats on es mostrns les taques més rellevants són els de les **Figures 12 i 13**:

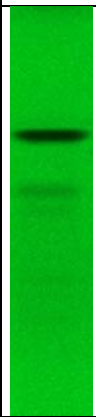



| Part superior de la placa | | | |
|---|--|---|---|
|  | Cafeïna: una zona d'inhibició de fluorescència | Una zona d'inhibició de fluorescència (cafeïna) |  |
| | Catequina: una zona d'inhibició de fluorescència | Una zona d'inhibició de fluorescència (catequina) | |
| | | Diverses zones poc intenses d'inhibició de fluorescència poden estar presents | |
| Dissolució de referència | | Dissolució problema | |

Figura 12. Resultats del cromatograma de la placa desenvolupada i observada sota 254 nm UV. A la dissolució de referència hi diferenciem dues zones d'inhibició de fluorescència: la primera, localitzada al segon terç de la placa, correspon a la catequina i, la segona, localitzada al tercer terç de la placa correspon a la cafeïna. A la dissolució problema hi apareixen les mateixes bandes que a la de referència, corresponents a la cafeïna i la catequina. Al primer terç, a més, hi apareixen diverses zones, poc intenses, d'inhibició de la fluorescència.

| Part superior de la placa | | | |
|---|---|---|---|
|  | | |  |
| | Catequina: una zona intensa de color vermell terrós | Una zona intensa de color vermell terrós (catequina) Una zona de color vermell rosat | |
| | | Una o dues zones de color vermell terrós Una zona de color vermell terrós | |
| Dissolució de referència | | Dissolució problema | |

Diverses zones addicionals, poc intenses, poden estar presents en el cromatograma de la dissolució problema.

Figura 13. Resultats del cromatograma de la placa derivatitzada amb vanil·lina sulfúrica i observada sota llum blanca. A la dissolució de referència hi diferenciem una banda intensa de color vermell terrós, localitzada al segon terç . A la dissolució problema hi apareix, també, la banda de la catequina i, a més, al primer i segon terç hi apareixen diverses zones de color vermell terrós, en alguns casos amb una tonalitat lleugerament rosa.

Finalment, amb el mètode per fer la valoració de la cafeïna de la llavor, s'ha proposat que el contingut mínim de cafeïna que aquesta ha de contenir és d'un 3.5 per cent. Aquest valor és igual al que s'estableix a la Farmacopea Francesa i molt similar al que s'estableix a la Farmacopea Brasileira, que és d'un 4.0 per cent.

6. Conclusions

El guaranà o paul·línia és un arbust natiu de l'Amazones brasiler. La seva droga és la llavor, important pel seu elevat contingut de cafeïna. La cafeïna, alcaloide del tipus metilxantina, n'és el component principal i la responsable de les activitats psicoestimulant i termogènica atribuïdes a la llavor de guaranà. La llavor també és rica en polifenols, principalment en catequina, epicatequina i en els seus oligòmers proantocianidínics, que tenen activitat estimulant del metabolisme, antioxidant i antimicrobiana. Així doncs, gran part de les propietats que s'han atribuït al guaranà de manera tradicional tenen fonament.

Els mètodes proposats per al control de qualitat de la llavor de guaranà són adequats, tant per a la seva identificació com per a la valoració. La identificació es basa en les característiques microscòpiques i macroscòpiques i en un assaig per cromatografia en capa fina. Per a la valoració es determina la concentració de cafeïna de la llavor amb un mètode de cromatografia líquida d'alta resolució. L'establiment d'aquests mètodes permet proposar a la Farmacopea Europea la monografia del guaranà i respondre, d'aquesta manera satisfactòriament, al seu encàrrec.

7. Bibliografia

- (1) Peris JB, Stübing G, Vanaclocha B. Fitoterapia aplicada. Valencia: MICO; 1995. p. 304-305.
- (2) Gupta MP, editor. Plantas medicinales iberoamericanas. Bogotá: CYTED-Convenio Andrés Bello; 2008. p. 824-826.
- (3) Miranda MV. Paullinia cupana: revisão da materia médica. Revista de Homeopatia. 2010; 73 (1/2): 1.
- (4) Köhler FE, Pabst G. Köhler's Medizinal-Pflanzen in naturgetreuen Abbildungen mit kurz erläuterndem Texte: Atlas zur Pharmacopoea germanica, austriaca, belgica, danica, helvetica, hungarica, rossica, suecica, Neerlandica, British pharmacopoeia, zum Codex medicamentarius, sowie zur Pharmacopoeia of the United States of America. Gera: Friedrich von Zezschwitz; 1887.
- (5) Kuskoski EM. Propiedades químicas y farmacológicas del fruto guaraná (Paullinia cupana). Vitae. 2005; (2): 45.
- (6) Edwards HGM, Farwell DW, Oliveira LFCd, Alia J, Hyaric ML, Ameida MVd. FT-Raman spectroscopic studies of guarana and some extracts. Anal Chim Acta. 2005; 3/14, 532 (2): 177-186.
- (7) Baumann TW, Schulthess BH, Hänni K. Guaraná (Paullinia cupana) rewards seed dispersers without intoxicating them by caffeine. Phytochemistry. 1995; 7, 39 (5): 1063-1070.
- (8) Antonelli Ushirobira TM, Yamaguti E, Uemura LM, Nakamura CV, Dias Filho BP, Palazzo de Mello JC. Chemical and microbiological study of extract from seed of guarana (Paullinia cupana var. sorbilis). Lat Am J Pharm. 2007; 26 (1): 5-9.
- (9) Majhenič L, Škerget M, Knez Ž. Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. Food Chem. 2007; 104 (3): 1258-1268.
- (10) Bruneton J. Farmacognosia: fitoquímica, plantas medicinales. 2ª ed. Saragossa: Acribia; 2001.
- (11) Espinola EB, Dias RF, Mattei R, Carlini EA. Pharmacological activity of Guarana (Paullinia cupana Mart.) in laboratory animals. J Ethnopharmacol. 1997; 2, 55 (3): 223-229.
- (12) Kennedy DO, Haskell CF, Wesnes KA, Scholey AB. Improved cognitive performance in human volunteers following administration of guarana (Paullinia cupana) extract: comparison and interaction with Panax ginseng. Pharmacology, Biochemistry and Behavior. 2004; 11, 79 (3): 401-411.
- (13) Westerterp Plantenga MS. Green tea catechins, caffeine and body-weight regulation. Physiology and Behaviour. 2010; 13 (7): 1195.
- (14) Ferré S. An update on the mechanisms of the psychostimulant effects of caffeine. J Neurochem. 2008; 105 (4): 1067-1079.
- (15) Garrett BE, Griffiths RR. The role of dopamine in the behavioral effects of caffeine in animals and humans. Pharmacology, Biochemistry and Behavior. 1997; 7, 57 (3): 533-541.
- (16) Moratalla R. Neurobiología de las metilxantinas. Trastornos Adictivos. 2008; 9, 10 (3): 201-207.

- (17) Fredholm BB. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacol Rev.* 1999; 51 (1): 83.
- (18) Mattei R, Dias RF, Espínola EB, Carlini EA, Barros SBM. Guarana (*Paullinia cupana*): toxic behavioral effects in laboratory animals and antioxidant activity in vitro. *J Ethnopharmacol.* 1998; 3, 60 (2): 111-116.
- (19) Fredholm BB. On the mechanism of action of theophylline and caffeine. *Acta Med Scand.* 1985; 217 (2): 149-153.
- (20) Boozer CN, Nasser JA, Heymsfield SB, Wang V, Chen G, Solomon JL. An herbal supplement containing Ma Huang-Guarana for weight-loss: a randomized, double-blind trial. *Int J Obes.* 2001; 25 (3): 316.
- (21) Acheson KJ. Metabolic effects of caffeine in humans: lipid oxidation or futile cycling? *Am J Clin Nutr.* 2004; 79 (1): 40.
- (22) Diepvens K. Obesity and thermogenesis related to the consumption of caffeine, ephedrine, capsaicin, and green tea. *American journal of physiology.* 2007; 292 (1): R77.
- (23) Dulloo AG. Green tea and thermogenesis: interactions between catechin-polyphenols, caffeine and sympathetic activity. *Int J Obes.* 2000; 24 (2): 252.
- (24) Unno K, Yamamoto H, Maeda K, Takabayashi F, Yoshida H, Kikunaga N, et al. Protection of brain and pancreas from high-fat diet: effects of catechin and caffeine. *Physiol Behav.* 2009; 2/16, 96 (2): 262-269.
- (25) Zaveri NT. Green tea and its polyphenolic catechins: medicinal uses in cancer and noncancer applications. *Life Sci.* 2006; 3/27, 78 (18): 2073-2080.
- (26) Chunmei D, Jiabo W, Weijun K, Cheng P, Xiaohe X. Investigation of antimicrobial activity of catechin on *Escherichia coli* growth by microcalorimetry. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2010; 11, 30 (3): 284-288.
- (27) Henman AR. Guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*): ecological and social perspectives on an economic plant of the central amazon basin. *J Ethnopharmacol.* 1982; 11, 6 (3): 311-338.
- (28) Haskell CF, Kennedy DO, Wesnes KA, Milne AL, Scholey AB. A double-blind, placebo-controlled, multi-dose evaluation of the acute behavioural effects of guarana in humans. *J Psychopharmacol.* 2007 Jan; 21 (1): 65-70.
- (29) Acheson KJ. Caffeine and coffee: their influence on metabolic rate and substrate utilization in normal weight and obese individuals. *Am J Clin Nutr.* 1980; 33 (5): 989.
- (30) Farmacopéia brasileira. 5th ed. São Paulo: Atheneu Editora São Paulo; 2010.
- (31) Upton R, Graff A, Jolliffe G, Länger R, Williamson E, editors. *American Herbal Pharmacopoeia: botanical pharmacognosy – microscopic characterization of botanical medicines.* Boca Raton: CRC Press; 2011.
- (32) AFSSAPS. Guarana, semences. In: *Pharmacopée Française, 10 ème édition.* Moulins-les-Metz: Maisonneuve; 2000.
- (33) Casas Sabata JM, Garcia Raurich J, Guadayol Cunill JM, Olivé Duran J. *Cromatografia i electroforesi.* Barcelona: Edicions UPC; 1994.
- (34) Rubinson KA, Rubinson JF. *Análisis instrumental.* Madrid: Prentice Hall; 2001.
- (35) Harris DC. *Análisis químico cuantitativo.* 3ª ed. Barcelona: Reverté; 2006.

Annex 1. Certificat de puresa de la cafeïna CRS



European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare
 European Pharmacopoeia (Ph. Eur.)
 7, Allée Kastner CS 30026, F-67081 Strasbourg (France)
 Tel. +33 (0)3 88 41 20 35 Fax. + 33 (0)3 88 41 27 71
 For any questions: www.edqm.eu (HelpDesk)

Ph. Eur. Reference Standard - LEAFLET

CAFFEINE CRS batch 4

Intended use

This leaflet supplements the currently valid European Pharmacopoeia monograph(s) and/or general chapter(s) describing the suitable use of this Reference Standard.

Further information about the Reference Standards is available in the on-line catalogue currently at <http://crs.edqm.eu> (such as, batch validity statement and material safety data sheet).

Instruction

For use with the monograph Cola (1504) the percentage content of caffeine CRS batch 4 is 99.9% $C_8H_{10}N_4O_2$.



Catalogue code: C0100000

Revision 01

Date of issue: 05/03/2010

1/1

Annex 2. Desenvolupament del mètode d'identificació del guaranà per cromatografia en capa fina

1. Preparació dels extractes de les mostres

Per escollir el dissolvent i el mètode d'extracció es va treballar amb quatre extractes diferents, combinant dos dissolvents, l'etanol 60% (V/V) i el metanol, i dos procediments extractius, els ultrasons i l'escalfament. Finalment, com que els 4 tipus d'extractes permetien obtenir bandes ben definides, el seleccionat va ser l'extracte metanòlic preparat amb l'ajut d'ultrasons, ja que és un procediment simple. El cromatograma en què es van provar els quatre extractes diferents per dues mostres (M11187 i M11122) es mostra a la **Figura 1**.

2. Substàncies de referència

Inicialment es van provar tres substàncies de referència: la cafeïna, la teofil·lina i la teobromina. Aquestes no permetien obtenir un perfil de bandes representatiu i, per això, més endavant se'n va introduir una quarta, la catequina. La combinació de cafeïna i catequina sí que permet obtenir un perfil de bandes característic, motiu pel qual han estat les dues substàncies de referència escollides (**Figures 2**).

Per preparar la solució de cafeïna es va seguir el procediment descrit a la monografia de la nou de cola de la Farmacopea Europea, en què se'n dissolen 25 mg en 10 mL d'etanol 60% (V/V). Finalment, es va diluir la solució a la meitat perquè s'obtenien taques massa concentrades. Per preparar la solució de catequina es va seguir un procediment utilitzat en altres treballs interns de la Unitat de Farmacognòsia.

3. Fase mòbil

S'han estudiat quatre fases mòbils. La primera fase mòbil va ser una solució d'aigua:etanol:àcid fòrmic (90:8:2) que es va descartar en obtenir les bandes de les substàncies de referència massa properes (**Figura 1**). La segona fase mòbil va ser una solució de toluè:acetona:àcid acètic glacial (30:30:20) que es va descartar en obtenir les bandes de cafeïna i catequina molt properes, o bé solapades en el cas de sembrar els dos patrons en la mateixa posició (**Figura 3**). La tercera fase mòbil va ser una solució d'acetat d'etil:metanol:aigua (100:13.5:10) que es va descartar en obtenir bandes poc definides, observant-se la creació de cues d'elució (**Figura 4**). Finalment, la fase mòbil escollida a causa de la nitidesa i bona separació de les seves bandes va ser una solució de toluè:acetona:àcid fòrmic (9:9:2) (**Figura 2a**).

4. Volum de mostra

Per escollir el volum de mostra més adequat es van sembrar en una placa els quatre patrons i tres mostres (la més diluïda, la més concentrada i una de concentració intermitja entre aquestes dues) amb tres volums d'aplicació diferents, 2.0, 3.0 i 4.0 µL. El volum seleccionat va ser el de 4.0 µL perquè permet obtenir bandes definides i nítides, tant pels patrons com per les tres mostres. (**Figura 5**).

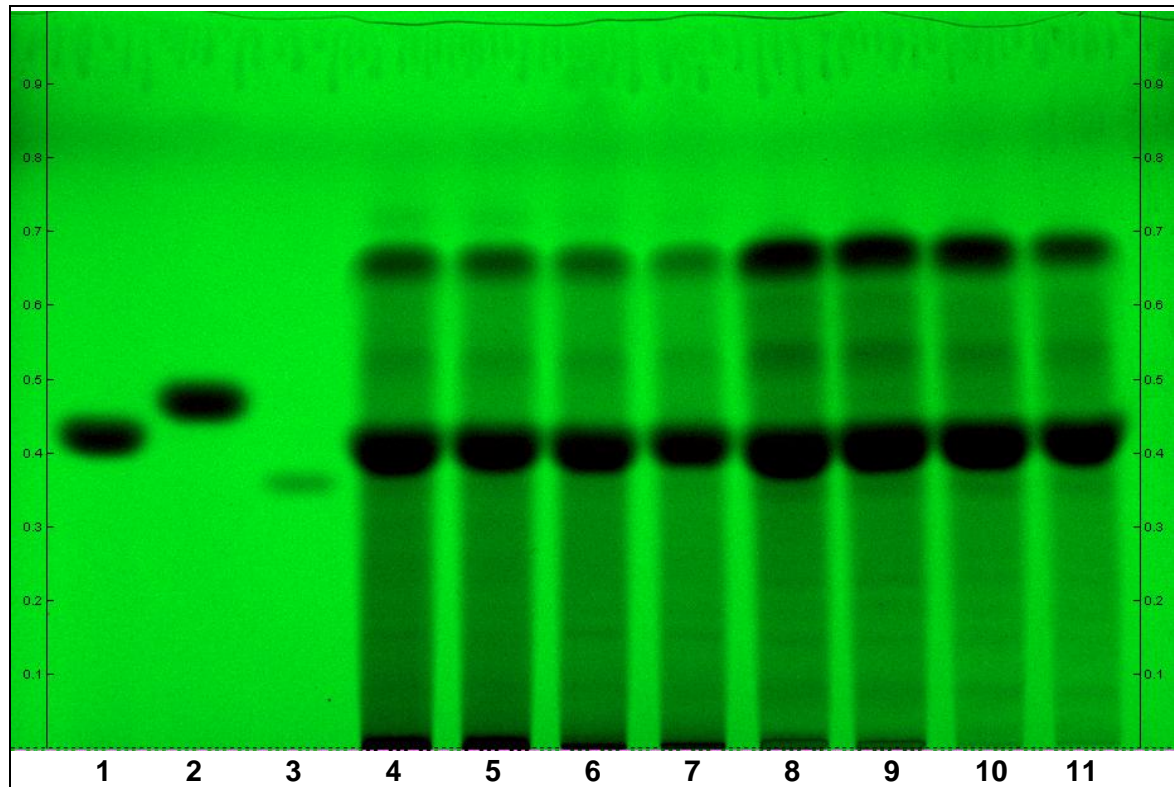
5. *Temps de saturació*

Seguint el mètode proposat per a la identificació del te per HPTLC, les plaques es desenvolupen sense saturar la cubeta.¹

6. *Sistema de derivatització*

Els primers sistemes de derivatització amb què es va treballar van ser la iodina i el *Natural Products Reagent*, però cap d'ells va permetre obtenir una placa revelada amb bandes significatives. En el moment en què es va introduir la catequina com a patró es va provar de revelar la placa amb vanil·lina sulfúrica per immersió. En entrar en contacte amb la vanil·lina sulfúrica, la catequina dóna lloc a bandes vermelles molt característiques. Com que aquestes bandes vermelles permeten obtenir un cromatograma amb un perfil de bandes característic, aquest va ser el revelador escollit (**Figura 2b**).

¹ Reich E. TLC/HPTLC identification of green tea. Document PA/PH/Exp. 13B/T(11)69: Estrasburg: European Pharmacopeia. 5p.



| Posició | Mostra | Volum d'aplicació |
|---------|---------------------------|-------------------|
| 1 | Cafeïna | 10 µL |
| 2 | Teofil·lina | 10 µL |
| 3 | Teobromina | 10 µL |
| 4 | M11187 etanol + escalfor | 10 µL |
| 5 | M11187 etanol + ultrasons | 10 µL |
| 6 | M11187 metanol + escalfor | 10 µL |

| Posició | Mostra | Volum d'aplicació |
|---------|----------------------------|-------------------|
| 9 | M11187 metanol + ultrasons | 10 µL |
| 10 | M11122 etanol + escalfor | 10 µL |
| 11 | M11122 etanol + ultrasons | 10 µL |
| 12 | M11122 metanol + escalfor | 10 µL |
| 13 | M11122 metanol + ultrasons | 10 µL |

Figura 1. Cromatograma TLC desenvolupat amb la fase mòbil d'aigua:etanol:àcid fòrmic (90:8:2) en què es van provar els quatre tipus d'extractes, metanòlics i etanòlics per escalfament i ultrasons. Les sembres 7 i 11 corresponen a l'extracte escollit, el metanòlic per ultrasons.

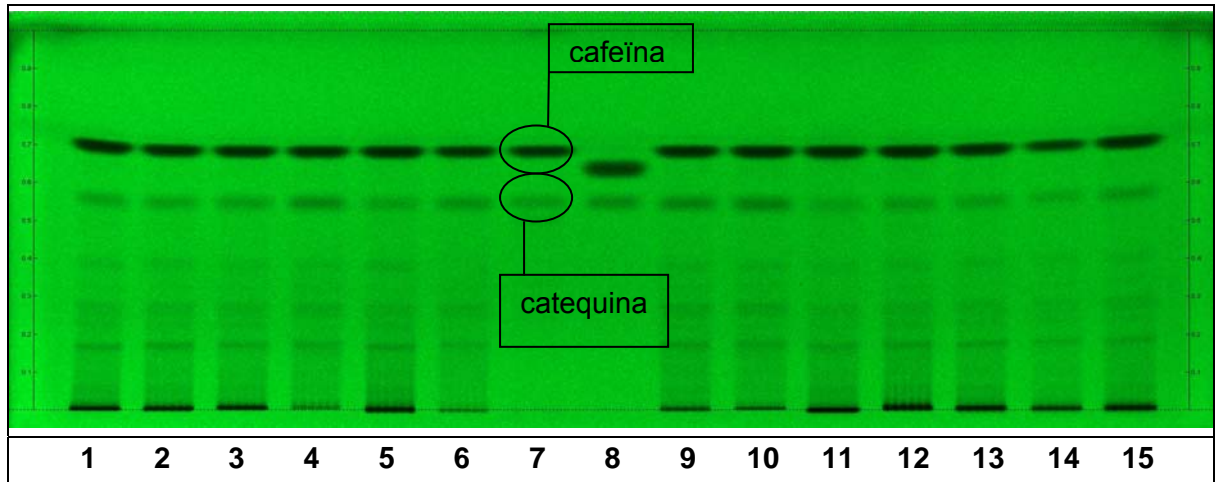


Figura 2a.

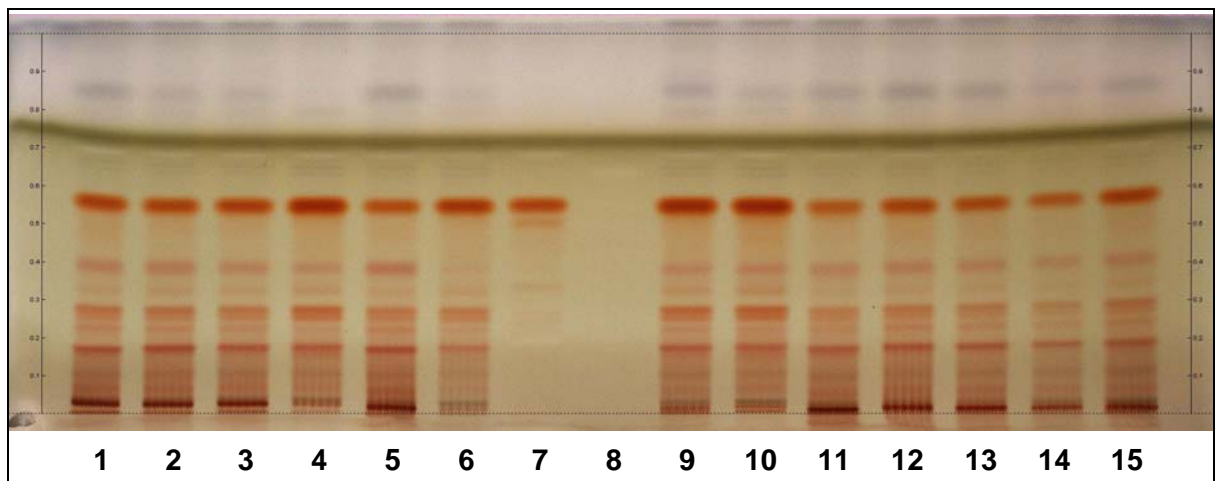
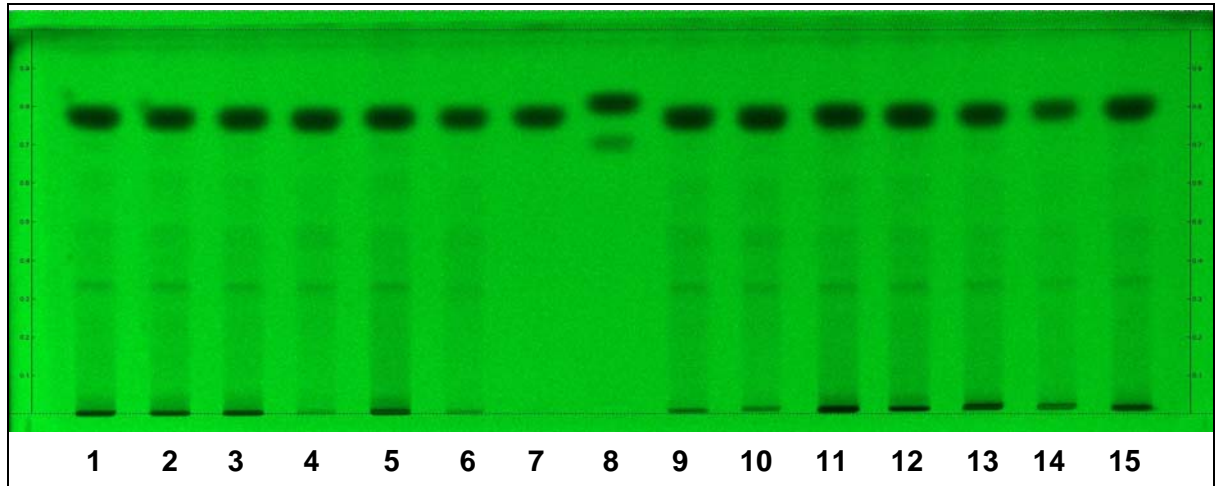


Figura 2b.

| Posició | Mostra | Volum d'aplicació | Posició | Mostra | Volum d'aplicació |
|---------|--------------------------|-------------------|---------|---------|-------------------|
| 1 | M11099* | 4 µL | 9 | M11121* | 4 µL |
| 2 | M11100* | 4 µL | 10 | M11122* | 4 µL |
| 3 | M11101* | 4 µL | 11 | M11186* | 4 µL |
| 4 | M11102* | 4 µL | 12 | M11187* | 4 µL |
| 5 | M11119* | 4 µL | 13 | M11188* | 4 µL |
| 6 | M11120* | 4 µL | 14 | M11189* | 4 µL |
| 7 | Cafeïna + Catequina | 4 µL | 15 | M11190* | 4 µL |
| 8 | Teofil·lina + Teobromina | 4 µL | | | |

*) extractes metanòlics per ultrasons.

Figura 2. Cromatograma HPTLC desenvolupat amb la fase mòbil de toluè:acetona:àcid fòrmic (9:9:2). A la **Figura 2a**, la placa desenvolupada i observada sota 254 nm UV, s'hi aprecien les bandes característiques de cafeïna i catequina. A la **Figura 2b**, la placa derivatitzada per immersió en una solució de vanil·lina sulfúrica i observada sota llum blanca, s'hi aprecien les bandes vermelles característiques de la catequina.

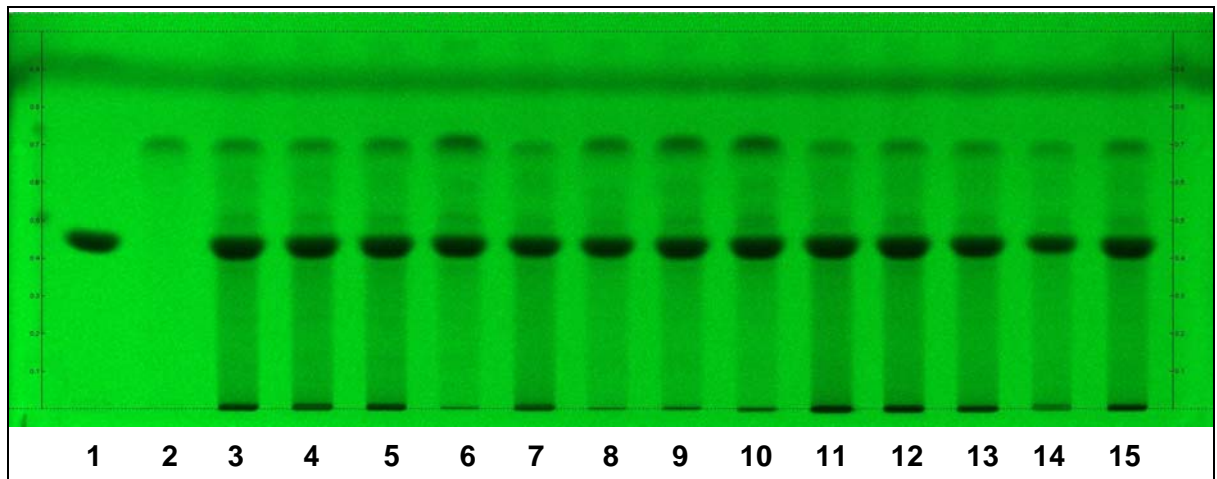


| Posició | Mostra | Volum d'aplicació |
|---------|--------------------------|-------------------|
| 1 | M11099* | 4 µL |
| 2 | M11100* | 4 µL |
| 3 | M11101* | 4 µL |
| 4 | M11102* | 4 µL |
| 5 | M11119* | 4 µL |
| 6 | M11120* | 4 µL |
| 7 | Cafeïna + Catequina | 4 µL |
| 8 | Teofil·lina + Teobromina | 4 µL |

| Posició | Mostra | Volum d'aplicació |
|---------|---------|-------------------|
| 9 | M11121* | 4 µL |
| 10 | M11122* | 4 µL |
| 11 | M11186* | 4 µL |
| 12 | M11187* | 4 µL |
| 13 | M11188* | 4 µL |
| 14 | M11189* | 4 µL |
| 15 | M11190* | 4 µL |

*) extractes metanòlics per ultrasons.

Figura 3. Cromatograma HPTLC desenvolupat amb la fase mòbil de toluè:acetona:àcid acètic glacial (30:30:20) on es pot apreciar que les bandes de la cafeïna i la catequina queden solapades.

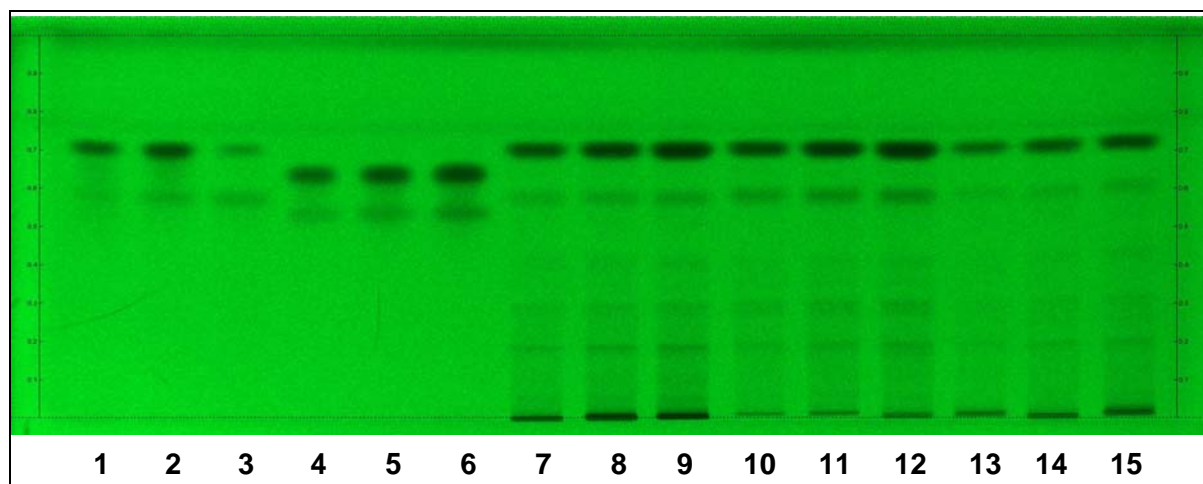


| Posició | Mostra | Volum d'aplicació |
|---------|--------------------------|-------------------|
| 1 | M11099* | 4 µL |
| 2 | M11100* | 4 µL |
| 3 | M11101* | 4 µL |
| 4 | M11102* | 4 µL |
| 5 | M11119* | 4 µL |
| 6 | M11120* | 4 µL |
| 7 | Cafeïna + Catequina | 4 µL |
| 8 | Teofil·lina + Teobromina | 4 µL |

| Posició | Mostra | Volum d'aplicació |
|---------|---------|-------------------|
| 9 | M11121* | 4 µL |
| 10 | M11122* | 4 µL |
| 11 | M11186* | 4 µL |
| 12 | M11187* | 4 µL |
| 13 | M11188* | 4 µL |
| 14 | M11189* | 4 µL |
| 15 | M11190* | 4 µL |

*) extractes metanòlics per ultrasons.

Figura 4. Cromatograma HPTLC desenvolupat amb la fase mòbil d'acetat d'etil:metanol:aigua (100:13.5:10) on es pot observar que les bandes tenen cua d'elució.



| <i>Posició</i> | <i>Mostra</i> | <i>Volum d'aplicació</i> |
|----------------|---------------|--------------------------|
| 1 | Cafeïna | 2 µL |
| 2 | Catequina | 3 µL |
| 3 | M11099* | 4 µL |
| 4 | M11100* | 2 µL |
| 5 | M11101* | 3 µL |
| 6 | M11102* | 4 µL |
| 7 | M11119* | 2 µL |
| 8 | M11120* | 3 µL |

| <i>Posició</i> | <i>Mostra</i> | <i>Volum d'aplicació</i> |
|----------------|---------------|--------------------------|
| 9 | M11121* | 4 µL |
| 10 | M11122* | 2 µL |
| 11 | M11186* | 3 µL |
| 12 | M11187* | 4 µL |
| 13 | M11188* | 2 µL |
| 14 | M11189* | 3 µL |
| 15 | M11190* | 4 µL |

*) extractes metanòlics per ultrasons.

Figura 5. Cromatograma HPTLC desenvolupat amb la fase mòbil de toluè:acetona:àcid fòrmic (9:9:2) en què es van provar tres volums d'aplicació (2, 3 i 4 µL) pels patrons i per tres mostres diferents. Les sembres 3, 6, 9, 12 i 15 corresponen al volum escollit, el de 4 µL.

Annex 3. Desenvolupament del mètode de valoració de la cafeïna per HPLC

a. Elecció de la fase mòbil

Per escollir la fase mòbil se'n van estudiar dues: la proposada a la monografia de la nou de cola de la Farmacopea Europea, una mescla de metanol i aigua (25:75 V/V), i la proposada a la monografia de la llavors de guarana de la Farmacopea Francesa, una mescla de metanol i aigua (35:65 V/V). Els resultats del test d'adequació del sistema van ser decisius per fer l'elecció. A la fase mòbil de metanol i aigua (35:65 V/V), els pics d'epicatequina i catequina no sortien prou separats (**Figura 6**), motiu pel qual es va descartar aquesta fase i es va escollir la de metanol i aigua (25:75 V/V), que sí que permetia una bona separació (**Figura 7**).

QuickTime™ and a decompressor are needed to see this picture.

| Substància de referència | Preparació | Temps de retenció (min) |
|---------------------------------|------------------------------|--------------------------------|
| Teobromina | 7.3 mg/50 mL fase mòbil* | 3.568 |
| (+)-catequina | 14.7 mg/ 25 mL fase mòbil* | 4.193 |
| Teofil·lina | 7.9 mg/50 mL fase mòbil* | 5.065 |
| Epicatequina | 14.4 mg/ 25 mL fase mòbil* | 5.815 |
| Cafeïna | 29.41 mg/ 100 mL fase mòbil* | 5.993 |

*) La solució que conté totes les substàncies de referència es prepara amb 1 mL de cada solució i 10 mL de metanol 35%.

Figura 6. Cromatograma on es mostra el test d'adequació del sistema amb totes les substàncies de referència, desenvolupat amb la fase mòbil d'etanol i aigua (35:65 V/V), L'epicatequina i la cafeïna tenen temps de retenció molt similars i els seus pics queden pràcticament ajuntats.

QuickTime™ and a decompressor are needed to see this picture.

| Substància de referència | Preparació | Temps de retenció (min) |
|---------------------------------|------------------------------|--------------------------------|
| Teobromina | 7.3 mg/50 mL fase mòbil* | 4.790 |
| (+)-catequina | 14.7 mg/ 25 mL fase mòbil* | 7.345 |
| Teofil·lina | 7.9 mg/50 mL fase mòbil* | 7.873 |
| Cafeïna | 29.41 mg/ 100 mL fase mòbil* | 10.907 |
| Epicatequina | 14.4 mg/ 25 mL fase mòbil* | 13.733 |

*) La solució que conté totes les substàncies de referència es prepara amb 1 mL de cada solució i 10 mL de metanol 35%.

Figura 7. Cromatograma on es mostra el test d'adequació del sistema amb totes les substàncies de referència, desenvolupat amb la fase mòbil d'etanol i aigua (25:75 V/V). Les cinc substàncies de referència tenen temps de retenció separats entre elles i els seus pics queden clarament distanciat.

b. Elecció del mètode

Partint de la hipòtesi que eren equivalents, es van comparar dos mètodes: el proposat a la monografia de la nou de cola de la Farmacopea Europea i un altre de dissenyat per la Unitat de Farmacognòsia de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona, que requeria menys manipulació de la mostra. Els resultats de l'anàlisi van confirmar que els dos mètodes eren equivalents (**Taula 1**). Per aquest motiu, es va escollir el mètode desenvolupat per la Unitat de Farmacognòsia, que permet obtenir els mateixos resultats amb un procés d'extracció de la mostra més senzill i amb menys manipulació.

| MOSTRA | PES (g) | ÀREA CAF | % CAFEINA | |
|----------|---------|----------|-----------|------|
| M11122 1 | 0,4996 | 1260557 | 4,16 | 4,17 |
| M11122 2 | 0,5017 | 1270341 | 4,17 | |
| M11187 1 | 0,4999 | 1099595 | 3,63 | 3,64 |
| M11187 2 | 0,5013 | 1109875 | 3,65 | |

Taula 1a.

| MOSTRA | PES (g) | ÀREA CAF | % CAFEINA | |
|----------|---------|----------|-----------|------|
| M11122 1 | 0,4995 | 1264365 | 4,17 | 4,14 |
| M11122 2 | 0,5008 | 1247224 | 4,11 | |
| M11187 1 | 0,5003 | 1112670 | 3,67 | 3,65 |
| M11187 2 | 0,5008 | 1102396 | 3,63 | |

Taula 1b.

Taula 1. Resultats dels dos mètodes desenvolupats amb la fase mòbil d'etanol i aigua (25:75 V/V). A la **Taula 1a** es mostren els resultats de l'anàlisi desenvolupada amb el mètode proposat a la monografia de la nou de cola de la Farmacopea Europea. A la **Taula 1b** es mostren els resultats de l'anàlisi desenvolupada amb el mètode proposat per la Unitat de Farmacognòsia de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona. La darrera columna indica la concentració de cafeïna de les mostres en tant per cent, que és pràcticament equivalent en tots dos procediments.