

Determinação do teor de flavonoides totais expressos em vitexina em extratos de *Passiflora incarnata*

Considerando que a IN 02/2014 define que os extratos de *Passiflora incarnata* empregados na formulação de produtos tradicionais fitoterápicos de registro simplificado deverão ser padronizados em teor de flavonoides totais expressos em vitexina, uma vez que os estudos clínicos avaliados utilizaram extratos padronizados nesses marcadores e, ainda, que os compêndios oficiais reconhecidos pela ANVISA apresentam método analítico por espectrofotometria para a quantificação de flavonoides totais expressos em vitexina em extratos dessa espécie, as empresas devem usar os métodos analíticos compendiais para determinar o teor de marcadores no extrato. Recomenda-se que esse seja, sempre que possível, o método a ser adaptado para o produto terminado. Assim sendo, no momento do desenvolvimento da formulação, devem ser selecionados excipientes e revestimentos que não interfiram na quantificação dos marcadores na quantificação por espectrofotometria. Caso isso ocorra, qualquer outro método pode ser proposto, desde que corretamente validado.

No caso do solicitante de registro desejar introduzir um método mais seletivo, como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), ou, na impossibilidade de utilizar apenas excipientes e revestimentos que não interfiram no método espectrofotométrico, devem ser desenvolvidos e validados métodos próprios, a fim de quantificar esses marcadores nos extratos de *P. incarnata* e estabelecer um fator de correlação entre o teor de flavonoides expressos em vitexina obtidos por CLAE e por espectrofotometria. Esse fator deve ser estabelecido após a avaliação de diferentes lotes de matéria-prima, preferencialmente obtidos em diversas épocas do ano e de diferentes fornecedores, por meio dos dois métodos. Desse modo deve ser demonstrada a reprodutibilidade do fator de correlação em diferentes lotes de matéria-prima. Posteriormente, o método CLAE pode ser adaptado e validado para o produto terminado, utilizando-se o fator de correlação, pré-determinado para o extrato, no lote do produto terminado correspondente.

Nos métodos CLAE devem ser identificados e quantificados todos os picos do cromatograma com resolução e pureza de pico adequadas e que apresentem espectro de absorção no UV característico de flavonoides. Recomenda-se que sejam utilizados métodos cromatográficos condizentes com o estado da arte, que permitam a identificação dos picos correspondentes aos flavonoides por meio da comparação dos respectivos tempos de retenção e espectros de absorção no UV com substância química de referência (SQR). Para determinação do teor de flavonoides totais expressos em vitexina, deverão ser estabelecidos os tempos de retenção relativos e fatores de conversão entre cada flavonoide identificado e a vitexina. Esse fator deverá ser considerado para conversão do fator resposta (área) para cada um dos picos no valor correspondente à vitexina, na mesma concentração. Os valores transformados deverão ser utilizados, então, para a determinação da concentração dos flavonoides totais expressos em vitexina.

Separadamente devem ser calculadas as concentrações de cada flavonoide na amostra, de acordo com a fórmula abaixo:

$$\text{Resultado} = (At/Av) \times Cv \times (Vt/Wt) \times F \times 100$$

At = área do pico do analito relevante na solução teste

Av = área do pico da vitexina (SQR)

Cv = concentração da vitexina (SQR) na solução padrão (mg/mL)

Vt = volume de diluição da solução da amostra (mL)

Wt = peso da amostra (mg)

F = fator de conversão do analito relevante correspondente

Calcula-se o conteúdo de flavonoides totais expressos em vitexina como a soma da porcentagem de cada flavonoide relevante na amostra.