

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO E
INOVAÇÃO TECNOLÓGICA EM MEDICAMENTOS

AGNA HÉLIA DE OLIVEIRA

**Tecnologias de produção e controle de qualidade da matéria-prima vegetal,
obtida a partir das folhas de *Poincianella pyramidalis* (TUL.) L. P.**

QUEIROZ

JOÃO PESSOA

2017

AGNA HÉLIA DE OLIVEIRA

**Tecnologias de produção e controle de qualidade da matéria-prima vegetal,
obtida a partir das folhas de *Poincianella pyramidalis* (TUL.) L. P.**

QUEIROZ

Trabalho de tese, apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos da Universidade Federal da Paraíba para obtenção do título de doutor.

Área de concentração: Inovação tecnológica em medicamentos

Orientador: Prof. Dr. Rui Oliveira Macêdo

Co-orientador: Prof. Dr. Fábio Santos Souza

JOÃO PESSOA

2017

O48t Oliveira, Agna Hélia de.

Tecnologias de produção e controle de qualidade da matéria-prima vegetal, obtida a partir das folhas de *Poincianella Pyramidalis* (Tul.) L. P. Queiroz / Agna Hélia de Oliveira. - João Pessoa, 2017.

118 f. : il.

Orientação: Rui Oliveira Macêdo.

Coorientação: Fábio Santos Souza.

Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

1. Medicamentos. 2. Medicamentos - Inovação tecnológica. 3. *Poincianella pyramidalis*. 4. Planejamento fatorial. I. Macêdo, Rui Oliveira. II. Souza, Fábio Santos. III. Título.

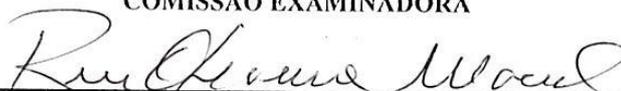
UFPB/BC

AGNA HÉLIA DE OLIVEIRA

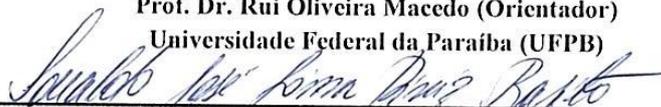
Tecnologias de produção e de controle de qualidade da matéria-prima vegetal, obtida a partir das folhas de *Poincianella pyramidalis* (Tul.) L. P. Queiroz

Trabalho de tese, apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos da Universidade Federal da Paraíba, como requisito, para obtenção do título de doutor.

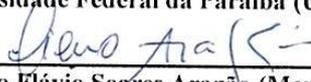
COMISSÃO EXAMINADORA



Prof. Dr. Rui Oliveira Macedo (Orientador)
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)



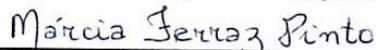
Prof. Dr. Ronaldo José Lima Diniz Basílio (Membro Interno)
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)



Prof. Dr. Cicero Flávio Soares Aragão (Membro Interno)
Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN)



Prof.ª Dra. Elisana Afonso de Moura Pires (Membro Externo)
Faculdade de Enfermagem Nova Esperança (FACENE)



Prof.ª Dra. Márcia Ferraz Pinto (Membro Externo)
Faculdade de Medicina Nova Esperança (FAMENE)

JOÃO PESSOA, PB

NOVEMBRO-2017

DEDICATÓRIA

A Deus pela sua imensa bondade e misericórdia e por ter me concedido o dom da vida.

A minha querida e inesquecível mãe (*in memoriam*), pelo seu exemplo de perseverança e amor ao próximo e por todos os seus ensinamentos e amor incondicional.

A minha amada filha Alice pelo simples fato de existir e ser parte de mim e aos meus dois anjinhos João e Pedro (*in memoriam*) que mesmo não tendo permanecido muito tempo entre nós, me fizeram sentir mais uma vez o amor mais puro e verdadeiro que existe no plano terreno.

AGRADECIMENTOS

À todos que de forma direta e indireta, contribuíram para realização deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Rui Oliveira Macedo, pela confiança, ensinamentos e orientação;

Ao prof. Dr. Fábio Santos Souza, pela paciência, amizade, apoio, ensinamentos e orientação;

Ao meu amigo, parceiro e fiel escudeiro Valmir Gomes, pela colaboração na execução deste trabalho, pelos seus conselhos nos momentos de desânimo e por sua alegria e otimismo sempre;

Aos colegas e companheiros de bancada, do laboratório LCQF, Renata Leite, José Venâncio e Fabrício Ravy, pela grande colaboração na execução deste trabalho;

À todos os professores que fazem parte do PPgDITM, pelos ensinamentos e contribuição na minha formação acadêmica;

As minhas amadas irmãs, Magna Gleny, Glícia Miquerine e Cátia Carine, pelo apoio, confiança e companheirismo em todos os momentos;

Aos meus adorados sobrinhos, Davi, Tainá, Caio, Maria Eduarda, Nicolás, Gabriel e Eloísa, pelo carinho e amor;

A tia Elzimar, a quem devo toda gratidão do mundo, maior responsável pela formação do meu caráter, que sempre me incentivou a lutar pelos meus sonhos;

Aos meus avós Elias e Dalvaci, que me criaram como filha, grandes responsáveis pela minha educação e caráter, pois foram eles que me deram a oportunidade de estudar e de ter melhores oportunidades.

OLIVEIRA, A. H. **Tecnologias de produção e controle de qualidade da matéria-prima vegetal, obtida a partir das folhas de *Poincianella pyramidalis* (TUL.) L. P. QUEIROZ.** 118p. Tese (Doutorado em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos) – Centro de Ciências da Saúde, , Universidade Federal da Paraíba; João Pessoa, 2017.

RESUMO

Poincianella pyramidalis (Tul.) L. P. QUEIROZ é uma espécie endêmica do bioma caatinga, popularmente conhecida como “catingueira”. Utilizada na medicina tradicional para o tratamento de gastrite, cólica, diarreia, asma, bronquite, diabetes, inflamação, além de apresentar atividade cicatrizante. Devido a esta variedade de usos medicinais, a espécie possui um grande potencial para o desenvolvimento de um medicamento fitoterápico. O presente trabalho teve como principais objetivos, padronizar extratos secos, obtidos por *spray dryer*, desenvolver e validar metodologia analítica por CLAE para quantificação do canferol e quercetina e realizar estudo de estabilidade acelerada de misturas binárias do extrato seco com diferentes excipientes farmacêuticos. A obtenção dos extratos secos foi realizada em *Mini Spray Dryer*, LabPlant, SD-05, com os seguintes parâmetros de operação: temperatura de entrada de ar (160, 170 e 180°C), taxa de fluxo de alimentação (4, 6 e 8 mL/min) e proporção do adjuvante de secagem dióxido de silício coloidal (10, 15 e 20%). Um planejamento fatorial 2^3_{+1} associado a MSR foi aplicado para avaliar os efeitos dos parâmetros do processo sobre os teores de canferol e quercetina e definir as melhores condições operacionais (T= 160°C, TF= 4mL/min e % do adjuvante de secagem=10%). A quantificação simultânea dos dois flavonoides, foi realizada por CLAE nas seguintes condições cromatográficas: $\lambda= 370$ nm, mistura de metanol: ácido fosfórico 1% (47:53 v/v), pH= 3,1, fluxo de 1,2 mL/min e coluna C18 Phenomenex® (250 mm x 4,6 mm x 5 μ m). O estudo de estabilidade acelerada das misturas binárias(1:1) do extrato seco com celulose microcristalina, maltodextrina, amido e lactose foi realizado em incubadora B.O.D, com controle de temperatura, durante 180 dias sob temperatura de $40 \pm 2^\circ\text{C}$. Os resultados obtidos demonstraram que os teores de canferol e quercetina foram influenciados pelas condições do processo. O método analítico foi linear no intervalo de 0,4-7,6 $\mu\text{g/mL}$ para ambos os analitos, $R^2= 0,9999$ e $0,9996$, para o canferol e a quercetina, respectivamente. Os biomarcadores apresentaram melhor estabilidade nas misturas com amido e cinética de degradação diferente para cada excipiente estudado.

PALAVRAS-CHAVE: *Poincianella pyramidalis*; planejamento fatorial; *spray dryer*; CLAE; cinética de degradação.

OLIVEIRA, A. H. **Tecnologias de produção e controle de qualidade da matéria-prima vegetal, obtida a partir das folhas de *Poincianella pyramidalis* (TUL.) L. P. QUEIROZ.** 118p. Tese (Doutorado em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba; João Pessoa, 2017.

ABSTRACT

Poincianella pyramidalis (Tul.) L. P. QUEIROZ is an endemic species of the caatinga biome, popularly known as "catingueira". Used in traditional medicine for the treatment of gastritis, colic, diarrhea, asthma, bronchitis, diabetes, inflammation, besides presenting cicatrizant activity. Due to this variety of medicinal uses, the species has great potential for the development of a herbal medicine. The present work had as main objectives, to standardize dry extracts, obtained by the sprinkling process, to develop and validate analytical methodology by HPLC for quantification of canferol and quercetin and to carry out an accelerated stability study of binary mixtures of dry extract with different pharmaceutical excipients. Dry extracts were obtained by spraying in Mini *Spray Dryer*, LabPlant, SD-05, employing the following operating parameters: air inlet temperature (160, 170 and 180 ° C), feed flow rate (4, 6 and 8 mL / min) and drying adjuvant ratio colloidal silicon dioxide (10, 15 and 20%). A 2^{3+1} factorial design associated with MSR was applied to evaluate the effects of the process parameters on canferol and quercetin contents and to define the best operating conditions (T = 160°C, TF = 4mL / min and% of drying adjuvant = 10 %). The simultaneous quantification of the two flavonoids was performed by HPLC in the following chromatographic conditions: $\lambda = 370$ nm, methanol: 1% phosphoric acid (47:53 v / v), pH = 3.1, 1.2 mL flow / min and Phenomenex® C18 column (250 mm x 4.6 mm x 5 μ). The accelerated stability study of the binary mixtures (1: 1) of the dry extract with microcrystalline cellulose, maltodextrin, starch and lactose was carried out in a B.O.D incubator under temperature control for 180 days at a temperature of 40 ± 2 ° C. The results obtained showed that the levels of canferol and quercetin were significantly affected by the process conditions. The analytical method was linear in the range of 0.4-7.6 $\mu\text{g} / \text{mL}$ for both analytes, $R_2 = 0.9999$ and 0.9996 , for canferol and quercetin, respectively. The biomarkers presented better stability in the mixtures with starch and different degradation kinetics for each excipient studied.

Keywords: *Poincianella pyramidalis*; dry extract; experimental design; *Spray dryer*; HPLC; Degradation kinetics.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Folhas de <i>Poincianella pyramidalis</i> (Tul.) L. P. Queiroz.....	25
Figura 2 - Flores de <i>Poincianella pyramidalis</i> (Tul.) L. P. Queiroz	26
Figura 3 - Caule de <i>Poincianella pyramidalis</i> (Tul.) L. P. Queiroz.....	27
Figura 4 - Fruto-legume de <i>Poincianella pyramidalis</i> (Tul.) L. P. Queiroz.	27
Figura 5 - Substâncias isoladas de <i>P. Pyramidalis</i>	29
Figura 6 - Esquema geral do equipamento de Spray- Dryer e do fluxo do ar de secagem.	38
Figura 7 - Gráfico de distribuição granulométrica do pó obtido das folhas de <i>P. Pyramidalis</i> retida em diferentes tamanhos de aberturas de malhas.....	60
Figura 8 - Cromatogramas do extrato fluido de <i>P. pyramidalis</i> , obtidos a partir de diferentes granulometrias de pós (354, 250, 149, 74) μm	62
Figura 9 - Estruturas químicas dos biomarcadores canferol e quercetina.	64
Figura 10 - Cromatogramas das amostras de extrato fluido de <i>P. pyramidalis</i> , soluções padrão de canferol, quercetina e branco (fase móvel).	65
Figura 11 - Cromatogramas das amostras do extrato nebulizado de <i>P. pyramidalis</i> , soluções padrão de canferol e quercetina e branco (fase móvel).	65
Figura 12 - Espectros de absorção molecular UV-Vis, na faixa de 200-500 nm, do biomarcador canferol nas amostras dos extratos fluido e nebulizado e do padrão analítico....	66
Figura 13 - Espectros de absorção molecular UV-Vis, na faixa de 200-500 nm, do biomarcador quercetina nas amostras dos extratos fluido e nebulizado e do padrão analítico.	67
Figura 14 - Gráfico da curva analítica do canferol na faixa de concentração de 0,4-7,6 $\mu\text{g/mL}$	69
Figura 15 - Gráfico da curva analítica da quercetina na faixa de concentração de 0,4-7,6 $\mu\text{g/mL}$	70
Figura 16 - Gráfico dos resíduos das curvas analíticas dos biomarcadores canferol (A) e quercetina (B), respectivamente.	71
Figura 17 - Gráficos de superfície de resposta, mostrando os efeitos da temperatura de entrada de ar (T), proporção de dióxido de silício coloidal (DSC) e taxa de fluxo de alimentação (F) sobre os teores de canferol (A e B) e quercetina (C e D).....	81
Figura 18 - Concentração do biomarcador quercetina nas misturas binárias do extrato nebulizado com os excipientes, amido, celulose microcristalina, maltodextrina, lactose, durante o tempo de armazenamento (180 dias) à temperatura de 40°C.....	84

Figura 19 - Concentração do biomarcador canferol nas misturas binárias do extrato nebulizado com os excipientes, amido, celulose microcristalina, maltodextrina e lactose, durante o tempo de armazenamento (180 dias) à temperatura de 40°C.....	84
Figura 20 - Cinética de degradação do canferol nos pré-formulados, (A) Ext Neb 10%: AM; Ext Neb 10%: AM: LC, ordem zero (B) Ext Neb 10%: MD, Ext Neb 10%: CMC, segunda ordem, durante o período de armazenamento à temperatura de 40°C.	85
Figura 21 - Cinética de degradação da quercetina nos pré-formulados, Ext Neb 10%: AM; Ext Neb 10%: AM: LC; Ext Neb 10%: MD; Ext Neb 10%: CMC, segunda ordem, durante o período de armazenamento à temperatura de 40°C.	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Lista de equipamentos utilizados nos experimentos.	46
Tabela 2 - Tamanhos das aberturas das malhas dos tamises.	47
Tabela 3 – Matriz do planejamento fatorial 2^3_{+1} para secagem por <i>spray dryer</i>	54
Tabela 4 - Percentual de massa do pó obtido das folhas de <i>P. Pyramidalis</i> , retida nos diferentes tamanhos de malhas.	59
Tabela 5 - Concentração dos biomarcadores canferol e quercetina ($\mu\text{g/mL}$) nos extratos fluidos, obtidos a partir de 200g/1000 mL em diferentes proporções de etanol: água, pelo processo de maceração.	61
Tabela 6 - Concentrações dos biomarcadores canferol e quercetina em função dos diferentes tamanhos de partículas do pó das folhas de <i>P. pyramidalis</i>	62
Tabela 7 - Valores das áreas versus concentração das curvas analíticas do canferol.	68
Tabela 12 - Resultados da repetibilidade e precisão intermediária para os biomarcadores canferol e quercetina, presentes nas amostras de extrato fluido de <i>P. pyramidalis</i>	73
Tabela 16 - Análise de variância (ANOVA) da precisão intermediária do canferol em amostras de extrato seco de <i>P. pyramidalis</i>	75
Tabela 17 - Análise de variância (ANOVA) da precisão intermediária da quercetina em amostras de extrato seco de <i>P. pyramidalis</i>	75
Tabela 18 - Resultados do teste de recuperação do método, para os biomarcadores canferol e quercetina no extrato fluido de <i>P. pyramidalis</i>	76
Tabela 19 - Resultados obtidos no teste de robustez, com variação da temperatura da coluna, pH e fluxo da fase móvel para o biomarcador canferol, nas amostras de extrato fluido.	77
Tabela 20 - Resultados obtidos no teste de robustez, com variação da temperatura da coluna, pH e fluxo da fase móvel para o biomarcador quercetina, nas amostras de extrato fluido.	77
Tabela 21 - Valores das concentrações de canferol nas soluções amostra do extrato de <i>P. pyramidalis</i> durante o período de armazenamento de 24 horas.	78
Tabela 22 - Valores das respostas em relação as variáveis independentes avaliadas.	79
Tabela 23 - Sumário dos efeitos das variáveis independentes e suas significâncias (ANOVA) sobre as respostas analisadas no planejamento fatorial.	80
Tabela 24 - Rendimento do processo de secagem por <i>spray dryer</i> em diferentes condições operacionais.	82

Tabela 25 - Valores das concentrações de quercetina e canferol nas amostras dos pré-formulados nos tempos 0, 90 e 180 dias do estudo de estabilidade.	83
Tabela 26 - Parâmetros cinéticos do biomarcador canferol nos pré-formulados em condições de armazenamento a 40°C durante 180 dias.	85
Tabela 27 - Parâmetros cinéticos do biomarcador quercetina nos pré-formulados, em condições de armazenamento a 40°C durante 180 dias.	85

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AMD	Amido
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CV	Coefficiente de variação ou desvio padrão relativo
DAD	Detector arranjo de diodo
DPR	Desvio padrão relativo
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
DPR	Desvio padrão relativo
DSC	Dióxido de silício coloidal
EEE	Extrato etanólico da entrecasca
IFC	Íon Ferroso quelato
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia
LC	Lactose
LQ	Limite de quantificação
LD	Limite de detecção
MD	Maltodextrina
MIC	Concentração inibitória mínima
MSR	Metodologia de superfície resposta
OMS	Organização Mundial da Saúde
UV-vis	Ultravioleta visível

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. OBJETIVOS.....	20
2.1. Objetivo geral.....	20
2.2. Objetivos específicos	20
3. REFERENCIAL TEÓRICO	23
3.1. PLANTAS MEDICINAIS	23
3.2. MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS	24
3.3. POINCIANELLA <i>PYRAMIDALIS</i> (TUL.) L. P. QUEIROZ.....	25
3.3.1. Aspectos botânicos.....	25
3.3.2. Usos	27
3.3.4. Atividades biológicas	31
3.3.4.1. Atividade anti-inflamatória.....	31
3.3.4.2. Atividade Antimicrobiana	31
3.3.4.3. Atividade Anti-helmíntica	33
3.3.4.4. Atividade Gastroprotetora	33
3.3.4.5. Atividade Antioxidante.....	34
3.3.5. Toxicidade	34
3.4. EXTRATOS VEGETAIS	35
3.5. SECAGEM POR <i>SPRAY DRYER</i>	36
3.6. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	40
3.7. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA	41
3.8. VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA	42
3.9. ESTUDO DE ESTABILIDADE.....	42
4. MATERIAL E MÉTODOS	45
4.1. DROGA VEGETAL	45
4.2. SOLVENTES E PADRÕES ANALÍTICOS	45
4.3. EQUIPAMENTOS/INSTRUMENTOS.....	45
4.4. DETERMINAÇÃO DA GRANULOMETRIA DOS PÓS.....	46

4.5. OBTENÇÃO DO EXTRATO FLUIDO DO PÓ DAS FOLHAS DE <i>P. PYRAMIDALIS</i> ..	47
4.6. DETERMINAÇÃO DO RESÍDUO SECO	48
4.7. QUANTIFICAÇÃO DOS BIOMARCADORES POR CLAE.....	48
4.8. PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES AMOSTRA.....	49
4.8.1. Preparação das amostras de extrato fluido.....	49
4.8.2. Preparação das soluções amostra de extrato seco	50
4.8.3. Preparação das soluções amostra dos pré-formulados.....	50
4.9. PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES PADRÃO	51
4.10. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DOS BIOMARCADORES CANFEROL E QUERCETINA NAS AMOSTRAS DE EXTRATOS FLUIDO E SECO DE <i>P. PYRAMIDALIS</i>	51
4.10.1. Especificidade e Seletividade.....	51
4.10.2. Linearidade	51
4.10.3. Limite de quantificação e Limite de detecção	52
4.10.4. Precisão.....	52
4.10.5. Exatidão.....	53
4.10.6. Robustez	53
4.10.7. Estabilidade das soluções amostra e padrão.....	53
4.11. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS SECOS POR <i>SPRAY DRYER</i>	54
4.12. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....	54
4.13. RENDIMENTO DO PROCESSO DE SECAGEM.	55
4.14. PREPARAÇÃO DOS PRÉ-FORMULADOS	55
4.15. ESTUDO DE ESTABILIDADE ACELERADA	55
4.16. DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS	55
4.17. ANÁLISE ESTATÍSTICA	57
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
5.1. DISTRIBUIÇÃO GRANULOMÉTRICA DO PÓ DAS FOLHAS DE <i>P. PYRAMIDALIS</i>	59
5.2. AVALIAÇÃO DO SISTEMA DE SOLVENTES NO PROCESSO EXTRATIVO	60
5.3. AVALIAÇÃO DO PROCESSO EXTRATIVO EM FUNÇÃO DA GRANULOMETRIA DOS PÓS.....	61
5.4. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA POR CLAE	63

5.4.1. Otimização das condições cromatográficas	64
5.4.1.1. Escolha da fase móvel.....	64
5.4.2. Especificidade e seletividade.....	64
5.4.3. Linearidade	67
5.4.4. Limites de Detecção e Quantificação.....	72
5.4.5. Precisão	72
5.4.5.1. Repetibilidade e Precisão Intermediária	72
5.4.6. Exatidão.....	76
5.4.7. Robustez.....	76
5.4.8. Estabilidade das soluções amostra.....	77
5.5. AVALIAÇÃO DO EFEITO DAS CONDIÇÕES OPERACIONAIS DE SECAGEM POR <i>SPRAY DRYER</i> , NA CONCENTRAÇÃO DOS MARCADORES QUÍMICOS MONITORADOS.....	78
5.6. RENDIMENTO DO PROCESSO DE SECAGEM POR <i>SPRAY DRYER</i>	81
5.7. ESTABILIDADE PRÉ-FORMULADOS	82
6. CONCLUSÃO	88
7. REFERÊNCIAS	90
APÊNDICE.....	104
Apêndice A - Artigo Científico Publicado no International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences.....	105
Apêndice B - Artigo Científico Publicado no Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research.....	111

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais com a finalidade de tratar e curar doenças e seus sintomas remonta ao início da civilização (DISTASI, 1996). De acordo com as estimativas, existem cerca de 350.000 a 400.000 espécies vegetais identificadas em todo o mundo, onde a maioria delas está sendo usada no tratamento de diferentes doenças (AZIZ et al., 2017) no entanto com a 2ª Guerra Mundial e com o crescimento da indústria farmacêutica, houve uma diminuição da utilização desta opção terapêutica, porém no início do século XXI foi despertado novamente o interesse pelo seu emprego (YUNES; PEDROSA; CECHINEL FILHO, 2001), fato este que se deve principalmente ao alto custo e grande incidência de efeitos adversos causados pelos medicamentos sintéticos (KLEIN et al., 2010).

Poincianella pyramidalis (Tul.) L.P Queiroz é uma espécie arbórea pertencente à família Fabaceae, endêmica da região nordeste do Brasil, principalmente no bioma caatinga, popularmente conhecida como “catingueira”, “pau de porco”, “catinga de porco”, "pau de rato", "massitaíba" e "catingueira-das-folhas-largas". Suas cascas, folhas, flores e raízes são utilizadas tradicionalmente na forma de decocto e infuso para o tratamento de gastrite, cólica, diarreia, asma, bronquite, diabetes, (QUEIROZ, 2009) inflamação, além de apresentar atividade cicatrizante (ALBUQUERQUE et al., 2007; CARTAXO; SOUZA; ALBUQUERQUE, 2010).

Devido a grande diversidade de usos tradicionais esta espécie tem um grande potencial para o desenvolvimento de um medicamento fitoterápico.

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) define medicamento fitoterápico, como sendo o produto obtido a partir de matéria-prima ativa vegetal, exceto substâncias isoladas, com finalidade profilática, curativa ou paliativa, podendo ser simples, quando o ativo é proveniente de uma única espécie vegetal medicinal, ou composto, quando o ativo é proveniente de mais de uma espécie vegetal (BRASIL, 2014).

O desenvolvimento de um medicamento fitoterápico passa por várias etapas relacionadas à droga vegetal, tais como identificação botânica, condições de cultivo, época de coleta, metodologias de extração, validação de metodologias analíticas, , identificação e isolamento dos marcadores químicos, operações unitárias de secagem, armazenamento e desenvolvimento de formas farmacêuticas (CALIXTO, 2000).

A obtenção de matérias-primas vegetais padronizadas tem sido um dos principais desafios encontrados no desenvolvimento de fitoterápicos, principalmente no Brasil, sendo assim a indústria farmacêutica tem procurado encontrar alternativas para resolver este

problema. Uma das soluções encontradas, seria a produção industrial de extratos secos, visto que estes apresentam melhor farmacocinética, maior estabilidade química, físico-química e microbiológica, maior concentração de compostos ativos e maior capacidade de transformação em diferentes tipos de formas farmacêuticas sólidas, quando comparados com as formas líquidas (OLIVEIRA; BOTT; SOUZA, 2006; SOUZA et al., 2008; CARVALHO et al., 2008; OLIVEIRA; PETROVICK, 2010; BOTT; LABUZA; OLIVEIRA, 2010).

Spray dryer é uma das técnicas de secagem mais comumente empregadas na preparação de extratos vegetais, fornecendo produtos com propriedades tecnológicas adequadas em um curto período de tempo e com alta capacidade produtiva, porém este processo pode ser afetado significativamente por parâmetros tais como temperatura de entrada de ar, taxa de fluxo de alimentação, concentração e tipo de adjuvante de secagem (TONON; BRABET; HUBINGER, 2008; MUZAFFAR; KUMAR, 2015).

Os parâmetros do processo de secagem por *spray dryer* podem ser avaliados e otimizados por meio da utilização da metodologia de superfície de resposta (RSM), uma ferramenta estatística amplamente utilizada para avaliar os efeitos de vários fatores que podem influenciar o processo de secagem, de forma simultânea, além de permitir definir as melhores condições para obtenção das respostas desejadas (PATIL; CHAUHAN; SING, 2014; MUZAFFAR; KUMAR, 2015; PRADEEP et al, 2016)

Para garantir a qualidade do produto fitoterápico, em seu desenvolvimento, se faz necessário utilizar metodologias analíticas validadas, para a avaliação da qualidade da matéria-prima vegetal, dos produtos tecnológicos intermediários, como por exemplo, os extratos padronizados na forma líquida e seca e do produto final (SOUZA, 2004).

Assegurar a estabilidade dos extratos vegetais é também uma etapa essencial para preservar a qualidade, segurança e eficácia do produto final. Estudos de estabilidade acelerada são considerados ferramentas preditivas com ênfase em resultados qualitativos, mas de grande utilidade para o projeto de novas formulações e produtos (VEIT, 2002).

O presente trabalho teve como principais finalidades, obter e padronizar extratos secos de *Poincianella pyramidalis*, obtidos por aspersão, desenvolver e validar metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para controle de qualidade da matéria-prima vegetal e avaliar a estabilidade de pré-formulados do extrato seco com diferentes excipientes farmacêuticos, por meio de estudo de estabilidade acelerada, visto que esta espécie vegetal apresenta uma grande utilização popular e várias atividades biológicas reportadas na literatura.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Desenvolver tecnologias de produção e de controle de qualidade da matéria prima vegetal, obtida a partir do extrato hidroalcoólico das folhas de *Poincianella pyramidalis* (Tul.) L. P. Queiroz.

2.2. Objetivos específicos

- Estabelecer parâmetros de extração, para obtenção do extrato fluido das folhas de *Poincianella pyramidalis*;
- Desenvolver e validar metodologia analítica para identificação e quantificação dos biomarcadores canferol e quercetina, nos extratos fluido e seco de *P. pyramidalis*, por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD);
- Otimizar e padronizar os parâmetros de secagem do extrato hidroalcoólico das folhas de *Poincianella pyramidalis*, por *spray dryer*, empregando um planejamento fatorial 2^3_{+1} , associado a metodologia de superfície resposta;
- Avaliar a estabilidade de pré-formulados do extrato seco das folhas de *P. pyramidalis* com diferentes excipientes farmacêuticos, por meio de estudos de estabilidade acelerada;
- Determinar os parâmetros cinéticos de degradação dos biomarcadores canferol e quercetina nas amostras de pré-formulados, submetidos a estresse térmico.

REFERENCIAL TEÓRICO

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. PLANTAS MEDICINAIS

O uso de plantas medicinais pela população mundial, como terapia alternativa para o tratamento de várias doenças tem sido uma prática comum desde milhares de anos a.C (DUTRA et al, 2016). O "Eber's Papyrus" é um dos registros mais conhecidos, que documentam o uso de drogas derivadas de plantas, datando de 1500 a.C (BORCHARDT, 2002).

Acompanhando a tendência mundial, a população brasileira tem uma longa tradição no uso de plantas medicinais para o tratamento de diferentes doenças agudas e crônicas. Este fato tem despertado a atenção de muitos pesquisadores brasileiros e de algumas indústrias farmacêuticas, com isso vários estudos com plantas medicinais e seus princípios ativos tem sido realizados nas últimas décadas, (SHERIDAN, 2012; HARVEY; EDRADA-EBEL; QUINN, 2015), associado a grande biodiversidade existente no Brasil, considerada a maior do mundo, compreendendo cerca de 45.000 espécies de plantas superiores, que corresponde a 22% do total mundial (DUTRA et al., 2016).

Devido a relevância da medicina tradicional para a população mundial, a Organização Mundial da Saúde (OMS), reconhece esta prática desde 1978 e vem tentando criar estratégias para uma expansão cada vez maior do seu emprego. A OMS define "medicina tradicional", como sendo o conhecimento, habilidade e práticas baseadas nas teorias, crenças e experiências indígenas de diferentes culturas, usada para manutenção da saúde, bem como na prevenção, diagnóstico e tratamento da doença física e mental (WHO, 1978).

As plantas medicinais têm provado historicamente seu valor como fonte de moléculas com potencial terapêutico. Estima-se que cerca de 30% dos medicamentos terapêuticos avaliados, são obtidos de fontes naturais, principalmente de plantas e microorganismos (CRAGG; NEWMAN, 2013), porém a descoberta de drogas baseadas em produtos naturais está associada à algumas dificuldades intrínsecas, fato este que levou a indústria a investir em bibliotecas de compostos sintéticos como fonte de descoberta de novas drogas, entretanto os resultados obtidos não atingiram todas as expectativas, pois uma pequena quantidade destes compostos chegam ao mercado como novos medicamentos. Por esta razão o interesse científico pela descoberta de drogas oriundas de fontes naturais, apesar de seus desafios já conhecidos, foi novamente despertado (ATANASOV et al., 2015).

3.2. MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS

Fitoterápicos são medicamentos, obtidos a partir do emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais cuja segurança e eficácia sejam baseadas em evidências clínicas e que sejam caracterizados pela constância de sua qualidade (BRASIL, 2014).

Os medicamentos fitoterápicos podem ser tão eficazes quanto os medicamentos de origem sintética, deste modo, a transformação de uma planta em medicamento, deve priorizar a preservação da integridade química dos princípios ativos e, por consequência, a ação farmacológica do vegetal, garantindo a constância da ação biológica desejada. Para atingir esses objetivos, a produção de fitoterápicos requer, necessariamente de estudos prévios, relativos aos aspectos botânicos, agrônômicos, fitoquímicos, farmacológicos, toxicológicos, e de desenvolvimento de metodologias analíticas (TOLEDO et al., 2003).

O uso de fitoterápicos em todo o mundo vem crescendo ao longo das últimas décadas, principalmente nos países desenvolvidos, fato este que pode se explicar pelo perigo iminente do uso irracional dos medicamentos de natureza sintética associado ao seu alto custo, que torna seu uso muitas vezes limitado (TOMAZZONI et al., 2006).

No Brasil, o principal órgão responsável pela regulamentação de plantas medicinais e seus derivados é a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que tem como papel principal, proteger e promover a saúde da população, garantindo a segurança sanitária de produtos e serviços e participando da construção do seu acesso. Uma das ações realizadas pela ANVISA para garantir a segurança da saúde da população é a exigência do registro de medicamentos, etapa na qual os mesmos são avaliados quanto a sua segurança, eficácia e qualidade antes de serem comercialmente disponíveis para população (CARVALHO et al., 2008).

Atualmente a regulamentação em vigor no Brasil para o registro de medicamentos fitoterápicos é a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) 26/2014, que determina os aspectos essenciais ao registro, como identificação botânica de espécies vegetais utilizadas, padrão de qualidade e identidade e comprovação de eficácia e segurança que validem as indicações terapêuticas propostas. Além de estabelecer a notificação e registro de produtos tradicionais fitoterápicos, que são aqueles obtidos com emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais cuja segurança e efetividade sejam baseadas em dados de uso seguro e efetivo publicados na literatura técnico-científica e que sejam concebidos para serem utilizados sem a vigilância de um médico para fins de diagnóstico, de prescrição ou de monitorização (BRASIL, 2014).

3.3. POINCIANELLA PYRAMIDALIS (TUL.) L. P. QUEIROZ

3.3.1. Aspectos botânicos

Poincianella pyramidalis (Tul.) L. P. Queiroz era denominada de *Caesalpinia pyramidalis* (Tul.), porém em decorrência de uma recente revisão taxonômica, a mesma passou a fazer parte do gênero *Poincianella* Pertencente a família Fabaceae, exibe um porte arbóreo quando a disponibilidade hídrica é elevada, podendo chegar até 10 metros de altura e um porte arbustivo quando o suprimento hídrico é restrito (QUEIROZ, 2009).

Conhecida popularmente como “catingueira”, “catingueira-verdadeira”, “catingueira-das-folhas-largas”, “catinga de porco”, “pau-de-rato” e “massitaíba”. É uma espécie endêmica da caatinga, com ocorrência principalmente nos estados da Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Piauí, Sergipe e Bahia, além destes também foi encontrada no estado do Amazonas. Sendo uma espécie da caatinga, a “catingueira” adota a caducifolia durante o período da seca, uma estratégia importante na economia de água, porém na estação chuvosa, ela é considerada uma anunciadora de chuvas, devido ao rápido rebrotamento das folhas em resposta ao aumento da umidade relativa (ANTUNES et al., 2010).

Morfologicamente apresentam, folhas bipinadas, de coloração rosada quando jovens e esverdeadas quando maduras, com 5 a 11 folíolos sésseis, alternos, obtusos e oblongos, coriáceos, com pelos escuros estrelados (MAIA, 2004).

Figura 1 - Folhas de *Poincianella pyramidalis* (Tul.) L. P. Queiroz



Fonte: <http://www.cnip.org.br>

Flores amarelas, dispostas em cachos, pediceladas 10,0-15,0 mm, possuem inflorescência terminal ou axilar-terminal, paniculada. Com brácteas ovuladas, apiculadas, côncavas, levemente pilosas apresentando pequenos pontos glandulosos no dorso (QUEIROZ, 2009).

Figura 2 - Flores de *Poincianella pyramidalis* (Tul.) L. P. Queiroz



Fonte: <http://www.cnip.org.br>

O caule apresenta casca viva de espessura delgada, cinza-claro, internamente bege claro, às vezes levemente castanha. A casca morta de tronco idoso possui espessura delgada (< 2,0mm), rígida, com partes lisas e ásperas, cinza-claro, e apresenta numerosas lenticelas pequenas, dispostas irregularmente. Com o fendilhamento destas, são limitadas porções laminares irregulares, que ao desprender-se, deixam depressões superficiais. Por incisão, apresenta exsudato transparente aquoso de sabor levemente amargo e odor indistinto (SILVA et al., 2009).

Figura 3 - Caule de *Poincianella pyramidalis* (Tul.) L. P. Queiroz.



Fonte: <http://www.cnip.org.br>

O fruto é uma vagem sésil, coriácea, lisa, achatada, de cor escura, medindo de 8,0-11,0 cm de comprimento x 2,0-2,5 cm de largura (QUEIROZ, 2009).

Figura 4 - Fruto-legume de *Poincianella pyramidalis* (Tul.) L. P. Queiroz.



Fonte: <http://www.cnip.org.br>

3.3.2. Usos

P. pyramidalis é uma espécie bastante utilizada pela população da região do semi-árido nordestino, sendo sua madeira empregada na confecção de cercas e na produção de carvão. As

folhas jovens servem de alimento para o rebanho bovino, porém quando atingem a maturidade exalam um odor desagradável, que faz com que os animais não queiram mais se alimentar das mesmas. Quando secas, as folhas perdem o mau cheiro e podem ser fenadas, constituindo um excelente alimento animal, por conter alto teor protéico e menor conteúdo de fibras (ZANINE et al., 2005).

Flores, folhas e cascas deste vegetal, são usadas pela população na forma de infusos e decoctos, no tratamento de diversas enfermidades, tais como: asma, bronquite, febre, cólicas, diabetes, gastrite, diarreia. As folhas também são utilizadas como diurético e no tratamento de candidíase (CHAVES, 2016).

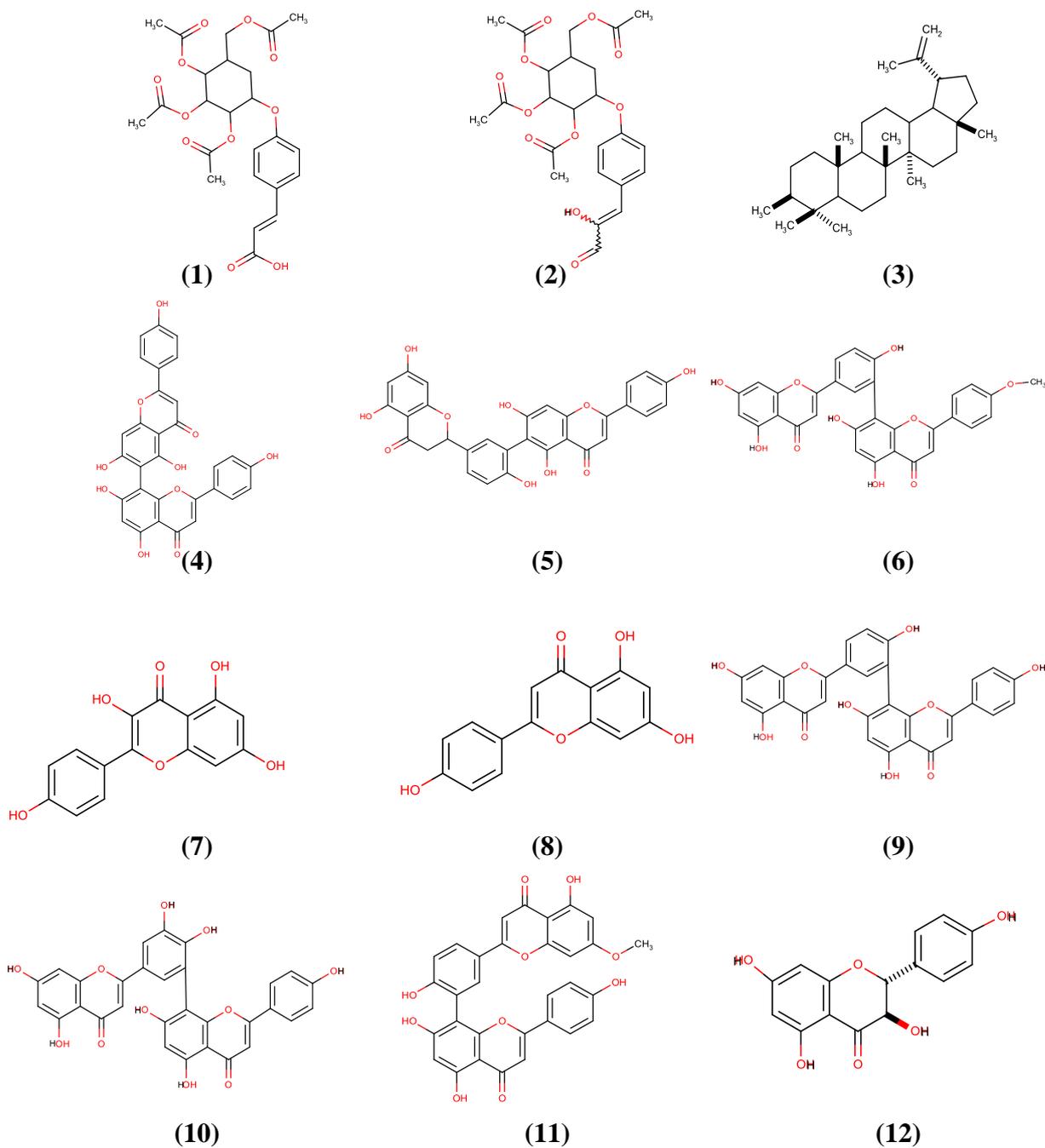
3.3.3. Fitoquímica

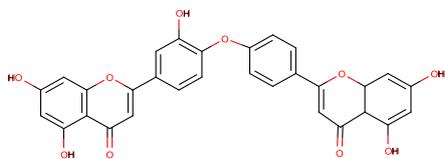
Vários metabólitos secundários foram isolados e identificados a partir de extratos obtidos das folhas, cascas e raízes de *P. pyramdalis*, principalmente os pertencentes a classe dos flavonoides, esteroides, diterpenos e lignanas.

Mendes et al (2000) isolaram dois novos ácidos glicosilfenilpropanoídes das folhas de *P. pyramdalis*, denominados de **(1)** Ác. (Z) 4 α -2',3',4',6'-tetraacetilglicopiranosil-7-hidroxicumárico e **(2)** Ác. (Z) 4 α -2',3',4',6'-tetra acetilglicopiranosil-8-hidroxicumárico, respectivamente. As substâncias **(3)** lupeol, **(4)** agathisflavona (MENDES et al., 2000; BAHIA et al., 2005; OLIVEIRA, 2010; BORGES-DOS-SANTOS et al, 2012), **(5)** caesalflavona, **(6)** podocarpusflavona A, **(7)** canferol, **(8)** apigenina (BAHIA et al., 2005), **(9)** amentoflavona, **(10)** 5-hidroxiamentoflavona, **(11)** sequoflavona, **(12)** taxifolina, **(13)** loniflavona, **(14)** sitosterol, também foram encontradas nas folhas deste vegetal (BAHIA; DAVID^a; DAVID^b, 2010). A investigação química do extrato metanólico das raízes das cascas de *P. pyramdalis*, resultaram no isolamento dos ácidos **(15)** 3,3'-dimetoxi-4,4'-dihidroxielágico e **(16)** 3,3'-dimetoxi-4-hidroxielágico-4'-O- β -D-xilopiranosídeo, **(3)** lupeol e uma mistura de **(17a)** β -sitosterol/ **(17b)** estigmasterol (OLIVEIRA; DAVID^a; DAVID^b, 2016a), além de um novo biflavonoíde, **(18)** 7-hidroxi-4'-metoxiflavona-5 α -2,4-dihidroxi-4'-metoxidihidrochalcona e na fase hexânica foram encontrados, **(19)** acetina, um novo fenilpropanoíde e o **(20)** ácido (E)-8-hidroxi-3,5-dimetoxicumarico (OLIVEIRA, 2010). Em outro estudo com o extrato clorofórmico, foram isolados quatro novos biflavonoides denominados, **(21)** (+)-5-hidroxi-7,4'-dimetoxiflavona-3 α -2'''-hidroxi-4''',4''-dimetoxidihidrochalcona, **(22)** (+)-5,7-dihidroxi-7,4'-dimetoxiflavona-3 α -2'''-hidroxi-4''',4''-dimetoxidihidrochalcona, **(23)** (-)-7-hidroxi-4'-metoxiflavona-3 α -2''', 4'''-dihidroxi-

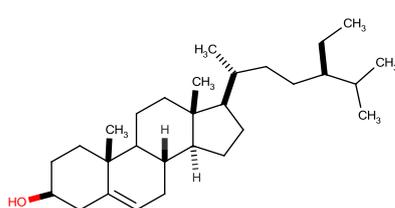
4''-metoxidihidrochalcona, (**24**) (-)-7, 4'-dihidroxi-flavanona-3,8-5'',6'',4''-trihidroxi flavona e um composto previamente identificado (**25**) 4, 2',4',4'',2''',4''''-hexahidroxi-3,5''''-bichalcona (OLIVEIRA; DAVID^a; DAVID^b, 2016b) (figura 5).

Figura 5 - Substâncias isoladas de *P. Pyramidalis*.

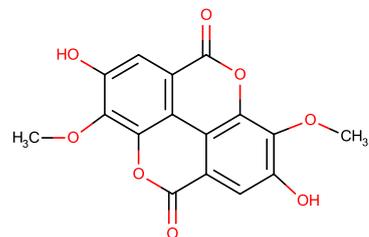




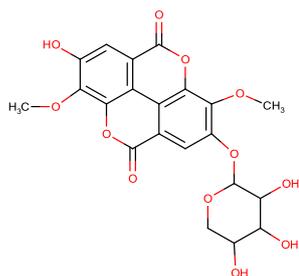
(13)



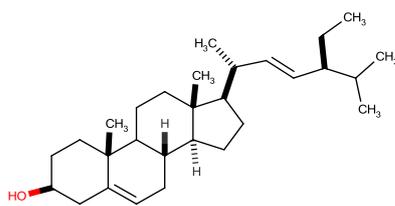
14/17a



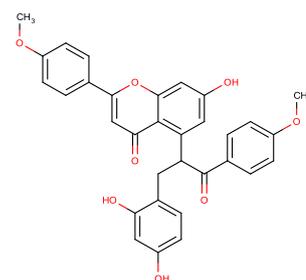
(15)



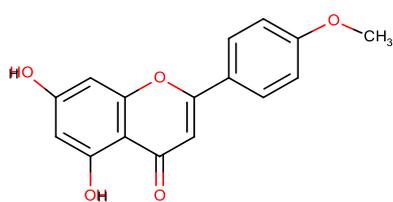
(16)



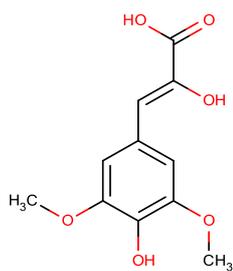
(17)



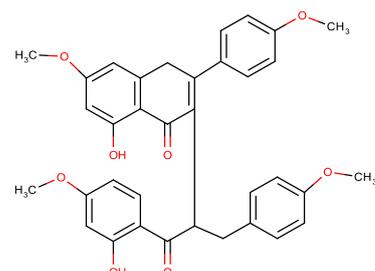
(18)



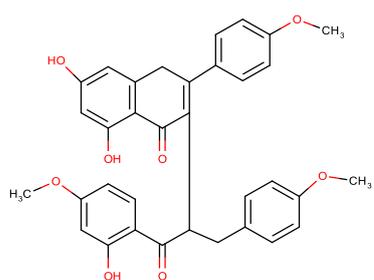
(19)



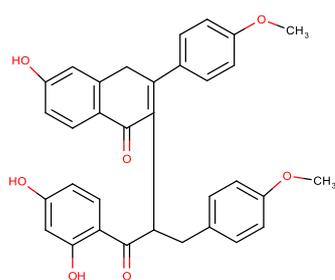
(20)



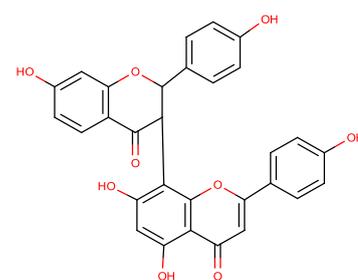
(21)



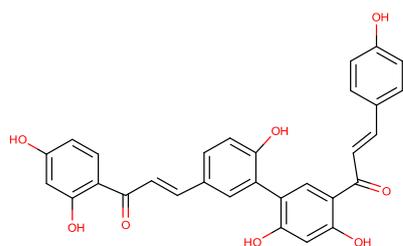
(22)



(23)



(24)



(25)

Fonte: Autor, 2017.

3.3.4. Atividades biológicas

Diante dos vários usos na medicina popular, *P. pyramidalis* tem despertado o interesse de inúmeros pesquisadores à investigar suas diferentes atividades biológicas, resultando assim em diversos trabalhos científicos publicados na literatura.

3.3.4.1. Atividade anti-inflamatória

A atividade anti-inflamatória do extrato etanólico da entrecasca (EEE) de *P. pyramidalis* foi avaliada, empregando os modelos *in vivo* de edema e peritonite em ratos e camundongos, respectivamente, e o modelo de pancreatite aguda em ratos, além destes, a ação anti-inflamatória do extrato foi testado em ratos Wistar com cistite hemorrágica. Onde foi observado a ação anti-inflamatória para todos os modelos estudados, confirmando assim o uso popular desta planta para diversas doenças inflamatórias (SANTOS, et al., 2011).

Santana et al (2012) investigou o efeito do extrato etanólico da entrecasca de *P. pyramidalis* na pancreatite aguda induzida pela obstrução comum do ducto biliar, em ratos e os resultados demonstraram uma redução na inflamação e na hiperalgesia abdominal nos grupos tratados confirmando assim as atividades anti-inflamatória e antinoceptiva do extrato.

No estudo utilizando ratos Wistar com cistite hemorrágica, os grupos tratados com o extrato etanólico da entrecasca (EEE) de *P. pyramidalis* (100 e 400 mg/ kg) apresentaram uma redução significativa da mieloperoxidase (MPO) induzida pela ciclofosfamida (MORAES et al., 2013).

3.3.4.2. Atividade Antimicrobiana

A atividade antimicrobiana dos extratos das folhas e do caule de *P. Pyramidalis* da fase acetato de etila, obtida a partir do extrato etanólico, foi testado contra cepas padrões de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, utilizando o método de difusão em disco, onde foi observada atividade antibacteriana significativa contra *Staphylococcus aureus* (NOVAES, et al, 2003). A atividade antimicrobiana do extrato etanólico do caule e folhas deste vegetal, foi testado frente à cepas de *Staphylococcus aureus* susceptível, cepas de *S. aureus* multiresistentes e fluoroquinolonas resistentes, empregando o método de diluição em placas com 96 poços, onde em cada poço foi adicionado 100µL/mL de amostra. Os extratos foram

muito ativos contra cepas de *S. aureus* multiresistentes e ativos frente as cepas fluoroquinolonas resistentes (LIMA et al, 2006).

O extrato aquoso de *P. pyramidalis* de diferentes partes, preparado por infusão, foi submetido ao ensaio de difusão em ágar, apresentado atividade significativa contra *Trichophyton rubrum*, *Candida guilliermondii*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* e *Fonsecae apedrosoi* quando comparado ao agente antifúngico anfotericina B (CRUZ et al, 2007).

O extrato aquoso das folhas desta planta foi avaliado *in vitro*, pelo método de difusão em agar, contra cepas de bactérias da microbiota oral, tais como: *Prevotella intermedia* ATCC 25611, *Porphyromonas gingivalis* ATCC 49417, *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586, associadas à doença periodontal e *Streptococcus mutans* ATCC 25175 e *Lactobacillus casei* ATCC 4646 classificadas como bactérias cariogênicas. Os resultados obtidos, demonstraram que o extrato na dose de 20 mg/mL teve uma atividade antimicrobiana significativa contra todas as bactérias testadas, quando comparada com o controle negativo clorexidina (ALVIANO et al, 2008).

A determinação da atividade antimicrobiana dos extratos metanólicos e acetato de etila das folhas, casca do caule, casca da raiz, flor, fruto e semente de *P. pyramidalis*, foi realizada frente a dezessete isolados de *Staphylococcus aureus* multi resistentes, dois isolados de *S. aureus* sensível a meticilina (oxacilina) e duas cepas padrão, pelas técnicas de poço/difusão em agar e determinação das concentração inibitória mínima (CIM) pelo método de diluição em agar/multiinoculador de Stears. O extrato metanólico da casca da raiz indicou uma boa atividade, com CIM inferior a 0,5 mg/mL, enquanto que os extratos acetato de etila apresentaram menor atividade, talvez por problemas de solubilidade e menor difusão no meio de cultura (SARAIVA et al, 2012).

Em outro estudo, o extrato etanólico da entrecasca de *P. Pyramidalis* mostrou atividade anti-*Helicobacter pylori*, com halos de inibição de $12 \pm 1,7$ mm, para uma concentração de 10 µg/mL de amostra. Os valores das concentrações inibitória mínima e a bactericida, foram 625 e 10 µg/mL, respectivamente (RIBEIRO et al, 2013). Também foi testada a atividade do extrato aquoso nas concentrações de 4,40 e 100mg/mL, obtido a partir do infuso das folhas de *P. pyramidalis*, pelo método de difusão em disco, frente à isolados clínicos de *Cryptococcus neoformans*, onde obteve-se boa ação antifúngica, contra 5 das 10 cepas avaliadas (BARBOSA JÚNIOR et al, 2015). Chaves et al. (2016) determinou a CIM do extrato nebulizado das cascas de *P. Pyramidalis* e do marcador químico ácido gálico, na presença e na ausência dos seguintes antibióticos: gentamicina, clorafenicol, ampicilina, norfloxaxino,

nitrofurantoína, ceftriaxona, pelo método de microdiluição em placas de 96 poços, usando caldo Mueller-Hinton. Foram utilizadas cepas padrão e isolados clínicos de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*, sendo que os melhores resultados obtidos com as associações de extrato ou ácido gálico foram observados com gentamicina, onde a CIM foi reduzida em todas as cepas.

3.3.4.3. Atividade Anti-helmíntica

A atividade anti-helmíntica do extrato aquoso das folhas de *P. pyramidalis* foi avaliada em caprinos infectados naturalmente com nematódeos gastrointestinais. O extrato foi administrado em dois grupos de animais, nas doses de 2,5 e 5mg/kg, respectivamente. Amostras de fezes e sangue foram coletados regularmente, para realização da contagem de ovos fecais e determinação dos parâmetros hematológicos e imunológicos, respectivamente, para avaliar a atividade anti-helmíntica do extrato. Foi observado que os animais tratados com os extratos, apresentaram uma redução significativa de 54,6 e 71,2% na quantidade média de ovos nas fezes e houve um aumento da IgA, durante o período experimental, provavelmente em função da administração do extrato (BORGES-DOS-SANTOS et al, 2012). Em outro estudo, testes *in vitro* e *in vivo* foram realizados para avaliar o potencial medicinal do extrato aquoso das folhas da catingueira, contra helmintos de caprinos. Foi verificado que o extrato, na concentração de 100 mg/mL, inibiu 100% da eclosão de ovos de nematódeos, enquanto as larvas infectantes mostraram-se totalmente resistentes (NUNES, 2012).

3.3.4.4. Atividade Gastroprotetora

A atividade gastropotetora do extrato etanólico da entrecasca de *Poincianella pyramidalis* foi avaliada em ratos wistar de ambos os sexos, nas doses de 30, 100 e 300mg/kg, via oral. A ação antiúlcera foi testada, empregando o modelos de úlcera induzida por etanol e anti-inflamatório não esteroide e os resultados demonstraram uma acentuada atividade gastroprotera do extrato etanólico desta planta, corroborando assim com seu uso na medicina popular (RIBEIRO et al, 2013). Um outro estudo com este extrato nas mesmas doses testadas anteriormente, foi realizado com o objetivo de determinar seus possíveis mecanismos de ação contra danos gástricos induzidos por etanol. Observou-se que o extrato produziu resposta gastroprotectora dose-dependente em úlcera induzida por etanol em ratos, por meio de mecanismos que envolvem uma interação com sulfato de hidrogênio endógeno e redução do processo inflamatório com desequilíbrio entre os mediadores pró-inflamatório e anti-inflamatório (DINIZ et al., 2015).

3.3.4.5. Atividade Antioxidante

A atividade antioxidante do extrato aquoso das folhas de *Poincianella pyramidalis* foi determinada pelo método da atividade sequestrante do radical DDPH, com valor de IC₅₀ de 15,2 µg/mL, demonstrando melhor atividade que o antioxidante sintético BHT (IC₅₀=86 µg/mL), utilizado como padrão (ALVIANO et al., 2008). A capacidade antioxidante dos extratos de 14 espécies de plantas endêmicas do semi-árido nordestino do Brasil, foi testada pelo método DDPH, sendo que *P. pyramidalis* apresentou melhor potencial antioxidante (IC₅₀=42,95 ± 1,77 µg/mL), utilizando como controle positivo ácido ascórbico, que mostrou uma IC₅₀ de 21,74 ± 3,23 µg (GOMES de MELO et al., 2010).

Um estudo da atividade antioxidante de extratos brutos obtidos a partir das sementes de espécies vegetais da caatinga foi realizado empregando o sistema modelo do β-caroteno-ácido linoléico, utilizando como padrão, o butilhidroxitolueno (BHT), antioxidante sintético, na concentração de 1 g/100 mL em etanol PA. Os extratos etanólicos de *P. pyramidalis* destacaram-se por apresentar maior atividade antioxidante quando comparados com os das outras espécies estudadas (RÊGO-JÚNIOR et al., 2011).

Silva et al (2011) avaliou o potencial antioxidante dos extratos das cascas e folhas de *Poincianella pyramidalis*, empregando os métodos DDPH e IFC e foi observado que o extrato etanólico das cascas de *P. pyramidalis*, apresentou atividade antioxidante elevada (IC₅₀ = 16,98 ± 1,34µg/mL), quando comparado com ácido ascórbico e rutina (IC₅₀ = 22,96 ± 1,99 e 16,12 ± 0 01 µg/mL, respectivamente).

3.3.5. Toxicidade

O potencial tóxico das plantas devem ser avaliados, antes de serem utilizadas pela população, pois as espécies consideradas tóxicas produzem metabólitos secundários que pela inalação, ingestão ou contato podem causar alterações patológicas em homens e animais e, em alguns casos, pode levar a sérios distúrbios no organismo e até mesmo ao óbito (CAMPOS et al., 2016).

O extrato aquoso das folhas de *P. pyramidalis*, em doses crescentes de 1,0–5,0 g/kg, apresentou baixa toxicidade aguda, quando testado em modelos murinos (CRUZ et al., 2007), por outro lado o extrato etanólico das cascas do caule apresentou alta toxicidade, quando submetido ao bioensaio toxicológico com *Artemia salina* (LUNA et al., 2005).

A letalidade contra *A. salina* foi testada também com as fases hexânica, acetato de etila, metanólica e butanólica do extrato das cascas da raiz de *P. pyramidalis*, sendo a fase hexânica

considerada atóxica e as demais moderadamente tóxicas para as concentrações testadas (OLIVEIRA, 2010).

Alviano et al (2008), determinou a toxicidade aguda do extrato aquoso das folhas desta planta, em roedores, por meio da administração via oral, de doses de extrato (1-5g/kg). O extrato apresentou baixa toxicidade e a DL₅₀ foi de 2g/kg.

A toxicidade aguda do extrato hidroalcólico das cascas de *P. pyramidalis*, foi testada em roedores na dose de 2000 mg/kg e não foi observada toxicidade para o extrato (CHAVES, 2016).

Estudos toxicológicos não-clínicos agudos dos infusos das folhas de *P. pyramidalis* mostraram que 2000 mg/kg em diferentes tamanhos de partícula e seus extratos secos nebulizados nas doses de 500 mg, 1000 mg e 2000 mg/kg quando administrados em dose única em camundongos não causaram toxicidade sistêmica (SALVADOR, 2017).

3.4. EXTRATOS VEGETAIS

Extratos vegetais são preparações líquidas (extratos líquidos e tinturas), semi-sólidas (extratos moles) ou sólidas (extratos secos), obtidos por extração seletiva dos princípios ativos das drogas vegetais, através do uso de diferentes solventes e meios de extração (MARQUES; VIGO, 2009).

A obtenção de extratos é uma etapa importante na descoberta e isolamento de substâncias bioativas, presentes nas matrizes vegetais, bem como para o desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos (SHINOR et al., 2004).

O processo extrativo consiste na retirada de forma mais seletiva e completa possível, das substâncias ou fração ativa contida na droga vegetal, utilizando para isso, um líquido ou mistura de líquidos tecnologicamente apropriados e com baixa toxicidade, empregando métodos de extração que melhor se adequem ao estudo (SONAGLIO et al., 2007).

Diferentes tecnologias de extração são empregadas, dentre as quais podemos destacar: percolação, maceração, turbólise, fluido supercrítico, micro-ondas e ultrassom. As principais características que os métodos extrativos devem possuir são: versatilidade, baixa complexidade e baixo custo, presentes principalmente nos métodos de extração com solvente. (LIST; SCHMIDT, 1984; KWON, 2003).

A maceração é um método de extração muito simples, com custo relativamente baixo, quando comparado com os outros métodos extrativos e bastante utilizado para obtenção de extratos vegetais, ocorre em recipiente fechado, durante um período de tempo e sob agitação

ocasional; pela sua natureza, não conduz ao esgotamento da matéria-prima vegetal, seja devido a saturação do líquido extrator ou ao estabelecimento de um equilíbrio difusional entre o meio extrator e o interior da célula. Existem algumas modificações do método que podem ser realizadas para aumentar sua eficiência, como a utilização de sistemas aquecidos (digestão), de agitação mecânica constante (maceração dinâmica) ou ainda de renovação do solvente extrator (remaceração) (VOIGT, 2000; AZMIR et al., 2013).

Vários fatores podem interferir no processo de extração, dentre os quais podemos destacar o tamanho das partículas da droga pulverizada, polaridade do solvente utilizado na extração, tecnologia de extração empregada, temperatura, tempo de contato do material vegetal com o líquido extrator, quantidade da droga vegetal, dentre outros (MIGLIATO et al., 2011).

A pulverização do material vegetal é uma etapa importante para aumentar a eficiência do processo de extração, pois com a diminuição do tamanho de partículas ocorre um aumento da área superficial, da energia de superfície do material, e da reatividade, permitindo assim uma melhor troca entre massas e outras fases, como os solventes extratores, além de tornar o processo mais rápido, o que é algo vantajoso em escala industrial (LIST; SCHMIDT, 1984).

A polaridade do solvente também exerce influência significativa na extração de substâncias ativas, portanto este deve ser o mais seletivo possível, para que se consiga extrair as substâncias de interesse em quantidades satisfatórias para o estudo químico e/ou biológico. A escolha do solvente também ocorre em função das características dos compostos a serem extraídos, principalmente sua solubilidade (SIVAKUMAR et al, 2007; SZENTMIHALYI et al, 2002).

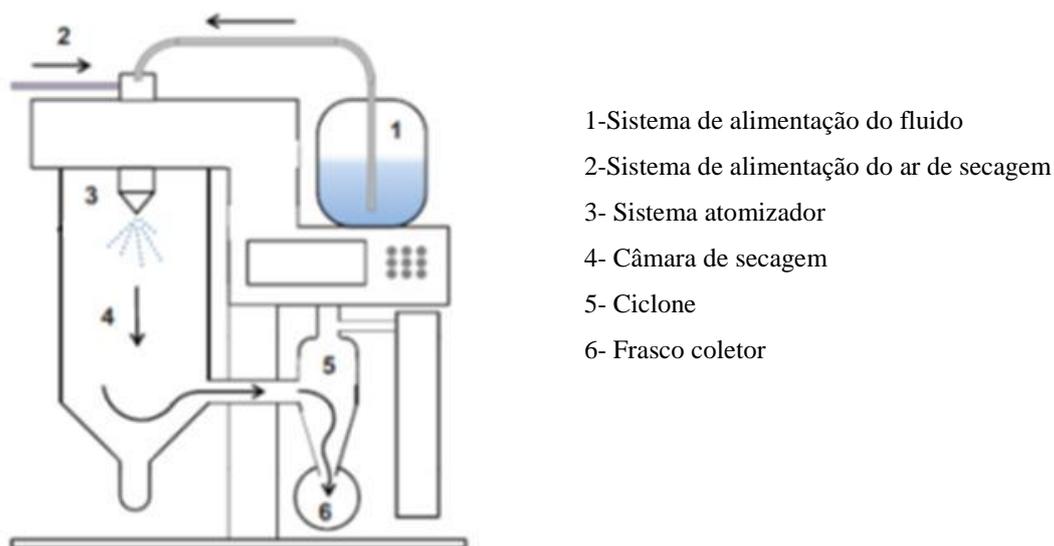
3.5. SECAGEM POR *SPRAY DRYER*

A grande maioria dos fitomedicamentos produzidos no Brasil, apresenta-se na forma farmacêutica sólida, como cápsulas e comprimidos que representam a maioria dos medicamentos disponíveis em todo o mundo e utilizam extratos secos como matéria-prima ativa. A forma sólida apresenta várias vantagens em relação as formas líquidas, que incluem melhor estabilidade química, físico-química e microbiológica, facilidade de padronização, manuseio, transporte e armazenamento, bem como maior concentração dos princípios ativos (LEUENBERGER; LANZ, 2005; OLIVEIRA; PETROVICK, 2010).

Do ponto de vista tecnológico, um dos pontos mais críticos na produção de fitoterápicos é a obtenção de extratos secos padronizados, que apresentem quantidades de substâncias bioativas adequadas, garantindo desta forma, segurança, eficácia e qualidade do produto final.

A secagem por nebulização ou *spray dryer* é uma das técnicas mais comumente empregadas pelas indústrias de fitoterápicos, para obtenção de extratos secos, pois trata-se de um processo de secagem rápido, onde o tamanho de partícula pode ser controlado, apresenta baixo custo de produção e elevado rendimento, além de oferecer um baixo risco de degradação química do material vegetal durante a operação, pois o contato do líquido disperso com a fonte de calor é muito curto, quando comparada a outras técnicas de secagem que utilizam temperaturas elevadas (SILVA et al., 2006; GEORGETTI et al., 2008). Devido à sua extraordinária flexibilidade operacional, a secagem por pulverização oferece um controle muito preciso sobre as propriedades dos particulados obtidos no processo, tais como, estabilidade físico-química, solubilidade e morfologia (CHAUL., et al 2017).

O processo de secagem por nebulização é realizado em um equipamento conhecido como *spray dryer* (figura 6), cujo processo operacional consiste na transformação de um material líquido que contém sólidos em solução, suspensão ou emulsão em um produto seco e particulado. Esta técnica divide-se em três etapas principais: na primeira etapa, o fluido é bombeado, geralmente por uma bomba peristáltica até o atomizador, onde o líquido é transformado em pequenas gotículas com grande área superficial; na segunda etapa as gotículas entram em contato com o gás de secagem, em geral ar atmosférico filtrado, aquecido a uma temperatura elevada, ocorrendo assim a transferência de calor entre as gotículas e o ar de secagem; e na terceira etapa ocorre a evaporação do solvente e a formação da partícula sólida, em um compartimento conhecido como ciclone, o particulado é então transportado por uma corrente de ar até o recipiente coletor (BORH et al., 2014).

Figura 6 - Esquema geral do equipamento de Spray- Dryer e do fluxo do ar de secagem.

Fonte: Adaptado de BORH et al. (2014)

As propriedades físico-químicas dos pós obtidos pelo processo de secagem por pulverização podem ser afetadas de forma significativa pelas variáveis operacionais, tais como: temperaturas de entrada e saída, taxa de fluxo de alimentação do fluido, concentração e tipo de adjuvantes tecnológicos, diâmetro do bico aspersor, vazão do ar comprimido, quantidade de resíduo seco do extrato fluido a ser nebulizado, sendo assim a otimização destes parâmetros é indispensável para obtenção de extratos secos com melhores propriedades físico-químicas e com maior rendimento (VASCONCELOS et al., 2005; CAL; SOLLOHUB, 2010).

Na indústria farmacêutica, a seleção e o uso adequado de adjuvantes no processo de de secagem de extratos de plantas é uma etapa de fundamental importância, visto que estes aumentam a temperatura de transição vítrea do material a ser desidratado, promovendo assim uma redução na tendência de aglomeração do produto tornando-o mais estável e com melhores propriedades reológicas (OLIVEIRA; PETROVICK, 2010). Sendo assim vários adjuvantes tecnológicos, incluindo amido modificado, ciclodextrinas, dióxido de silício coloidal, gelatina, goma arábica, lactose, maltodextrina entre outros, são adicionados as soluções extrativas antes da secagem por pulverização, para melhorar o desempenho do processo e a qualidade do produto final (SILVA JÚNIOR et al., 2006; DE OLIVEIRA et al, 2012).

O dióxido de silício coloidal, é um dos adjuvantes de secagem mais comumente adicionados as soluções extrativas de diferentes espécies vegetais, antes do início do processo de secagem por *spray dryer*, devido principalmente ao fato deste, apresentar elevada área de

superfície específica, alto poder sorvente, inércia química, inocuidade, estabilidade térmica, características estas que conferem aos pós obtidos, excelentes propriedades reológicas, baixa umidade e higroscopicidade (OLIVEIRA; PETROVICK, 2010).

Na literatura são descritos vários trabalhos abordando a secagem de extratos vegetais pela técnica de *spray dryer*, com o emprego de dióxido de silício coloidal como adjuvante de secagem (VASCONCELOS et al., 2005; GEORGETTI et al., 2008; GALO et al., 2011; BACCARIN et al., 2016; PINTO et al., 2017).

Diversos trabalhos tem sido publicados, abordando o emprego da tecnologia por *spray dryer* para secagem de extratos vegetais e a influência dos parâmetros do processo nas características físico-químicas dos nebulizados obtidos. A influência da taxa de alimentação do extrato, da temperatura de entrada do ar de secagem e da taxa do fluxo de ar no bico de nebulização sobre os teores de polifenóis totais, taninos totais, flavonoides totais e ácido rosmarínico do extrato hidroalcólico das folhas de *Rosmarinus officinalis L.*, seco por *spray dryer*, foi avaliada e os resultados obtidos demonstraram que todos os parâmetros estudados exerceram influência significativa na quantificação dos marcadores estudados e as melhores condições encontradas foram, taxa de alimentação do extrato de 6mL/min, temperatura de entrada de ar de 140°C e fluxo de ar de 50L/min no bico de nebulização (COUTO et al., 2012).

O extrato aquoso de sementes de *Syzygium cumini* (L.) Skeels, obtido por maceração dinâmica, rico em compostos polifenólicos, foi seco em *spray dryer*, utilizando os seguintes parâmetros de secagem: 130 e 60°C de temperatura de entrada e saída, respectivamente e fluxo de alimentação de 5mL/min. Dióxido de silício coloidal e amido, foram empregados como adjuvantes de secagem. O pó obtido apresentou boa fluidez, compactabilidade e baixa higroscopicidade (PEIXOTO; FREITAS, 2013).

Daza et al. (2016) avaliou o efeito de diferentes condições de secagem nas propriedades físicas do extrato seco dos frutos de *Eugenia dysenterica* DC, obtido por *spray dryer*. Para tanto foram testadas diferentes temperaturas de entrada (120, 140 e 160°C) e concentrações dos agentes carreadores inulina e goma arábica (10, 20 e 30%). As amostras foram avaliadas quanto ao teor de umidade, atividade de água, higroscopicidade, solubilidade, temperatura de transição vítrea, cor e morfologia de partícula. Foi observado um melhor rendimento quando foi utilizado goma arábica como agente carreador. O processo aumentou a solubilidade e reduziu a higroscopicidade das amostras testadas. A temperatura de transição vítrea foi mais afetada pela temperatura, no caso de amostras com goma arábica, por outro lado a concentração do agente carreador foi o parâmetro que mais influenciou as amostras com

inulina. Enquanto que a morfologia das partículas foram afetadas tanto pela concentração dos carreadores quanto pela temperatura.

3.6. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

O planejamento experimental, também denominado de delineamento experimental, é uma ferramenta valiosa para se estudar o efeito simultâneo de vários fatores sobre uma variável resposta de interesse. É bastante utilizado na otimização de produtos e processos, com o objetivo de minimizar custos e tempo, bem como maximizar o rendimento, produtividade e qualidade de produtos (SCHWAAB; PINTO, 2011; RODRIGUES; IEMMA, 2005).

O uso de planejamentos experimentais vem sendo uma prática muito comum nas indústrias farmacêuticas e além de serem empregados para otimizar e reduzir as variabilidades dos processos também são importantes para o conhecimento dos mesmos e de seus pontos críticos (SILVA; SANT'ANNA, 2007).

Dentre os diversos tipos de delineamento experimental, os sistemas de planejamento fatorial é o que recebe maior destaque, pois permite avaliar simultaneamente o efeito de um grande número de variáveis, a partir de um número reduzido de ensaios experimentais, quando comparados aos processos univariados e por esta razão tem sido muito aplicado em pesquisas básicas e tecnológicas (PERALTA-ZAMORA; MORAIS ; NAGATA., 2005).

O planejamento fatorial normalmente é representado por Z^x , onde “x” representa o número de fatores e “Z” o número de níveis escolhidos. O tipo considerado mais simples é aquele em que cada fator x está presente em apenas dois níveis, sendo assim denominado de planejamento fatorial do tipo 2^x . Neste tipo de planejamento é comum codificá-lo por meio do emprego dos sinais (+) e (-), sendo a atribuição dos níveis inferiores ou superiores realizada de forma aleatória, sem causar interferência na realização dos experimentos nem tão pouco na interpretação dos resultados (CUNICO et al., 2008).

O principal objetivo do planejamento fatorial é relacionar empiricamente as variáveis de resposta com as variáveis de entrada, sendo possível determinar estatisticamente o efeito de cada variável na(s) resposta(s) desejadas. A função que descreve a influência dos fatores na resposta é denominada de superfície resposta. Com a finalidade de se encontrar uma região ótima na superfície investigada podem ser empregadas diversas técnicas de estatística multivariada, dentre as quais podemos destacar a metodologia de superfície resposta (MSR) (BARROS; NETO, 1996; BEZERRA et al., 2008) .

A metodologia de superfície resposta (MSR) compreende um grupo de técnicas estatísticas para explorar e construir modelos matemáticos, muito utilizada para planejar experimentos de natureza complexa, que envolvem múltiplas variáveis de processo. Esta ferramenta tem auxiliado muitos pesquisadores na construção de modelos que avaliam vários fatores, permitindo assim alcançar melhores condições para as respostas desejadas, em um menor espaço de tempo, devido a redução do número de experimentos a serem realizados (KHURI, A. I; MUKHOPADHYAY, 2010; MUTHUKUMAR; MOHAN; RAJENDRAN., 2003)

Este método tem demonstrado ser uma ferramenta poderosa quando se faz necessário determinar os efeitos individuais de cada fator e as interações entre eles, permitindo assim que a otimização do processo seja conduzida efetivamente. Seu principal objetivo é portanto encontrar condições ótimas ou melhorar as condições já empregadas, detectar problemas no processo e melhorar sua robustez em relação as influências externas ou não controláveis (BAS; BOYACI, 2007).

A MSR pode ser aplicada a qualquer sistema com critério de eficácia mensurável em escala contínua (tempo de extração) ou que permita a quantificação de variáveis independentes (controláveis e incontroláveis) que afetam o desempenho do sistema, tais como: processo de extração, solvente e método de secagem (POWERS, 1989).

Vários trabalhos tem sido descritos na literatura, empregando a metodologia de superfície resposta, como ferramenta estatística para planejar experimentos e avaliar resultados, no processo de secagem por *spray dryer* de matérias-primas vegetais (PEIXOTO; FREITAS, 2013; CHONG, et al, 2014; PATIL; CHAUHAN; SINGH, 2014; THIRUGNANASAMBANDHAM; SIVAKUMAR, 2015; KRISHNAIAH et al, 2015; BAZARIA; KUMAR, 2016; CHAUL, et al., 2017).

3.7. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Várias técnicas analíticas tem sido descritas na literatura para identificação e quantificação de marcadores fitoquímicos, dentre as quais podemos destacar a cromatografia líquida de alta eficiência (FUCINA et al, 2012; GESSER CESCA, 2012; OLIVEIRA^a; OLIVEIRA^b, 2013; LANDIM et al, 2013; KAEFER et al., 2015; COSTA et al., 2015; ALMEIDA et al., 2016; DEVALIYA; SHIRSAT, 2017). Devido a sua facilidade de efetuar a separação, identificação e quantificação de uma grande quantidade de compostos, presentes em vários tipos de amostras, em escala de tempo de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e sensibilidade (MOLDOVEANU; DAVID, 2012).

3.8. VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA

A Organização Mundial da Saúde define validação como um procedimento analítico para demonstrar que está sob as condições nas quais deve ser aplicado (WHO, 1992)

A validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Os parâmetros normalmente avaliados nos programas de validação de metodologia analítica são: exatidão (acuracidade), precisão, especificidade, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, robustez e teste de conformidade do sistema, além da seletividade e a sensibilidade do método (BRASIL, 2003).

No Brasil a validação de métodos analíticos é regulada pela ANVISA, por meio da Resolução RE nº 899, de 29/05/2003, revogada recentemente pela RDC Nº 166, de 24 de julho de 2017, que entrará em vigor a partir de janeiro de 2018 (BRASIL, 2003; BRASIL, 2017).

A determinação de métodos analíticos depende, inicialmente, da escolha dos biomarcadores, que são substâncias ou grupo de substâncias, preferencialmente os responsáveis pela ação farmacológica em estudo, que estejam presentes tanto na matéria-prima, como nos produtos intermediários e no medicamento fitoterápico (BASSANI; GONZALES; PETROVICK, 2005).

Embora as matrizes vegetais apresentem perfis fitoquímicos complexos se faz necessário estabelecer critérios de qualidade deste material, para garantir a eficácia e segurança do produto final, sendo assim é de fundamental importância o emprego de metodologias analíticas validadas, para serem utilizadas tanto no controle de qualidade da matéria-prima vegetal, quanto nos produtos tecnológicos intermediários e final (GOVINDARAGHAVAN; SUCHER, 2015; SOUZA, 2004).

3.9. ESTUDO DE ESTABILIDADE

Estabilidade é definida como sendo a capacidade de uma substância medicamentosa ou produto farmacêutico permanecer dentro das especificações estabelecidas, mantendo sua identidade, teor, qualidade e pureza ao longo do prazo de validade estimado (RANGARI, 2008).

No Brasil, os testes de estabilidade de produtos farmacêuticos, para fins de determinação de prazo de validade, devem seguir as diretrizes estabelecidas no guia de estudo de estabilidade publicado pela ANVISA (Brasil, 2005).

A realização de estudos de estabilidade de produtos à base de plantas é uma tarefa difícil, pois apresentam uma mistura complexa de componentes ativos com diferentes características físico-químicas. No entanto são de fundamental importância para assegurar a qualidade, segurança e eficácia do produto final, pois durante o processo de extração do material vegetal e de fabricação do medicamento fitoterápico, os componentes ativos podem sofrer alterações físicas e químicas, provenientes de fatores tais como: temperatura, luz, ar (especificamente oxigênio, dióxido de carbono e vapores de água) e umidade, tamanho de partícula, pH, natureza do recipiente de armazenamento, dentre outros, que podem influenciar na estabilidade (GAFNER; BERGERON, 2005; RANGARI, 2008; SACHAN; KUMAR, 2015). A adição de excipientes para melhorar as propriedades tecnológicas dos medicamentos fitoterápicos também pode impactar na estabilidade dos mesmos (JIANG et al, 2008).

Na literatura científica não são encontrados muitos estudos de estabilidade de extratos vegetais e menos ainda entre extrato-excipiente, onde pode-se avaliar melhor como os excipientes podem afetar a estabilidade dos compostos bioativos, bem como reduzir o tempo de meia-vida do produto final.

A estabilidade de antocianinas, presentes no pó do suco de açaí, obtido por *spray dryer*, usando quatro tipos de agentes carreadores: maltodextrina 10DE, maltodextrina 20DE, goma arábica e amido de milho, foi avaliada. As amostras foram armazenadas nas temperaturas de 25 e 35°C por um período de 120 dias. Foi observado que as antocianinas exibiram duas cinéticas de primeira ordem, sendo uma com maior taxa de degradação, no período de 45-60 dias de armazenamento e a outra com uma menor taxa de degradação, após este período (TONON; BRABET; HUBINGER, 2010).

Cortes-Rojas, Souza e Oliveira (2014), realizaram um estudo de estabilidade de preparações fitofarmacêuticas com extratos secos por *spray dryer* de *Bidens pilosa* L., em diferentes condições de armazenamento, em recipientes abertos e sachês selados, por um período de 12 meses. Foi verificado que as concentrações dos biomarcadores rutina, hiperosídeo e poliacetileno diminuiu drasticamente nas amostras armazenadas em recipientes abertos, porém não apresentaram mudanças significativas em baixas temperaturas.

MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. DROGA VEGETAL

O material vegetal (folhas frescas de indivíduos adultos) de *Poincianella pyramidalis* foram coletadas em maio de 2015, no município de Serra Branca, localizado no estado da Paraíba (7°30'51.1"S 36°41'91.5"O). Um espécime foi identificado pela Professora Alecksandra Vieira de Lacerda da Universidade Federal de Campina Grande e uma exsicata está depositada no herbário Lauro Pires Xavier da Universidade Federal da Paraíba, Brazil, sob número NC36. O projeto de pesquisa recebeu Autorização do Ministério do Meio Ambiente do Brasil (ICMBio\SISBio\MMA-Brasil) para atividades científicas, sob nº registro 41277-2. O material vegetal foi seco em estufa com ar circulante, sob temperatura de 40°C ± 2°C, por um período de 72 horas e triturado em moinho mecânico, em seguida o pó obtido foi armazenado ao abrigo da luz e da umidade.

4.2. SOLVENTES E PADRÕES ANALÍTICOS

Foram utilizados os solventes metanol grau HPLC (Sigma Aldrich[®], Brazil), ácido ortofosfórico (Merk[®], Germany) e água ultrapurificada, hexano PA ACS (Vetec[®], Brazil), etanol 96% (Toscano[®], Brazil) e diclorometano grau HPLC (Vetec[®], Brazil). As substâncias químicas canferol (97% pureza) e quercetina (98% pureza), ambas da Sigma Aldrich[®] Brazil, foram empregadas como padrões analíticos.

4.3. EQUIPAMENTOS/INSTRUMENTOS

Todos os equipamentos utilizados na realização dos experimentos estão descritos na tabela 1.

Tabela 1 - Lista de equipamentos utilizados nos experimentos.

Equipamento	Marca	Modelo
Agitador de tubos	Phoenix [®]	AP 56
Balaça Analítica	Shimadzu [®]	AW 220
Centrífuga	Centribio	-
Conjunto de Tamis	Bertel	01/02
Conjunto de Filtração	-	-
Cromatógrafo Líquido	Shimadzu [®]	Proeminence
Estufa com ar circulante	Tecnal [®]	TE -394-4
Incubadora B.O.D	Tecnal [®]	TE -371
Moinho Mecânico	-	-
<i>Spray dryer</i>	LabPlant [®]	SD 05

4.4. DETERMINAÇÃO DA GRANULOMETRIA DOS PÓS

A granulometria dos pós foi determinada com o auxílio de um conjunto de tamises, operado por dispositivo mecânico, com tamanhos de malhas descritos na tabela 2.

Inicialmente foi determinado e registrado o peso de cada tamis a ser utilizado no ensaio. Em seguida foram pesadas em balança analítica, amostras contendo 100, 200 e 250g do pó das folhas. Cada quantidade de pó foi submetida ao processo de tamisação durante os tempos de 20 e 30 minutos. Após o término do processo, foi removida toda amostra retida na superfície superior de cada malha, com auxílio de um pincel adequado. Posteriormente pesou-se o pó retido na superfície superior de cada malha e no coletor. Calculou-se o percentual retido em cada tamis, utilizando-se o cálculo abaixo:

$$\text{Equação 1: \% Retido pelo tamis} = \frac{P1}{P2} \times 100$$

Onde:

P1: peso da amostra retida em cada tamis (em gramas);

P2: soma dos pesos retidos em cada tamis e no coletor (em gramas);

100: fator de porcentagem.

Tabela 2 - Tamanhos das aberturas das malhas dos tamises.

Tamanho de partículas	
Mesh	Mm
>16	>1190
16 – 20	1189-841
20 – 30	840-595
30 – 40	594-420
40 – 50	419-297
50 – 60	296-250
60 – 100	249-149
100 – 200	148 -74

De acordo com a Farmacopéia Brasileira (2010) os pós são classificados em:

Pó grosso- as partículas passam em sua totalidade pelo tamis com abertura nominal de malha de 1,70 mm e, no máximo, 40% pelo tamis com abertura nominal de malha de 355 μm .

Pó moderadamente grosso- partículas passam em sua totalidade pelo tamis com abertura nominal de malha de 710 μm e, no máximo, 40% pelo tamis com abertura nominal de malha de 250 μm .

Pó semifino- as partículas passam em sua totalidade pelo tamis de abertura nominal de malha de 355 μm e, no máximo, 40% pelo tamis com abertura nominal de malha de 180 μm .

Pó fino- as partículas passam em sua totalidade pelo tamis com abertura nominal de malha de 180 μm .

Pó finíssimo- partículas passam em sua totalidade pelo tamis com abertura nominal de malha de 125 μm .

Foram pesadas diferentes massas de pó para serem tamizadas em diferentes intervalos de tempo, com o objetivo de verificar a influência da massa e do tempo de vibração sobre a granulometria das partículas.

Cada ensaio foi realizado em duplicata e os valores apresentados e utilizados nos cálculos referem-se às médias obtidas.

4.5. OBTENÇÃO DO EXTRATO FLUIDO DO PÓ DAS FOLHAS DE *P. PYRAMIDALIS*.

A tecnologia de extração empregada para obtenção do extrato fluido foi maceração à frio, realizada em recipientes cilíndricos de aço inox devidamente fechados, por um período

de 120 horas, empregando como líquido extrator uma solução hidroalcoólica (50:50 v/v). A proporção de pó em relação à quantidade do sistema de solventes foi de 20% (m/v).

Antes da obtenção do extrato fluido foi realizada a escolha do melhor sistema de solventes, para tanto foram testadas misturas de etanol: água, nas proporções (30:70; 50:50 e 70:30 v/v). A melhor condição de extração foi determinada em função da concentração dos biomarcadores canferol e quercetina.

Após escolha do melhor sistema de solventes, realizou-se uma análise do processo de extração em função da granulometria dos pós, com tamanhos de partículas previamente estabelecidos de 355, 250, 149 e 74 µm. Cada análise foi realizada em triplicata obtendo-se ao final o valor médio.

A quantificação dos marcadores foi realizada empregando-se Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), conforme descrito nos itens 4.7. e 4.8.1.

4.6. DETERMINAÇÃO DO RESÍDUO SECO

A determinação do resíduo seco foi realizada de acordo com a Farmacopéia Brasileira (2010), para tanto foi transferido 2mL do extrato fluido para placa de Petri, o solvente foi evaporado até *secura*, em banho-maria à 50 °C. Em seguida as amostras foram dessecadas em estufa a 105 °C, por 3 horas. Os resultados foram expressos em porcentagem sobre o valor médio do volume de três determinações, de acordo com a equação abaixo:

$$\text{Equação 2: \% Resíduo seco} = \frac{100 \times N}{A}$$

Onde:

N : massa em gramas do resíduo seco

A : volume da amostra em mL

4.7. QUANTIFICAÇÃO DOS BIOMARCADORES POR CLAE

A quantificação dos biomarcadores canferol e quercetina, foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando para tanto um cromatógrafo líquido Proeminence series (Shymadzu, Toquio, Japão), equipado com sistema de fornecimento multissolvente LC-20AT, sistema de degaseificação DGU-20A5, autoinjeter SIL-20A, forno para coluna CTO-20A e detector por espectrometria eletrônica na região do ultravioleta-

visível com arranjo de diodo SPD-M20A UV-vis, em $\lambda = 370\text{nm}$. A fase móvel utilizada foi uma mistura de metanol:ácido fosfórico 1% (47:53 v/v) em sistema isocrático e pH= 3,1, volume de injeção de 20 μL e fluxo de injeção de 1,2 mL/min. Como fase estacionária foi empregada uma coluna C18 (Phenomenex[®]), 4,6 x 250 mm x 5 μm . A temperatura do forno da coluna foi ajustada para 40°C.

A aquisição e análise dos dados foi realizada com o auxílio do software Lab Solution[®].

A concentração dos biomarcadores nas soluções amostra foi determinada de acordo com a equação abaixo:

$$\text{Equação 3: } Ca = Cp \times Fa \times Aa/Ap$$

Onde:

Ca: concentração dos analitos canferol ou quercetina ($\mu\text{g/ mL}$) nas soluções amostra;

Aa: area do pico cromatográfico do marcador;

Ap: area do pico do padrão de canferol ou quercetina;

Cp: concentração dos padrões de canferol ou quercetina ($\mu\text{g/ mL}$)

Fa: fator de análise

O fator de análise (Fa) é calculado de acordo com a equação 4:

$$\text{Equação 4: } Fa = Ta \div \{[(Ta \div Fec) \times Fevap] \div Vrec\} \quad (11)$$

Onde:

Ta é a tomada da amostra do extrato fluido,

Fevap é a alíquota da fração orgânica

Fec é a fração da extração contínua obtidas nas 3 bateladas

Vrec é o volume de reconstituição na fase móvel.

4.8. PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES AMOSTRA

4.8.1. Preparação das amostras de extrato fluido.

4.8.1.1. Pré- tratamento das amostras

Inicialmente foi realizado o pré-tratamento das amostras, para eliminar possíveis interferentes, adicionando-se 2 mL de hexano em 1 mL do extrato hidroalcolico, em tubo de ensaio com tampa rosca. O tubo de ensaio devidamente fechado foi submetido à agitação por 1 minuto em agitador de tubos e em seguida por 10 minutos em centrífuga. Após o término do tempo de centrifugação, a fase hexânica foi descartada e a fase hidroalcolica foi reservada.

4.8.1.2. Extração dos biomarcadores

Com o auxílio de uma pipeta automática, retirou-se uma alíquota de 500 µL da fase hidroalcolica e transferiu para tubo de ensaio com tampa, onde foi acrescentado 3 mL de diclorometano, para realização da extração dos flavonoides de interesse, com posterior agitação em vórtex por 1 min e 10 min em centrífuga. A fração diclorometânica foi retirada com auxílio de uma pipeta de Pasteur e reservada em tubo de ensaio. A extração com diclorometano foi realizada por 03 vezes, obtendo-se ao final 9 mL da fração diclorometânica.

4 mL da fase diclorometânica foram retirados e submetidos à secagem em banho-maria à temperatura de 50°C. O resíduo seco obtido foi reconstituído com 2mL de metanol e filtrado através de membrana PTFE de 0,45µm (Anow[®], USA).

4.8.2. Preparação das soluções amostra de extrato seco

Foram pesadas exatamente 300 mg de amostra de extrato seco em balança analítica, transferida para tubo de ensaio, onde foi adicionado 5mL de uma solução hidroalcolica (50:50), em seguida a amostra foi agitada em vórtex durante 1 minuto e em centrífuga por 10 minutos. Uma alíquota de 1mL da amostra foi retirada e submetida ao mesmo procedimento descrito para preparação da amostra de extrato fluido (itens 4.8.1.1 e 4.8.1.2).

4.8.3. Preparação das soluções amostra dos pré-formulados

Foram pesadas exatamente 600 mg das amostras de pré-formulados, em balança analítica e seguiu-se a mesma metodologia de preparação da amostra de extrato seco (item 4.8.2.).

4.9. PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES PADRÃO

Foi preparada uma solução padrão de 4 µg/mL dos padrões canferol e quercetina em metanol:água (70:30 v/v).

4.10. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DOS BIOMARCADORES CANFEROL E QUERCETINA NAS AMOSTRAS DE EXTRATOS FLUIDO E SECO DE *P. PYRAMIDALIS*.

O método analítico foi validado de acordo com as diretrizes da resolução RE 899 de 29 de maio de 2003-“Guia de validação de métodos analíticos e bioanalíticos” e os parâmetros analíticos avaliados foram: especificidade, seletividade, linearidade, limite de quantificação e detecção, precisão, exatidão, robustez e estabilidade.

4.10.1. Especificidade e Seletividade

Para demonstrar a especificidade e seletividade do método foram realizadas corridas cromatográficas, em triplicata com as amostras dos extratos fluido e seco de *P. pyramidalis*, soluções padrão de canferol e quercetina e do branco da fase móvel. A especificidade do método foi avaliada pela análise do tempo de retenção dos marcadores e pela comparação dos perfis cromatográficos entre as substâncias padrão e amostra.

A seletividade do método foi determinada pela avaliação dos perfis cromatográficos de amostras do extratos fluido e seco, substâncias padrão e fase móvel, na faixa do espectro do ultravioleta compreendida entre 200 e 500 nm em um intervalo de 20 nm.

4.10.2. Linearidade

A linearidade foi determinada pela construção de três curvas de calibração com oito pontos cada, para tanto foi preparada uma solução estoque na concentração de 100 µg/ mL dos padrões analíticos canferol e quercetina, em solução de metanol: água (70:30 v/v) e em seguida diluída para as seguintes concentrações: 0,4; 0,6; 1,6; 2,8; 4,0; 5,2; 6,4 e 7,6 µg/mL. As soluções padrão foram preparadas em triplicata.

As curvas de calibração foram obtidas pela construção de gráficos de concentração versus área absoluta. A equação da reta e o coeficiente de correlação (r) foram determinados

pela análise da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA).

4.10.3. Limite de quantificação e Limite de detecção

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram determinados de acordo com as equações (5) e (6), respectivamente.

$$\text{Equação 5: } LD = \frac{DPa \times 3}{IC}$$

$$\text{Equação 6: } LQ = \frac{DPa \times 10}{IC}$$

Onde:

DPa: desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do fármaco próximas ao suposto limite de quantificação. Este desvio padrão pode ainda ser obtido a partir da curva de calibração proveniente da análise de um número apropriado de amostras do branco;

IC: inclinação da curva de calibração.

4.10.4. Precisão

A precisão do método foi avaliada levando-se em consideração a repetibilidade (precisão intracorrída) e a precisão intermediária (intercorrída). A repetibilidade foi determinada pela injeção de 6 amostras da solução padrão de canferol e quercetina contendo o equivalente a 100% da curva padrão de linearidade (0,4 µg/mL), no mesmo dia e nas mesmas condições cromatográficas. No caso da precisão intermediária foram preparadas 06 amostras, na mesma concentração das amostras da repetibilidade, avaliadas em 3 dias diferentes, por analistas diferentes.

Tanto os resultados da precisão intracorrída quanto intercorrída foram expressos como média e desvio padrão relativo.

O critério de aceitação para este parâmetro foi um desvio padrão relativo de 5%.

Todos os valores obtidos foram submetidos a análise de variância (ANOVA), para determinar o nível de diferença significativa entre os mesmos.

4.10.5. Exatidão

A exatidão do método foi determinada a partir da recuperação dos padrões canferol, e quercetina após adição de quantidades conhecidas nas soluções amostra, em três níveis (baixo, médio e alto) com valores correspondentes a 20%, 100 e 180% da concentração obtida na precisão. As amostras foram preparadas em triplicata e as injeções foram realizadas em duplicata para cada nível de recuperação. A taxa de recuperação foi calculada de acordo com a equação abaixo:

$$\text{Equação 7: Rec X \%} = \frac{[Y]}{[Z + W]} \times 100$$

Onde:

X: nível de recuperação

Y: concentração recuperada de canferol no extrato hidroalcolico

Z: concentração inicial de canferol no extrato hidroalcolico, e

W: concentração de padrão adicionado

4.10.6. Robustez

A robustez do método foi avaliada por meio de pequenas e deliberadas modificações nas condições cromatográficas, tais como variação do fluxo da fase móvel de $\pm 0,1$ mL, pH da fase móvel variando $\pm 0,1$ e temperatura da coluna com uma variação de ± 2 °C. Foram monitorados, tempo de retenção, área do pico cromatográfico e perfil espectral das amostras. A quantificação dos marcadores nas amostras de extrato fluido de *P. pyramidalis* foi determinada com os padrões canferol e quercetina nas mesmas condições de análise dos parâmetros de robustez.

4.10.7. Estabilidade das soluções amostra e padrão

A avaliação da estabilidade química da solução padrão estoque e das amostras de extrato fluido foi analisada nos tempos zero e 24 horas, após armazenamento sob temperatura ambiente. A estabilidade das amostras foi avaliada por meio da análise das áreas dos picos, tempo de retenção e perfil espectral dos marcadores avaliados.

4.11. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS SECOS POR *SPRAY DRYER*

Os extratos secos foram obtidos por nebulização em *Mini Spray Dryer*, LabPlant, modelo SD-05, com bico atomizador duplo fluido pneumático com orifício de 1.2 mm que operou com taxa de vazão de ar 40 L/min e pressão de 2,0 bar. Os parâmetros de operação do processo foram os seguintes: temperatura de entrada de ar (160, 170 e 180°C), taxa de fluxo de alimentação (4, 6 e 8 mL/min) e proporção do adjuvante de secagem dióxido de silício coloidal (10, 15 e 20%). As amostras do produto tecnológico foram armazenadas em temperatura ambiente entre 15 e 30°C, devidamente protegidas da luz e da umidade em frascos hermeticamente fechados.

4.12. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Um planejamento fatorial fracionário 2^{3}_{+1} , associado à metodologia de superfície resposta foi aplicado para avaliar e otimizar os efeitos dos parâmetros do processo de secagem sobre os teores dos marcadores químicos, canferol e quercetina. Para tanto foram investigados os efeitos individuais e interativos das seguintes variáveis independentes: temperatura de entrada do ar de secagem (X_1), taxa de fluxo de alimentação da composição de secagem (X_2) e proporção de dióxido de silício coloidal na composição de secagem (X_3). A matriz do planejamento está demonstrada na tabela 3.

Tabela 3 – Matriz do planejamento fatorial 2^{3}_{+1} para secagem por *spray dryer*.

Experimentos	X_1 (T)	X_2 (F)	X_3 (DSC)	T (°C)	F(mL/min)	DSC (%)
1	-1	-1	-1	160	4	10
2	-1	1	-1	160	4	10
3	-1	-1	1	180	8	20
4	-1	1	1	180	8	20
5	1	-1	-1	180	4	10
6	1	1	-1	160	4	10
7	1	-1	1	180	8	20
8	1	1	1	180	8	20
9	0	0	0	170	6	15

*n=3; T= temperatura de entrada do ar de secagem; F= taxa de fluxo de alimentação da composição de secagem; DSC%= proporção de dióxido de silício coloidal na composição de secagem

4.13. RENDIMENTO DO PROCESSO DE SECAGEM.

O rendimento do processo de secagem foi calculado após a secagem do extrato. O produto final foi pesado e teve sua massa calculada percentualmente em relação ao teor de sólidos presentes nas soluções extrativas de acordo com a equação abaixo:

$$\text{Equação 8: Rendimento (\%)} = \frac{m1(\text{g})}{m2(\text{g})} \times 100$$

Onde:

m1: massa do extrato seco obtida

m2: massa teórica de extrato seco (resíduo do extrato com a massa do adjuvante adicionado)

4.14. PREPARAÇÃO DOS PRÉ-FORMULADOS

Os pré-formulados foram preparados em 3 grupos diferentes, em triplicata para cada um deles, por meio de misturas binárias entre o extrato seco e os seguintes excipientes farmacêuticos: amido (AM), celulose microcristalina 102 (MC), maltodextrina (MD) e lactose (LC) na proporção 1:1. O pó das misturas foram calibrados em tamis de malha 45 mesh (353µm) e misturados mecanicamente por 15 minutos.

4.15. ESTUDO DE ESTABILIDADE ACELERADA

O estudo de estabilidade dos pré-formulados foi realizado em incubadora B.O.D, com controle de temperatura, por um período de 180 dias sob temperatura de $40 \pm 2^\circ\text{C}$. 3g de amostra foi pesada e colocada em sachês (PVC-Alumínio), em triplicata para cada pré-formulado. O teor dos biomarcadores canferol e quercetina foi monitorado ao longo do estudo (0, 90 e 180 dias) por CLAE.

4.16. DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS

Os parâmetros cinéticos, ordem de reação (n) e constante de decomposição (k) foram obtidos pela equação de Arrhenius:

Equação 9: $k = A \cdot \exp(-E_0/R.T)$

Onde:

A : fator pré-exponencial

R : constante ideal dos gases (8,314J/mol.K)

T : temperatura absoluta

E_0 : energia de ativação (J/mol)

Os modelos cinéticos de degradação dos biomarcadores canferol e quercetina foram definidos como de ordem-zero e de segunda ordem, de acordo com as equações (10 e 11), respectivamente.

Para as reações de ordem-zero, a constante k foi obtida diretamente dos valores de massa em função do tempo de armazenamento, de acordo com a equação abaixo:

Equação 10: $m = m_0 - k t$

Onde:

m_0 : massa inicial do biomarcador

m : massa no tempo (t) e

k_0 : constante de ordem-zero

Para as reações de segunda ordem o inverso da massa é plotado em função da temperatura, de acordo com a seguinte equação:

Equação 11: $\frac{1}{m} = \frac{1}{m_0} + k t$

Onde:

m_0 : massa inicial do biomarcador

m : massa no tempo (t)

k_2 : constante de segunda ordem.

4.17. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados experimentais foram analisados com o auxílio dos softwares STATISTICA[®], versão 13.1 (Dell Inc., Tulsa, USA) e PRISM[®], versão 6.01.

Os resultados foram expressos como média \pm DP e coeficiente de variação. As médias foram comparadas usando ANOVA e regressão múltipla associada à metodologia de superfície de resposta (MSR). As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes para $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. DISTRIBUIÇÃO GRANULOMÉTRICA DO PÓ DAS FOLHAS DE *P. PYRAMIDALIS*.

O grau de divisão dos pós provenientes de material vegetal é um parâmetro relevante e que deve ser avaliado, visto que o tamanho das partículas pode influenciar diretamente na eficiência do processo extrativo (MIGLIATO et al., 2007), pois geralmente partículas menores aumentam a área de superfície de contato entre os sólidos e os solventes extratores, aumentando na maioria das vezes a eficiência do processo (PRISTA et al., 1996).

A distribuição granulométrica dos pós obtidos das folhas de *P. pyramidalis* foi determinada por tamisação em diferentes aberturas de malhas, conforme descrito no item 4.4.

A tabela 4 mostra o percentual de massa retida em cada malha avaliada, com diferentes massas e tempo do processo de tamisação, onde se pode observar que a maior quantidade do pó ficou retida no tamis com abertura de malha $>1190\mu\text{m}$, que permite classificar o pó obtido como sendo um pó grosso.

A figura 7 apresenta a distribuição granulométrica do pó, onde podemos verificar que o tamanho de partícula $>1190\mu\text{m}$, é o mais frequente.

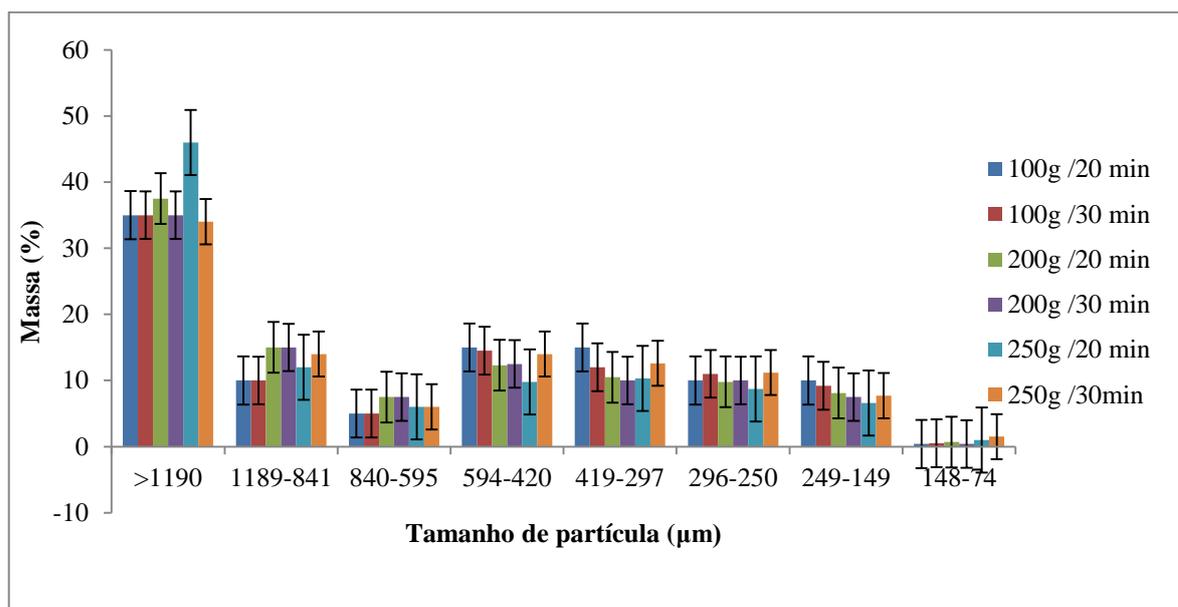
Tabela 4 - Percentual de massa do pó obtido das folhas de *P. Pyramidalis*, retida nos diferentes tamanhos de malhas.

Tamanho Partícula (μm)	Massa de partida (g) / tempo de tamisação (min)					
	100/ 20	200/ 20	250/20	100/ 30	200/30	250/30
	% Retido					
>1190	35,0	35,0	37,5	35,0	46,0	34,0
1189-841	10,0	10,0	15,0	15,0	12,0	14,0
840-595	5,0	5,0	7,5	7,5	6,0	6,0
594-420	15,0	14,5	12,0	12,5	9,8	14,0
419-297	15,0	12,0	10,0	10,0	10,3	12,6
296-250	10,0	11,0	9,8	10,0	8,7	11,2
249-149	10,0	9,2	8,1	7,5	6,6	7,7
148-74	0,4	0,5	0,7	0,4	1,0	1,5

De acordo com a análise estatística dos resultados obtidos não houve influência significativa entre a quantidade de massa de partida e o tempo de processamento, na

distribuição do tamanho de partículas, sendo assim é possível utilizar qualquer uma das massas e tempo de processamento avaliados, para determinar o percentual de massa retida em cada tamis.

Figura 7 - Gráfico de distribuição granulométrica do pó obtido das folhas de *P. Pyramidalis* retida em diferentes tamanhos de aberturas de malhas.



5.2. AVALIAÇÃO DO SISTEMA DE SOLVENTES NO PROCESSO EXTRATIVO

A escolha do sistema de solventes é um dos fatores que também podem interferir no processo de extração, no entanto se faz necessário escolher o melhor solvente ou sistema de solventes que seja mais eficiente para extrair as substâncias de interesse em quantidades satisfatórias para o estudo químico e/ou biológico (SIVAKUMAR et al., 2007; MIGLIATO et al., 2011).

Neste trabalho avaliamos um sistema de solventes composto por uma mistura de etanol/água em diferentes proporções (30:70; 50:50; 70:30), visto que ambos apresentam baixa toxicidade e apresentam uma polaridade satisfatória para extração de substâncias químicas de natureza mais polar, no caso dos flavonóides.

A eficiência de extração foi determinada pela quantificação dos biomarcadores canferol e quercetina.

Foi observado uma variação nas concentrações dos marcadores canferol e quercetina nas diferentes proporções do sistema de solventes testados (etanol:água) e a melhor condição

de extração encontrada foi aquela utilizando o sistema etanol:água (50:50 v/v), como demonstrado na tabela 5.

Tabela 5 - Concentração dos biomarcadores canferol e quercetina ($\mu\text{g/mL}$) nos extratos fluidos, obtidos a partir de 200g/1000 mL em diferentes proporções de etanol: água, pelo processo de maceração.

Proporção Etanol:Água (v/v)	Valores Médios das Concentração dos Biomarcadores ($\mu\text{g/mL}$) \pm DPR	
	Canferol	Quercetina
30:70	*20,9 \pm 5,1	*38,48 \pm 4,5
50:50	*53,8 \pm 2,6	*81,41 \pm 2,5
70:30	*40,1 \pm 4,5	*65,24 \pm 2,6

*n=3

5.3. AVALIAÇÃO DO PROCESSO EXTRATIVO EM FUNÇÃO DA GRANULOMETRIA DOS PÓS

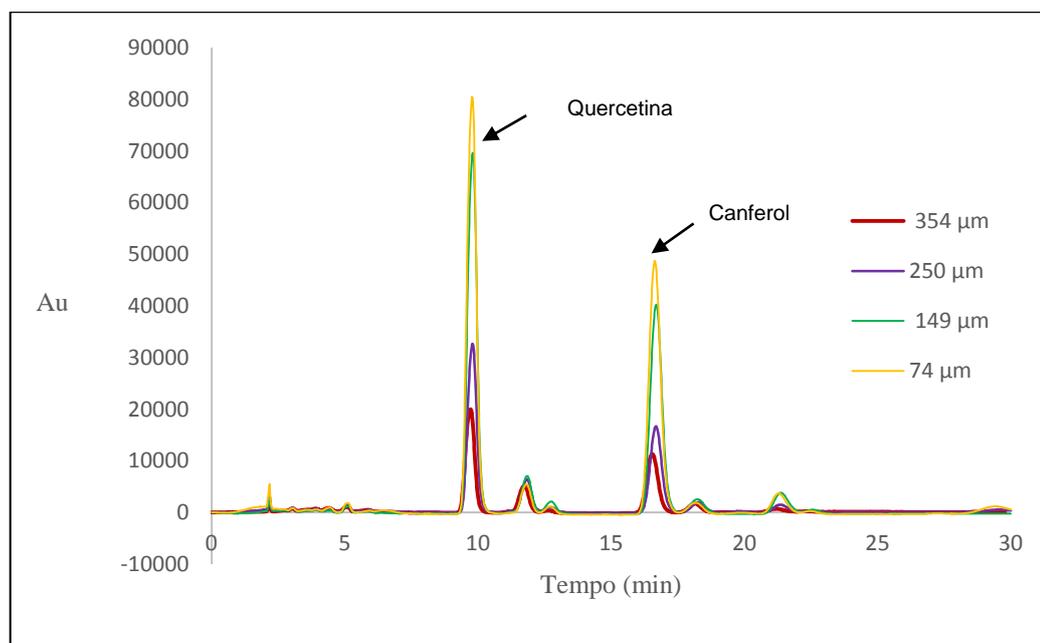
Após escolha do melhor sistema de solventes para extração, como sendo etanol:água (50:50 v/v), foi verificada a influência do tamanho das partículas no processo extrativo, por meio da quantificação dos biomarcadores canferol e quercetina, onde verificou-se que quanto menor o tamanho das partículas, melhor a eficiência do processo de extração, conforme demonstrado na tabela 6 e figura 8, visto que com a redução de diâmetro das partículas ocorre um aumento da área superficial e da reatividade das mesmas, permitindo uma melhor troca de massas com os solventes extratores, facilitando assim uma melhor extração dos compostos presentes (LIST; SCHMIDT, 1984).

Tabela 6 - Concentrações dos biomarcadores canferol e quercetina ($\mu\text{g/mL}$) em função dos diferentes tamanhos de partículas do pó das folhas de *P. pyramidalis*.

Tamanho de Partícula (μm)	Proporção: Massa/Volume (g/mL)	Valores Médios das Concentração dos Biomarcadores ($\mu\text{g/mL}$) \pm DPR	
		Canferol	Quercetina
354	200g/1000mL	*50,0 \pm 3,3	*70,82 \pm 3,38
250		*78,1 \pm 3,4	*120,71 \pm 2,9
149		*184,9 \pm 3,8	*264,29 \pm 4,1
74		*231,6 \pm 1,5	*310,59 \pm 1,6

*n=3

Figura 8 - Cromatogramas do extrato fluido de *P. pyramidalis*, obtidos a partir de diferentes granulometrias de pós (354, 250, 149, 74) μm .



5.4. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA POR CLAE

O desenvolvimento e a validação do método analítico para ser empregado no controle de qualidade da matéria-prima vegetal de *P. pyramidalis* se fez necessário, visto que não havia nenhum método descrito na literatura científica com esta finalidade.

Existem alguns trabalhos que descrevem metodologias analíticas que são utilizadas para garantir a qualidade de outras matrizes vegetais e que utilizam os mesmos analitos (canferol e quercetina), que serão monitorados para garantir a qualidade dos extratos de *P. pyramidalis*, porém por se tratar de matrizes complexas, com diferentes composições químicas e diferentes substâncias interferentes, nem sempre podemos usar as mesmas condições cromatográficas de uma matriz em outra, mas podem ser usadas como referência (SLADKOVSKY; SOLICH; OPLETAL, 2001; ZU, et al., 2006; OLSZEWSKA, 2008; JAIN; SHAIKH, 2014; AHMED; RAO, 2016)

A validação do método por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de ultravioleta com arranjo de diodo, foi realizada após otimização das condições cromatográficas, com a avaliação dos seguintes fatores: composição da fase móvel, tipo de fase estacionária, temperatura da coluna, razão de fluxo da fase móvel, comprimento de onda e volume de injeção.

As melhores condições cromatográficas encontradas foram as seguintes: mistura de metanol: ácido fosfórico 1% (47:53 v/v), como fase móvel, fluxo de 1,2 mL/min, $\lambda=370$ nm, temperatura da coluna de 40°C e volume de injeção de 20 μ L.

Após escolha das condições ótimas para realizar a quantificação dos analitos de interesse, que no caso deste trabalho foram canferol e quercetina, foi então realizada a validação da metodologia.

Os marcadores acima citados, foram escolhidos, em função de se apresentarem como substâncias majoritárias no extrato em estudo, além de apresentarem várias atividades farmacológicas já comprovadas, como a atividade anti-inflamatória (DEVI et al., 2015; D'ANDREA, 2015).

A validação da metodologia analítica para quantificação simultânea dos flavonoides canferol e quercetina nos extratos fluido e seco, obtidos a partir de *P. pyramidalis*, foi realizada segundo os critérios estabelecidos pela resolução RE nº 899/2003.

Para tanto foram avaliados os seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, limites de detecção e quantificação, linearidade, precisão, exatidão, robustez e estabilidade.

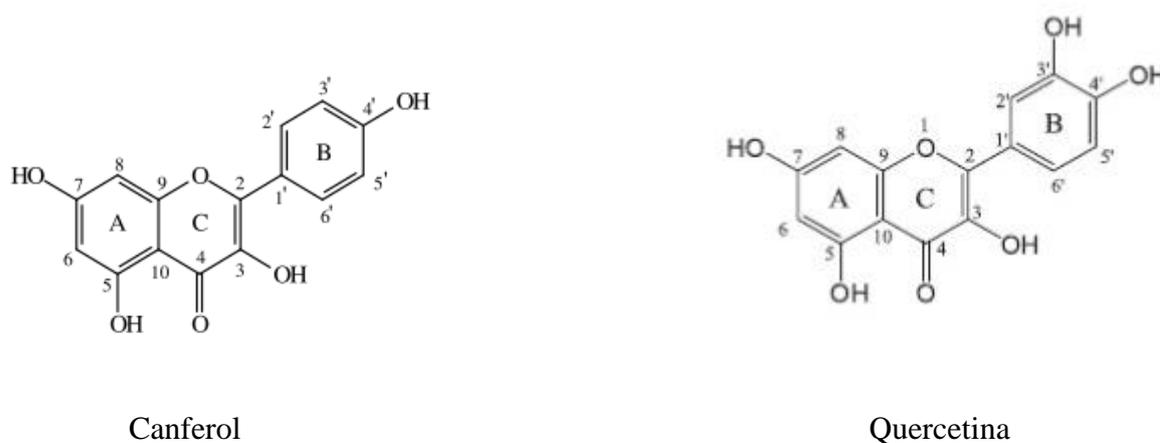
5.4.1. Otimização das condições cromatográficas

5.4.1.1. Escolha da fase móvel

Levando-se em consideração a natureza química do canferol e da quercetina (figura 9), utilizamos uma composição de fase móvel, constituída por uma mistura de metanol e ácido fosfórico 1%. Este último foi adicionado para suprimir a ionização dos analitos, pois a formação de cauda em picos de flavonóides é um problema na separação destes compostos, fato este atribuído a ionização das hidroxilas presentes no esqueleto destas substâncias. A presença de um ácido na fase móvel pode impedir este efeito, devido a alteração do pH, proporcionando assim uma melhoria na simetria do do pico (HASLER; STICHER.; MEIER, 1990; ZU, et al., 2006).

Foram testadas diferentes proporções da mistura de solventes, sendo metanol: ácido fosfórico 1% (43:57 v/v) a que apresentou melhores resultados.

Figura 9 - Estruturas químicas dos biomarcadores canferol e quercetina.



5.4.2. Especificidade e seletividade

A especificidade do método foi avaliada pela análise dos perfis cromatográficos, do branco (fase móvel), e das soluções amostra (figuras 10 e 11).

Figura 10 - Cromatogramas das amostras de extrato fluido de *P. pyramidalis*, soluções padrão de canferol, quercetina e branco (fase móvel).

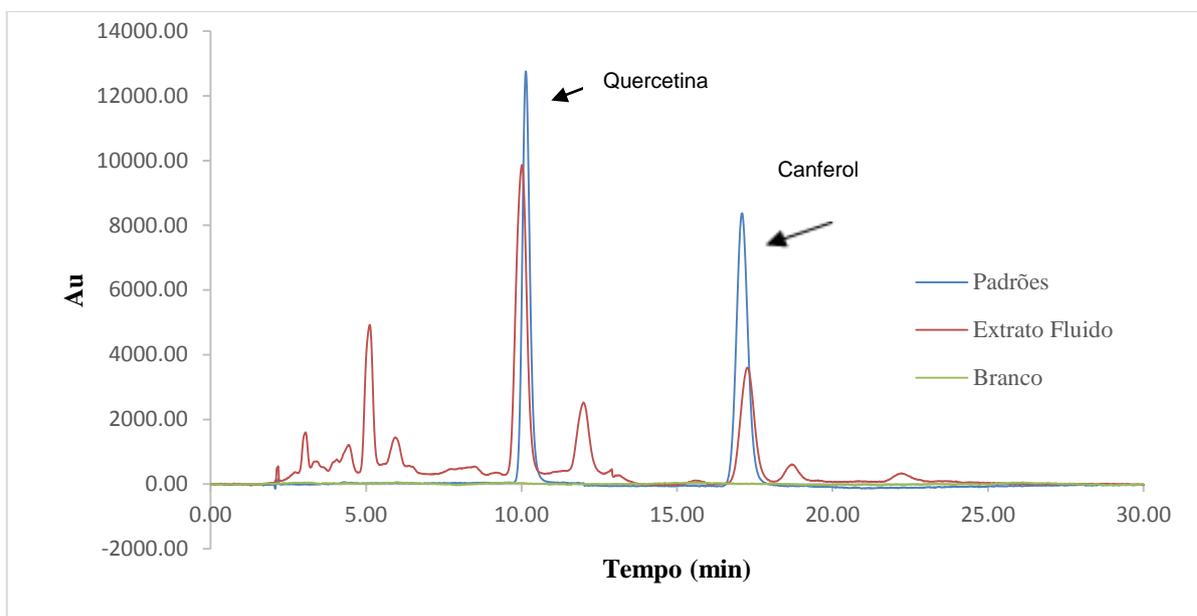
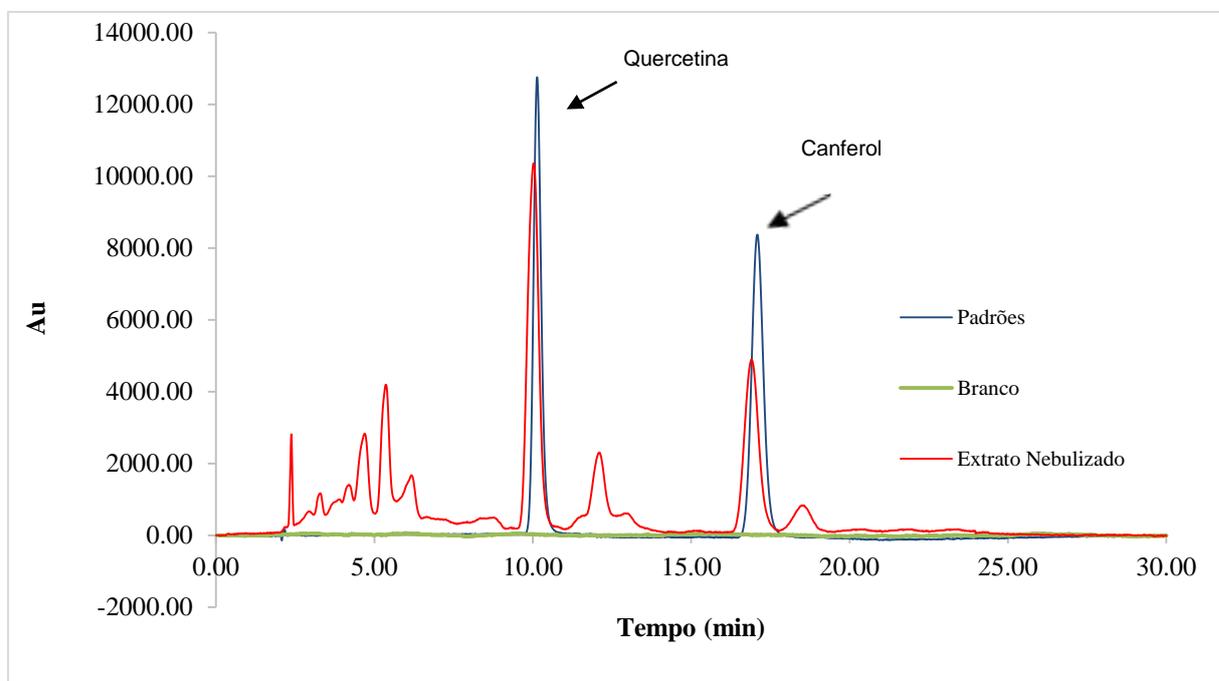


Figura 11 - Cromatogramas das amostras do extrato nebulizado de *P. pyramidalis*, soluções padrão de canferol e quercetina e branco (fase móvel).



Podemos observar que os cromatogramas dos extratos fluido e seco quando comparados com o cromatograma dos padrões de canferol e quercetina, apresentam o mesmo tempo de retenção e no cromatograma do branco não foi verificado nenhum pico eluindo no

mesmo tempo de retenção dos analitos de interesse, comprovando desta forma a especificidade do método. Ainda foi observado uma boa separação entre os picos de quercetina e canferol, com tempos de retenção de 10,0 e 17,5 min, respectivamente.

A análise dos espectros de absorção molecular UV-vis na faixa de 200-500 nm das amostras padrão, extratos fluido e seco (figuras 12 e 13), demonstrou não haver bandas de absorção interferentes e a pureza espectral foi maior que 0,999, confirmando assim uma boa seletividade para o método proposto.

Figura 12 - Espectros de absorção molecular UV-Vis, na faixa de 200-500 nm, do biomarcador canferol nas amostras dos extratos fluido e nebulizado e do padrão analítico.

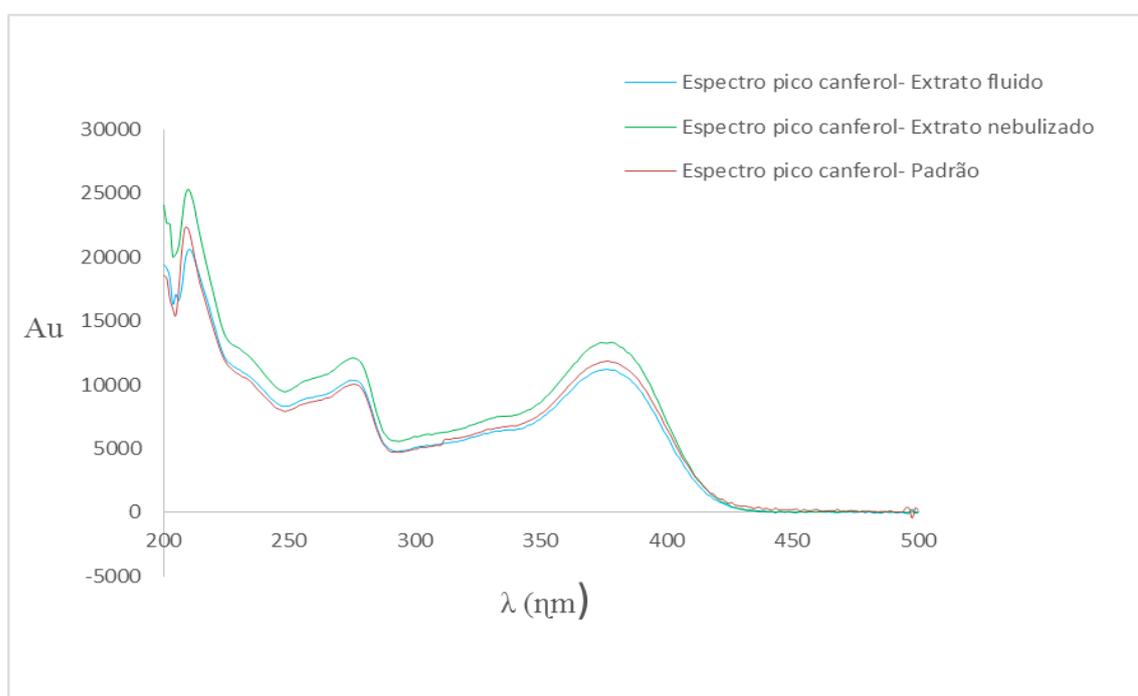
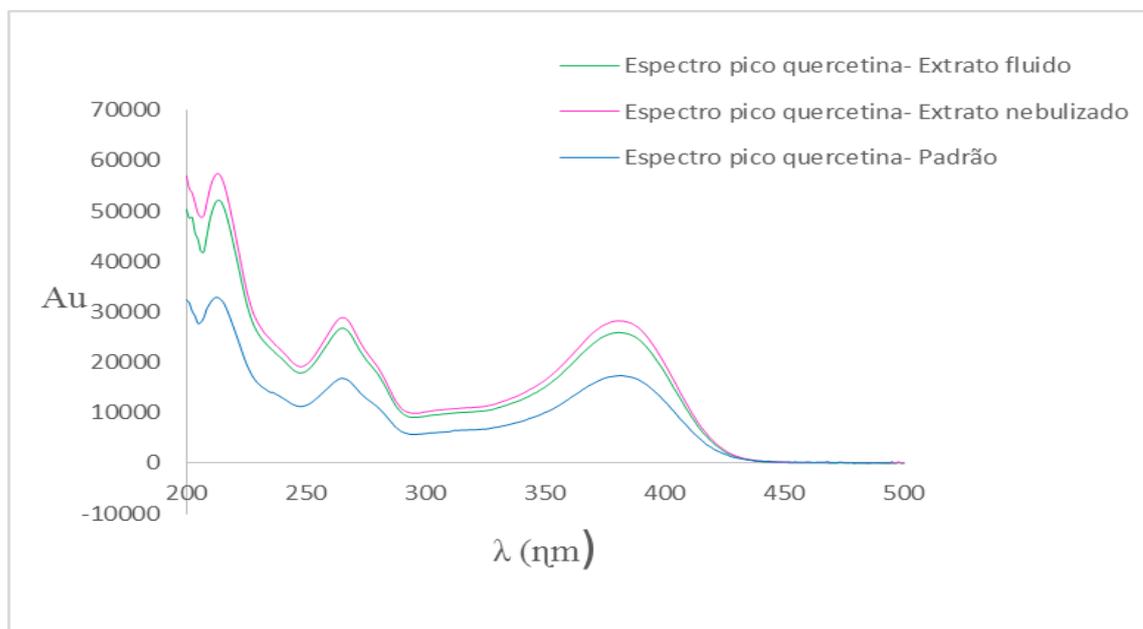


Figura 13 - Espectros de absorção molecular UV-Vis, na faixa de 200-500 nm, do biomarcador quercetina nas amostras dos extratos fluido e nebulizado e do padrão analítico.



5.4.3. Linearidade

A linearidade do método foi avaliada por meio da regressão linear de três curvas de calibração, com oito níveis de concentração para os dois marcadores químicos. A relação entre a variável independente (concentração) e a variável dependente (área média) de cada analito, está representada nas figuras 14 e 15 e os valores das concentrações para cada nível avaliado dos analitos canferol e quercetina estão plotados nas tabelas 7 e 8, respectivamente.

Tabela 7 - Valores das áreas versus concentração das curvas analíticas do canferol.

Concentração (µg/mL)	Área do analito			Área Média	DPR
	Curva 1	Curva 2	Curva 3		
0,4	21199	20617	22660	21492	4,90
0,6	32797	31442	35753	33331	6,61
1,6	90941	88324	95817	91694	4,15
2,8	154189	160458	169788	161478	4,86
4,0	232740	223965	229572	228759	1,94
5,2	306421	297317	300608	301449	1,53
6,4	372260	364172	364917	367116	1,22
7,6	450508	436117	425647	437424	2,85

Tabela 8 - Valores das áreas versus concentração das curvas analíticas da quercetina.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Área do analito				DPR
	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Área Média	
0,4	19278	19898	20088	19755	2,14
0,6	30931	30534	30102	30522	1,36
1,6	84425	84130	78085	82213	4,35
2,8	151085	150918	149972	150658	0,40
4,0	214730	221939	218768	218479	1,65
5,2	289664	286147	285452	287088	0,79
6,4	361997	359353	355937	359096	0,85
7,6	425921	440194	424067	430061	2,05

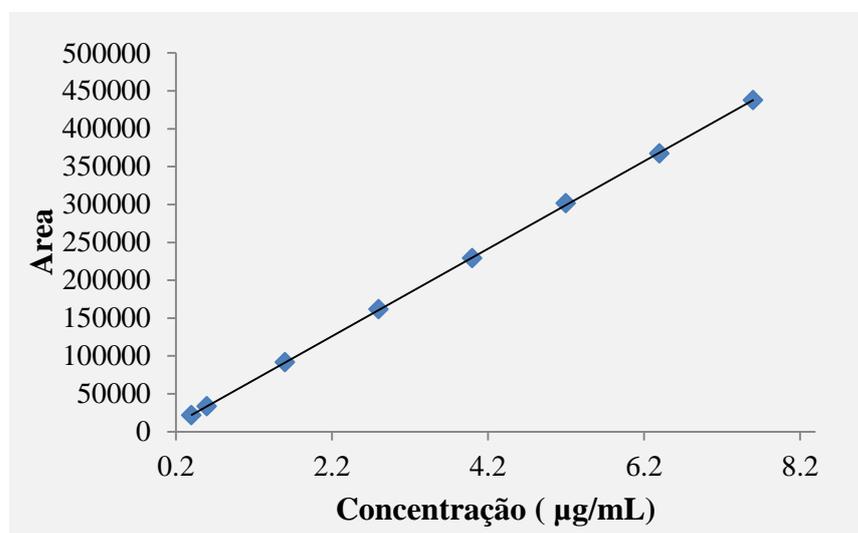
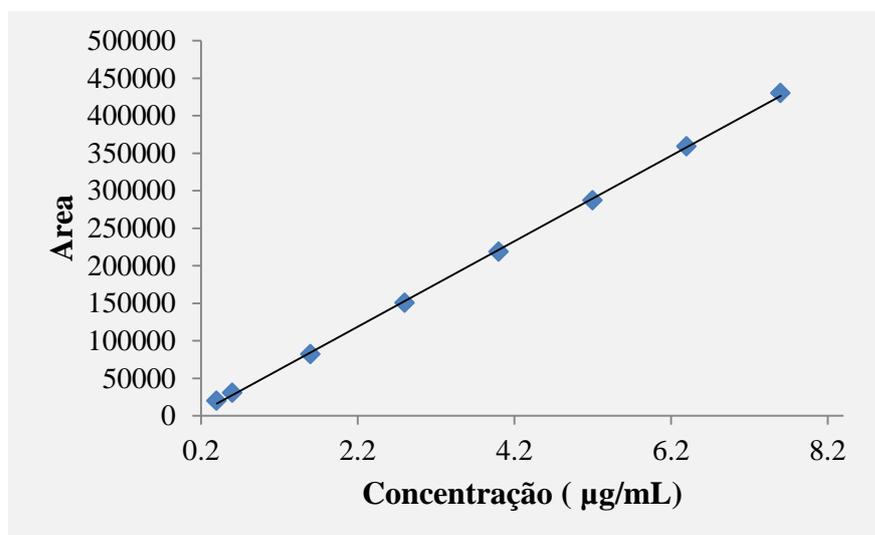
Figura 14 - Gráfico da curva analítica do canferol na faixa de concentração de 0,4-7,6 $\mu\text{g/mL}$.

Figura 15 - Gráfico da curva analítica da quercetina na faixa de concentração de 0,4-7,6 $\mu\text{g/mL}$.



As equações de regressão linear, os coeficientes de correlação linear e a faixa linear, tanto do canferol quanto da quercetina, estão demonstradas na tabela 9.

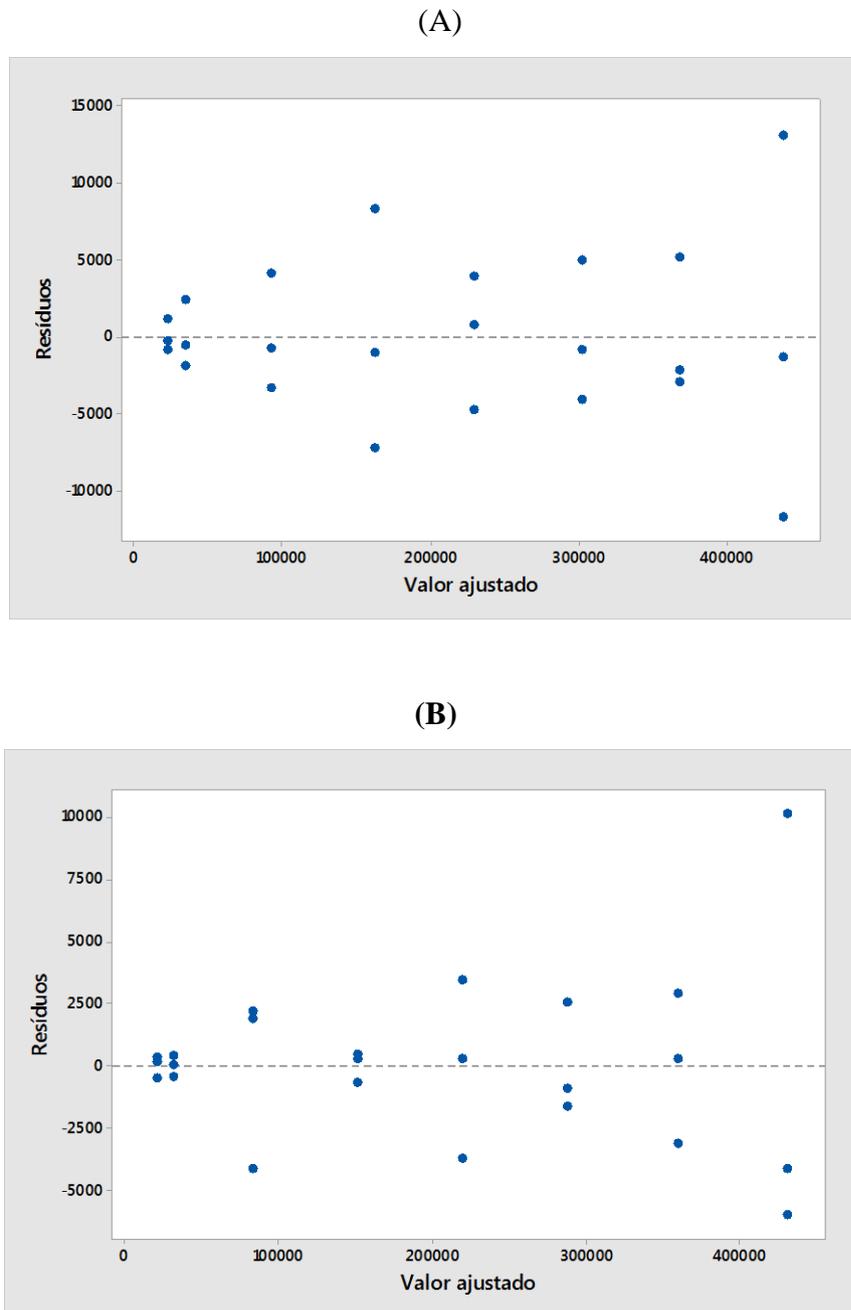
Tabela 9 - Parâmetros das curvas de calibração de canferol e quercetina.

Biomarcador	Faixa Linear ($\mu\text{g/mL}$)	Equação da reta	Coefficiente de correlação (r)
Canferol	0,4-7,6	$y = 56948x - 6354,1$	0,9996
Quercetina		$y = 57721x - 1010,8$	0,9999

De acordo com a análise da curva média de calibração (figuras 14 e 15) e do valor médio do coeficiente de correlação linear (r), foi possível observar uma relação linear entre as concentrações e as áreas obtidas tanto para o canferol quanto para quercetina. Os valores experimentais obtidos para os coeficientes de canferol e quercetina foram: $R = 0,9999$ e $0,09996$, respectivamente, valores estes que conferem uma boa linearidade para o método, considerando-se que o coeficiente mínimo aceitável deve ser $> 0,995$, de acordo com a RE 899/2003.

A linearidade das curvas analíticas dos dois analitos em estudo, foi confirmada pela análise gráfica dos resíduos gerados pelos modelos de calibração (figura 16A e 16B), que comprovam não haver pontos atípicos na calibração, que pudessem influenciar o modelo.

Figura 16 - Gráfico dos resíduos das curvas analíticas dos biomarcadores canferol (A) e quercetina (B), respectivamente.



A análise de variância ANOVA das três curvas analíticas, para cada um dos analitos avaliados, apresentou valor de $p > 0,05$, demonstrando assim não haver diferença significativa entre as mesmas, para um nível de significância de 95%. Os dados da análise estatística são mostrados nas tabelas 10 e 11.

Tabela 10 - Análise de variância (ANOVA) para curva padrão de canferol.

Fonte da variação	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	94094408.25	2	47047204.13	0,001957803	0,99804	3,4668
Dentro dos grupos	5,04643E+11	21	24030613608			
Total	5,04737E+11	23				

Tabela 11 - Análise de variância (ANOVA) para curva padrão de canferol.

Fonte da variação	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	94094408,25	2	47047204,13	0,001957803	0,99804	3,4668
Dentro dos grupos	5,04643E+11	21	24030613608			
Total	5,04737E+11	23				

5.4.4. Limites de Detecção e Quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram determinados a partir da curva de linearidade e por meio de tratamento estatístico, empregando as equações (4) e (5) descritas no item 4.10.3, respectivamente.

Os valores encontrados para os limites de detecção e quantificação para o canferol, foram 0,072 µg/mL e 0,22 µg/mL, respectivamente e para quercetina foram 0,17 µg/mL e 0,56 µg/mL, respectivamente. Esses resultados demonstram que o método é sensível para detectar e quantificar os biomarcadores canferol e quercetina nas amostras de *P. pyramidalis*.

5.4.5. Precisão

5.4.5.1. Repetibilidade e Precisão Intermediária

5.4.5.1.1. Repetibilidade

A repetibilidade do método foi realizada em um curto período de tempo, com o mesmo analista, mesma instrumentação e com os mesmos parâmetros analíticos para as seis corridas analíticas das amostras de extrato fluido e seco na concentração equivalente a 100% da concentração de 0,4 µg/mL dos analitos canferol e quercetina, presentes nas amostras de extratos fluido e seco.

Os valores das concentrações obtidas nas amostras de extrato fluido, estão plotados na tabela 12, onde podemos observar que o desvio padrão relativo entre as concentrações de canferol e quercetina foi de 1,57 e 1,13, respectivamente.

Tabela 8 - Resultados da repetibilidade e precisão intermediária para os biomarcadores canferol e quercetina, presentes nas amostras de extrato fluido de *P. pyramidalis*.

Analista		Analista		
A	B	A	B	
Repetibilidade ^a	Precisão Intermediária ^b	Repetibilidade ^a	Precisão Intermediária ^b	
Canferol (µg /mL)		Quercetina (µg /mL)		
Média	17,23*	17,71**	38,60*	39,5**
DP	0,27	0,41	0,44	0,78
DPR	1,57	2,28	1,13	1,96

DP- desvio padrão; DPR- desvio padrão relativo; a= mesmo dia, mesmo analista e mesmo equipamento; b= dois dias diferentes, analistas diferentes e mesmo equipamento.

*n=6; **n=18

Na tabela 13 estão demonstrados os valores das concentrações dos analitos nas amostras de extrato seco, onde podemos verificar valores de DPR de 3,24 e 3,01, para o canferol e a quercetina, respectivamente.

Tabela 13- Resultados da repetibilidade e precisão intermediária para os biomarcadores canferol e quercetina presentes nas Amostras do nebulizado de *P. pyramidalis*.

	Analista		Analista	
	A	B	A	B
	Repetibilidade ^a	Precisão Intermediária ^b	Repetibilidade ^a	Precisão Intermediária ^b
	Canferol (µg /mL)		Quercetina (µg /mL)	
Média	23,62*	23,32**	38,18	37,78
DP	0,77	0,64	1,15	0,95
DPR	3,24	2,76	3,01	2,53

CV- coeficiente de variação; a= mesmo dia, mesmo analista e mesmo equipamento; b= dois dias diferentes, analistas diferentes e mesmo equipamento.

*n=6; **n=18

5.4.5.1.2. Precisão Intermediária

A precisão intermediária foi avaliada utilizando os mesmos parâmetros cromatográficos da precisão intra-dia, mesmo instrumento, entretanto foram realizadas para cada uma das matrizes testadas, 09 corridas analíticas em 02 dias diferentes e com analistas distintos, totalizando 18 injeções.

Os resultados referentes as concentrações obtidas para os biomarcadores, canferol e quercetina na avaliação da precisão intermediária do método, nas amostras de extrato fluido e seco, estão descritos nas tabelas 12 e 13, respectivamente. Os valores dos DPR entre as corridas analíticas, para o canferol e a quercetina, nas amostras de extrato fluido foi igual a 2,28 e 1,96, respectivamente, enquanto para as amostras de extrato seco, foram 2,76 e 2,53.

De acordo com a análise de variância (ANOVA), não houve diferença significativa entre os valores obtidos para o canferol e quercetina, nos extratos fluido e seco dois dias de experimento, pois os valores de *F critico* foram maiores que os valores de *F calculado* e *p* >0,05 para um nível de confiança de 95%, corroborando com a não significância da variação dos dados, conforme demonstrado nas tabelas 14,15, 16 e 17.

Tabela 14 - Análise de variância (ANOVA) da precisão intermediária do canferol em amostras de extrato fluido de *P. pyramidalis*.

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Linhas	6.032796705	5	1.2066	1.3667	0.3145	3.3258
Colunas	1.952887596	2	0.9764	1.1060	0.3682	4.1028
Erro	8.828539982	10	0.8829			
Total	16.81422428	17				

Tabela 15 - Análise de variância (ANOVA) da precisão intermediária da quercetina em amostras de extrato fluido de *P. pyramidalis*.

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Linhas	1.44E+08	5	28835300	1.007	0.4616	3.326
Colunas	2.72E+08	2	1.36E+08	4.753	0.0354	4.103
Erro	2.86E+08	10	28628872			
Total	7.03E+08	17				

Tabela 9- Análise de variância (ANOVA) da precisão intermediária do canferol em amostras de extrato seco de *P. pyramidalis*.

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Linhas	1.416239	5	0.283248	0.554213	0.73283	3.325835
Colunas	0.524671	2	0.262335	0.513295	0.613471	4.102821
Erro	5.110808	10	0.511081			
Total	7.051718	17				

Tabela 10 - Análise de variância (ANOVA) da precisão intermediária da quercetina em amostras de extrato seco de *P. pyramidalis*.

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Linhas	5.595093	5	1.119018536	1.271298021	0.348097	3.325835
Colunas	1.987683	2	0.993841527	1.12908654	0.361303	4.102821
Erro	8.802173	10	0.88021732			
Total	16.38495	17				

5.4.6. Exatidão

A exatidão do método analítico foi avaliada através da adição de quantidades conhecidas dos padrões de canferol e quercetina em três diferentes concentrações: baixa (20%), média (100%) e alta (180%), os percentuais de padrões adicionados foram calculados em relação a concentração obtida na precisão, com posterior determinação dos percentuais de recuperação para cada nível.

A tabela 18 mostra os valores médios com seus respectivos desvios padrões, obtidos no ensaio de recuperação do método, em três níveis (baixo, médio, alto), onde foi observado uma boa recuperação para os dois analitos nos três níveis de fortificação avaliados, visto que trata-se de uma matriz complexa.

Tabela 11 - Resultados do teste de recuperação do método, para os biomarcadores canferol e quercetina no extrato fluido de *P. pyramidalis*.

Nível	Canferol		Quercetina	
	Concentração Média ($\mu\text{g/mL}$) \pm DPR	Recuperação (%) \pm DPR	Concentração Média ($\mu\text{g/mL}$) \pm DPR	*Recuperação (%) \pm DPR
Baixo (20%)	*21.0 \pm 0.07	99.7 \pm 0.56	*48,0 \pm 2,74	101.3 \pm 2,66
Médio (100%)	*32.7 \pm 0.41	94.9 \pm 1.26	*74,93 \pm 5,36	95,18 \pm 5,21
Alto (180%)	*44.6 \pm 0.46	93,0 \pm 1.04	*102,68 \pm 5,0	93,41 \pm 5,0

*n=18

5.4.7. Robustez

A variação da temperatura da coluna em $\pm 2^\circ\text{C}$ da condição normal de 40°C , não influenciou na quantificação dos analitos canferol e quercetina, demonstrando assim que o método é robusto para esta variação de temperatura. Na avaliação da influência da variação do fluxo e do pH da fase móvel em $\pm 0,1$ da condição normal, também não influenciou na área do pico do analito investigado. De acordo com a análise estatística (ANOVA) com intervalo de confiança 95%, não houve diferença significativa entre as variações das condições cromatográficas testadas, pois o valor de p foi maior que 0,05. Os resultados que comprovam a robustez do método estão demonstrados nas tabelas 19 e 20.

Tabela 12 - Resultados obtidos no teste de robustez, com variação da temperatura da coluna, pH e fluxo da fase móvel para o biomarcador canferol, nas amostras de extrato fluido.

Valores	Parâmetros Avaliados								
	Temperatura (°C)			Fluxo (mL/min)			pH		
	Normal	Alterada		Normal	Alterado		Normal	Alterado	
	40	38	42	1,2	1,1	1,3	1,58	1,48	1,68
Área Média±	118683	117904	118045	1118683	129227	109312	1118683	2120180	119326
DPR	± 3,44	± 1,48	± 1,69	± 3,44	± 1,90	± 1,76	± 3,44	± 2,65	± 2,3
TR Médio	17,34	18,75	16,18	17,34	18,88	16,18 ±	17,34	117,55	17,44
± DPR	± 0	± 0,01	± 0,09	± 0	± 0,03	0,09	± 0	± 0,01	± 0,02
Conc. (µg/mL)	18,0	17,85	17,91	18,0	18,1	17,87±	118,0	18,232 ±	18,10
± DP	± 3,44	± 1,48	± 1,69	± 3,44	± 1,90	1,76	± 3,44	2,65	± 2,30

* n = 3

Tabela 13 - Resultados obtidos no teste de robustez, com variação da temperatura da coluna, pH e fluxo da fase móvel para o biomarcador quercetina, nas amostras de extrato fluido.

Valores	Parâmetros Avaliados								
	Temperatura (°C)			Fluxo (mL/min)			pH		
	Normal	Alterada		Normal	Alterado		Normal	Alterado	
	40	38	42	1,2	1,1	1,3	1,58	1,48	1,68
Área Média±	235588	243027 ±	242152		265087	226615 ±	225588	4243528	24404048
DPR	± 1,01	1,6	± 1,2		± 1,8	1,7	± 1,01	± 1,8	± 1,9
TR Médio ±	10,0	10,76	9,5	35588	10,0	10,96 ±	9,38	10,0	10,18
DPR	± 0,0	± 0,09	± 0	± 0,0	0	± 0,0	± 0,0	± 0	± 0
Conc. (µg/mL)	39,0	40,2	40,08	39,0	39,89	41,11	39,0	40,31±	40,40 ±
± DP	± 1,01	± 1,6	± 1,46	± 1,01	± 1,83	± 1,67	± 1,01	1,75	1,89

5.4.8. Estabilidade das soluções amostra.

A estabilidade das amostras do extrato fluido foi analisada nos tempos zero e 24 horas e os resultados obtidos demonstraram que não houve alteração na estabilidade das amostras no período de 24 hs, quando mantidas à temperatura ambiente, pois os valores das concentrações do canferol e da quercetina não sofreram variação significativa durante o período de armazenamento das amostras, demonstrado pela análise de variância ANOVA. Os

resultados das concentrações de canferol e quercetina nos diferentes tempos de armazenamento estão demonstrados na tabela 21.

Tabela 14 - Valores das concentrações de canferol nas soluções amostra do extrato de *P. pyramidalis* durante o período de armazenamento de 24 horas.

Biomarcadores	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	
	Período (hs)	
	0	24
Canferol	18.12 \pm 3.4	17.9 \pm 3.2
Quercetina	37,43 \pm 1,68	37,14 \pm 2,06

5.5. AVALIAÇÃO DO EFEITO DAS CONDIÇÕES OPERACIONAIS DE SECAGEM POR *SPRAY DRYER*, NA CONCENTRAÇÃO DOS MARCADORES QUÍMICOS MONITORADOS.

De acordo com os dados obtidos foi verificado que as condições operacionais de secagem influenciaram na concentração dos dois marcadores estudados, canferol e quercetina.

A tabela 22 mostra o número de experimentos que foram realizados e as concentrações obtidas para cada um dos biomarcadores, sendo que a maior concentração para os analitos canferol e quercetina, foi observada no experimento 7 (0,87mg/g \pm 0,02 e 1,55 mg/g \pm 0,04), respectivamente, corroborando (figura 17) com os gráficos de superfície resposta, onde foi observado que de maneira geral as concentrações dos dois biomarcadores aumentam à medida que os níveis dos três fatores estudados (temperatura de entrada, taxa de fluxo de alimentação e proporção de adjuvante) diminuem.

Tabela 15 - Valores das respostas em relação as variáveis independentes avaliadas.

Experimentos	Variáveis Independentes			Resposta1	Resposta2
	T (°C)	F (mL/min)	DSC (%)	Teor Canferol	Teor Quercetina
1	180	4	20	0,68±0,02	1,28±0,05
2	180	8	20	0,70±0,02	1,34±0,03
3	180	4	10	0,75±0,03	1,39±0,05
4	160	8	10	0,79±0,03	1,44±0,06
5	160	8	20	0,68±0,02	1,31±0,04
6	180	8	10	0,74±0,03	1,35±0,06
7	160	4	10	0,87±0,02	1,55±0,04
8	160	4	20	0,75±0,01	1,28±0,05
9	170	6	15	0,79±0,03	1,45±0,06

*Valores médios \pm desvio padrão relativo ($n = 9$). T: temperatura de entrada de ar, F: taxa de fluxo de alimentação, DSC: proporção de dióxido de silício coloidal na composição de secagem.

A Tabela 23 e Figura 17 mostram os efeitos primários, secundários e terciários das variáveis independentes (T, F e DSC) sobre as respostas investigadas (teor canferol e quercetina).

Análises estatísticas dos resultados experimentais revelaram que todas as variáveis independentes afetaram significativamente todas as respostas, quando os efeitos primários foram avaliados, sendo que a temperatura (X_1) e a proporção de adjuvante (X_3) foram as variáveis que afetaram as respostas de forma mais significativa. Efeito similar da influência negativa da temperatura de entrada sobre o teor de flavonoides foi descrito em outros estudos para otimização das condições de secagem por *spray dryer* de extratos vegetais (COUTO et al., 2013; CORTES-ROJAS et al., 2015). Os efeitos secundários foram observados para ambas as respostas, nas seguintes interações: T (x_1) x F (x_2) e T (x_1) x DSC (x_3), com nível de significância $p < 0.05$. A interação terciária entre os fatores T x F x DSC exerceram influência significativa apenas para a resposta teor de quercetina, enquanto que o teor de canferol não foi afetado por esta interação. Isso demonstra que os teores dos flavonóides estudados podem ser influenciados tanto pelos parâmetros do processo quanto pela natureza química destes compostos.

A metodologia de superfície resposta foi usada para avaliar os efeitos individuais e interativos no processo de secagem investigado neste estudo (figura 17), onde foi observado um efeito negativo da temperatura (X_1) e da proporção do adjuvante (X_3) sobre as respostas obtidas. Isso pode ser explicado pelo fato de altas temperaturas impactarem diretamente na degradação de compostos químicos de extratos vegetais. Resultados semelhantes foram descritos por Thirugnanasambandham e Sivakumar (2015), no estudo da influência das condições do processo de secagem por *spray dryer* de pomegranate juice sobre as

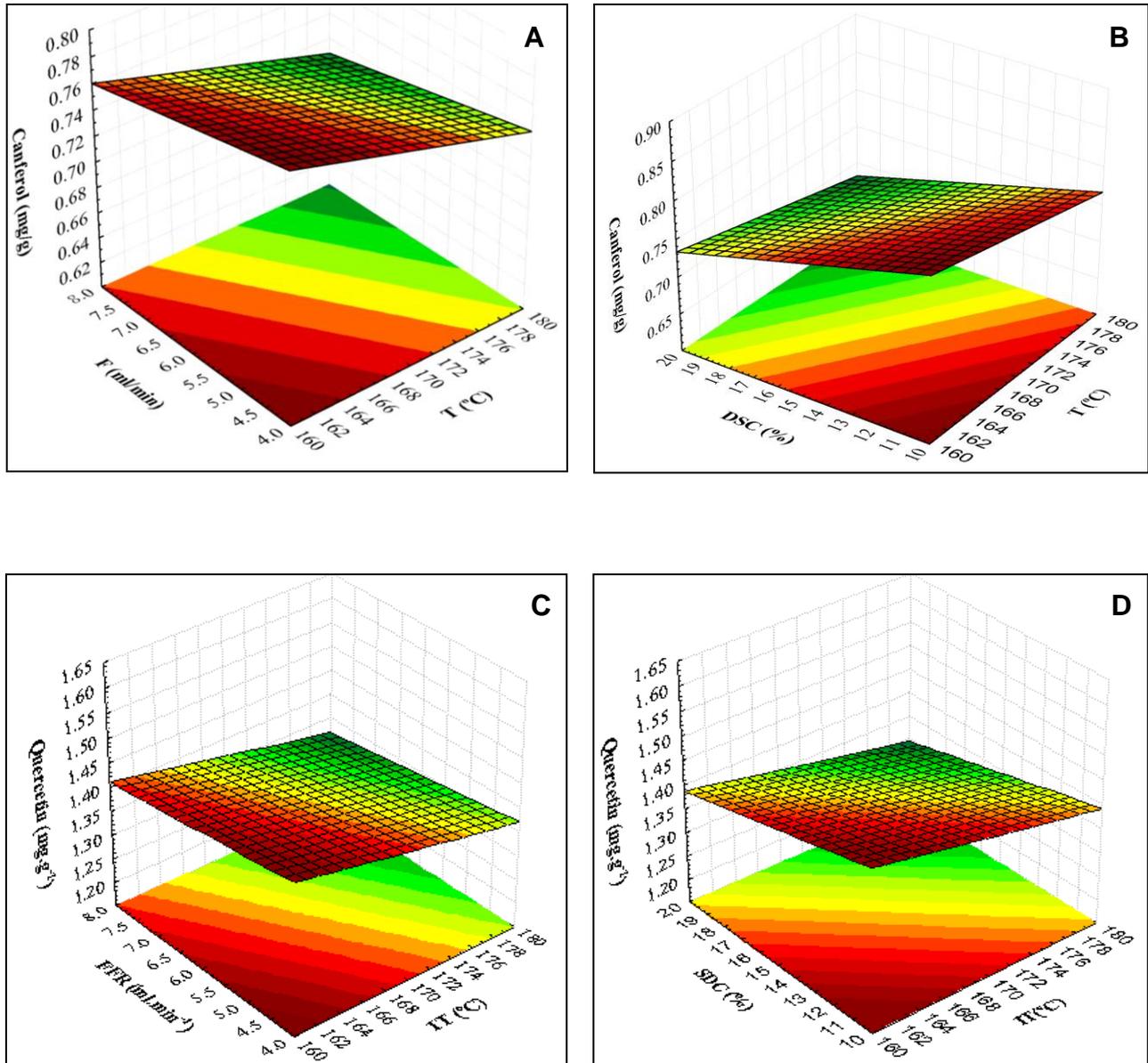
propriedades físico-químicas e por Patil, Chauhan e Singh (2014) que realizaram um trabalho para otimização do processo de secagem para obtenção do pó de guava usando a MSR.

Tabela 16 - Sumário dos efeitos das variáveis independentes e suas significâncias (ANOVA) sobre as respostas analisadas no planejamento fatorial.

Variáveis Independentes	Valor <i>p</i>	
	Teor de Canferol	Teor de Quercetina
T (x ₁)	0,000000*	0,000000*
F (x ₂)	0,000972*	0,000444*
DSC % (x ₃)	0,000000*	0,000000*
T (x ₁) x F (x ₂)	0,001395*	0,000665*
T (x ₁) x DSC% (x ₃)	0,000624*	0,015135*
F (x ₂) x DSC% (x ₃)	0,342668	0,129123
T (x ₁) x F (x ₂) x DSC% (x ₃)	0,280519	0,030913*

p<0.05*efeito significante

Figura 17 - Gráficos de superfície de resposta, mostrando os efeitos da temperatura de entrada de ar (T), proporção de dióxido de silício coloidal (DSC) e taxa de fluxo de alimentação (F) sobre os teores de canferol (A e B) e quercetina (C e D).



5.6. RENDIMENTO DO PROCESSO DE SECAGEM POR *SPRAY DRYER*

Foi observado um melhor rendimento do processo para as condições operacionais com temperatura de entrada de 160°C, 10% de dióxido de silício coloidal e fluxo de 8mL/min, conforme mostra a tabela 24. Na obtenção do extrato seco de *P. pyramidalys* foi escolhida condição semelhante, porém com fluxo de 4mL/min, pois esta razão de fluxo proporcionou maiores concentrações para os marcadores monitorados.

Tabela 17 - Rendimento do processo de secagem por spray dryer em diferentes condições operacionais.

Condições do Processo	Massa (g)*	Rendimento (%)**
20% 160°C 8mL/min	4,5	23,33
20% 160°C 4mL/min	5,0	25,93
20% 180°C 8mL/min	5,2	26,79
20% 180°C 4mL/min	5,5	28,54
15% 170°C 6mL/min	4,3	23,78
10% 180°C 8mL/min	3,3	19,07
10% 180°C 4mL/min	4,3	25,30
10% 160°C 4mL/min	5,5	32,10
10% 160°C 8mL/min	6,3	36,96

*Media da massa do Extrato Nebulizado (n=3) ** Rendimento do processo(n=3)

5.7. ESTABILIDADE PRÉ-FORMULADOS

Os resultados obtidos no estudo de estabilidade acelerada dos pré-formulados, demonstraram que tanto as concentrações de canferol quanto de quercetina reduziram ao longo do tempo em todas as amostras, nas condições de armazenamento estudada, conforme mostra as tabela 25 e as figuras 19 e 20. Foi observado que os maiores percentuais de perdas de massa dos marcadores no final do estudo, ocorreu nas misturas com lactose, sendo de 25, 61% e 31,54% para quercetina e canferol, respectivamente. Enquanto que a menor perda de massa foi verificada para as misturas com amido, 7,2% de quercetina e 15,7% de canferol.

A redução na concentração dos dois analitos, no período de 180 dias de avaliação, seguiu a mesma ordem de perda para os dois marcadores nas misturas com os excipientes: LC>CMC>MD>AM

Os modelos cinéticos de degradação do canferol e da quercetina, nas amostras de pré-formulados, foram determinados de acordo com a análise dos coeficientes de regressão linear (R^2), obtidos a partir dos gráficos lineares das concentrações dos marcadores em função do tempo de estudo para cada pré-formulado avaliado, enquanto que as constantes de velocidade (k) foram obtidas a partir dos valores de inclinação das retas.

Nas tabelas 26 e 27, estão plotados os parâmetros cinéticos e coeficientes de regressão linear (R^2), que definiram os modelos cinéticos para os biomarcadores canferol e quercetina, respectivamente, nos diferentes pré-formulados.

De acordo com a análise dos coeficientes de regressão linear foi possível determinar o modelo cinético de ordem zero para o canferol, nos pré-formulados contendo misturas de extrato nebulizado com os excipientes: amido e lactose (figura 21A) e um modelo cinético de

segunda ordem para as misturas com celulose microcristalina e maltodextrina (figura 21B), sugerindo assim que os excipientes podem influenciar diretamente na cinética de degradação do biomarcador canferol. Enquanto que a quercetina apresentou um modelo de segunda ordem em todas as amostras de pré-formulados (figura 22), indicando assim que o biomarcador possui um perfil térmico semelhante para todos os excipientes farmacêuticos testados.

Também foram determinadas as frações decompostas $\alpha_{0,9}$ dos dois marcadores para todas as misturas binárias. A fração decomposta do canferol apresentou valores na faixa de 129,75 a 50,34 dias (tabela 26), demonstrando assim um percentual de perda de 10% do canferol em um curto prazo de tempo, seguindo a seguinte ordem de perda: EN:AM < EN:MD < EN: LAC < EN: CM. Enquanto que para a quercetina a fração decomposta variou de 252,42 a 66,26 dias (tabela 27), obedecendo a seguinte ordem: EN:AM < EN:MD < EN:CM < EN:LAC. Tanto o canferol quanto a quercetina apresentaram perda de 10% em seus teores em maior prazo de dias nas misturas com amido, confirmando assim uma melhor estabilidade dos mesmos nos pré-formulados contendo este excipiente.

Segundo Scibisz (2010), o mecanismo de degradação de flavonoides pode ser explicado pela hidrólise das ligações glicosídicas presentes nas moléculas de flavonoides, sob a influência do calor, levando a formação da aglicona que é mais instável. Outros estudos atribuem a diminuição da estabilidade de polifenóis ao aumento do número de hidroxilas livres no anel B, no caso das antocianinas (HIEMORI; KOH; MITCHEL, 2009.)

Tabela 18 - Valores das concentrações de quercetina e canferol nas amostras dos pré-formulados nos tempos 0, 90 e 180 dias do estudo de estabilidade.

Amostras	Concentrações ($\mu\text{g/mL}$)					
	Quercetina			Canferol		
	Tempo de Estudo (dias)			Tempo de Estudo (dias)		
	0	90	180	0	90	180
EN10% DSC + LC	55.89 \pm 3,3	47.42 \pm 2.8	42.59 \pm 6.2	32.61 \pm 4.0	28.49 \pm 4.8	23.26 \pm 6.3
EN10% DSC + MD	51.78 \pm 5,8	46.20 \pm 3,1	44.93 \pm 5,1	31.15 \pm 4,5	27.33 \pm 2,8	24.63 \pm 4,9
EN10% DSC +CMC	52.52 \pm 3.9	44.04 \pm 3.5	41.17 \pm 5.2	31.53 \pm 4.2	25.79 \pm 4.5	22.73 \pm 6.0
EN10% DSC +AM	55.02 \pm 4.2	52.31 \pm 3.4	51.06 \pm 2.4	32.75 \pm 2.2	30.25 \pm 4.3	27.61 \pm 1.9

Figura 18 - Concentração do biomarcador quercetina nas misturas binárias do extrato nebulizado com os excipientes, amido, celulose microcristalina, maltodextrina e lactose, durante o tempo de armazenamento (180 dias) à temperatura de 40°C.

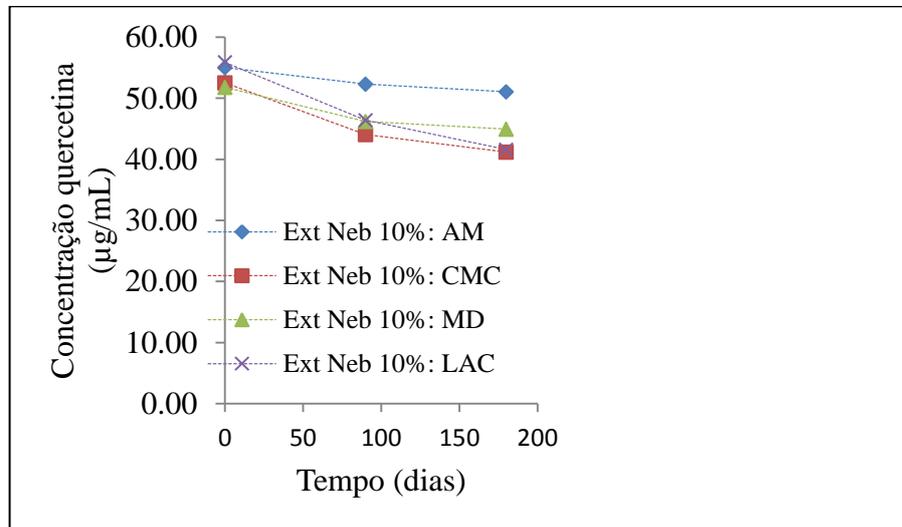


Figura 19 - Concentração do biomarcador canferol nas misturas binárias do extrato nebulizado com os excipientes, amido, celulose microcristalina, maltodextrina e lactose, durante o tempo de armazenamento (180 dias) à temperatura de 40°C.

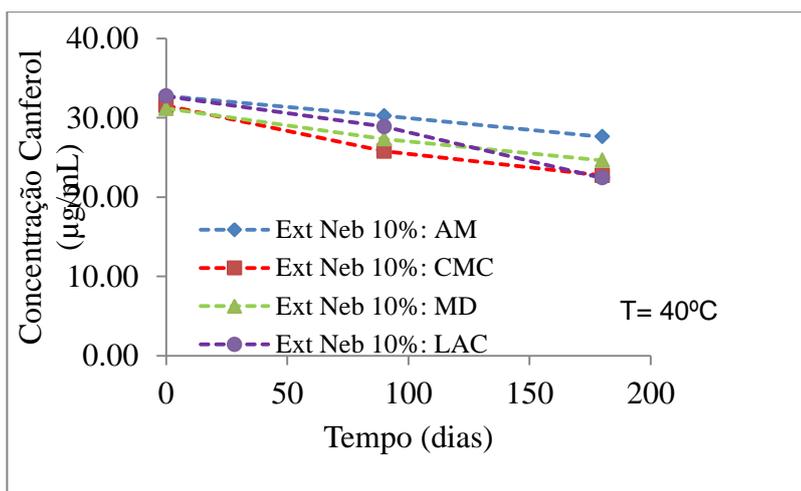


Tabela 19 - Parâmetros cinéticos do biomarcador canferol nos pré-formulados em condições de armazenamento a 40°C durante 180 dias.

Amostras	k (dias ⁻¹)			R^2			Fração decomposta
	k_0	k'	k''	R_0^2	R'^2	R''^2	$\alpha_{0,9}$ (dias)
EN: AM	-2.85E-02	0.9998	-9.00E-04	0.9985	3.00E-05	0.9960	129,75
EN: MD	-3.63E-02	0.9902	-1.30E-03	0.9956	5.00E-05	0.9989	71,26
EN: LAC	-5.74E-02	0.9788	-2.10E-03	0.9628	8.00E-05	0.9439	64,68
EN: CM	-4.89E-02	0.9699	-1.80E-03	0.9829	7.00E-05	0.9925	50,34

Tabela 20 - Parâmetros cinéticos do biomarcador quercetina nos pré-formulados, em condições de armazenamento a 40°C durante 180 dias.

Amostras	k (dias ⁻¹)			R^2			Fração decomposta
	k_0	k'	k''	R_0^2	R'^2	R''^2	$\alpha_{0,9}$ (dias)
EN: AM	-2.20E-02	0.9571	-4.00E-04	0.9607	8.00E-06	0.9642	252,42
EN: MD	-3.81E-02	0.8840	-8.00E-04	0.8911	2.00E-05	0.8984	107,3
EN: CM	-6.31E-02	0.9246	-1.40E-03	0.9376	3.00E-05	0.9501	70,52
EN: LAC	-7.95E-02	0.9658	1.60E-03	0.9783	3.00E-05	0.9884	66,26

Figura 20 - Cinética de degradação do canferol nos pré-formulados, (A) Ext Neb 10%: AM; Ext Neb 10%: AM: LC, ordem zero (B) Ext Neb 10%: MD, Ext Neb 10%: CMC, segunda ordem, durante o período de armazenamento à temperatura de 40°C.

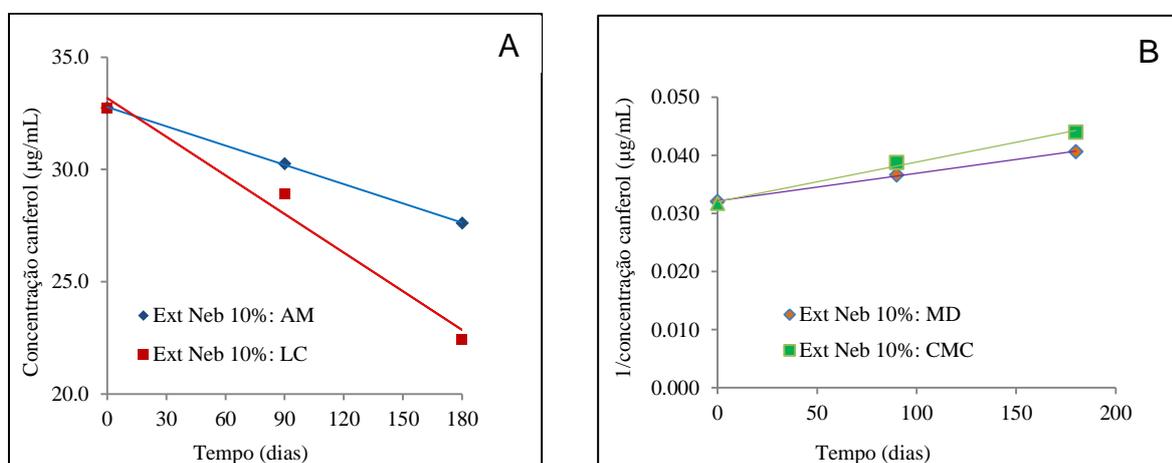
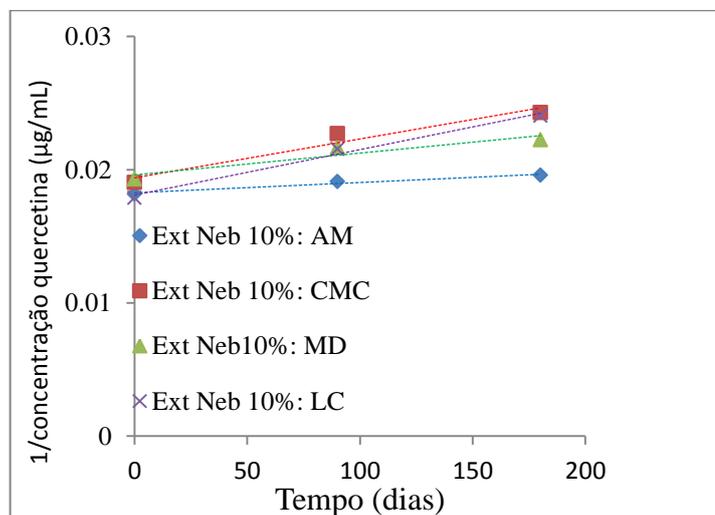


Figura 21 - Cinética de degradação da quercetina nos pré-formulados, Ext Neb 10%: AM; Ext Neb 10%: AM: LC; Ext Neb 10%: MD; Ext Neb 10%: CMC, segunda ordem, durante o período de armazenamento à temperatura de 40°C.



CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

A obtenção de extratos secos por *spray dryer* foi influenciada pelas variáveis independentes: temperatura de entrada de ar, razão de fluxo de entrada da composição e proporção de adjuvante. Sendo que a temperatura de entrada de ar e a proporção de adjuvante apresentaram maior influência sobre a concentração dos biomarcadores canferol e quercetina. Com o auxílio da metodologia de superfície resposta foi possível observar que a temperatura e a proporção de adjuvante apresentaram um efeito negativo sobre as respostas, sendo assim as maiores concentrações dos biomarcadores, foram observadas nas temperaturas mais baixas e nas menores proporções de adjuvante, definindo assim as condições operacionais ótimas do processo de secagem do extrato fluido de *P. pyramidalis*. O melhor rendimento do processo também foi observado na temperatura e proporção de adjuvante mais baixas.

O método desenvolvido por CLAE-DAD mostrou ser simples, linear, preciso, exato e específico, para quantificação simultânea do analitos canferol e quercetina nos extratos fluido e seco de *P. pyramidalis*, podendo ser aplicado na padronização e no controle de qualidade desta matéria-prima vegetal.

Os resultados obtidos no estudo de estabilidade acelerada realizado com os pré-formulados do extrato seco *P. pyramidalis*, demonstraram que houve diminuição dos teores de canferol e quercetina em todas as misturas estudadas, observando-se uma perda maior nos pré-formulados com lactose e menor nas misturas com amido. Os dois marcadores apresentaram modelos cinéticos diferentes, quando avaliados em cada amostra de pré formulado. Para o canferol foi definido o modelo cinético de ordem zero nas amostras com amido e lactose e de segunda ordem nas amostras com maltodextrina e celulose microcristalina, enquanto que a quercetina apresentou cinética de segunda ordem em todas as amostras de pré-formulados. Demonstrando assim que os excipientes exercem influência no perfil de degradação dos marcadores monitorados, embora os mesmos apresentem uma estrutura química muito semelhantes.

REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

AHMED, M. F.; RAO, A.S. simultaneous determination of phenolic compounds in *Brassica oleracea* L.var CAPITATA. by high-performance liquid chromatography. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.8, p.138-142, 2016.

ALBUQUERQUE U.P. et al. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, p. 325-354, 2007.

ALMEIDA, Priscila A. de et al. Development, Optimization and Validation of an HPLC-PDA Method for Quantification of Taxifolin in the Bark Extract of *Pinuspineaster*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, n. 9, p. 1648-1656, 2016.

ALVIANO, W.S. et al. In vitro antioxidant potential of medicinal plant extracts and their activities against oral bacteria based on Brazilian folk medicine. **Archives of oral biology**, v. 53, n. 6, p. 545-552, 2008.

ANTUNES, C. G. C. et al. Influência do armazenamento na qualidade fisiológica de sementes de *Caesalpinia pyramidalis* Tul. **Revista Árvore**, v. 34, n. 6, p. 1001-1008, 2010

ATANASOV, Atanas G. et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. **Biotechnology advances**, v. 33, n. 8, p. 1582-1614, 2015.

AZIZ, M. A. et al. Traditional uses of medicinal plants reported by indigenous communities and local herbal practitioners of Bajaur Agency, Federally Administrated Tribal Areas, Pakistan. **Journal of Ethnopharmacology**, v.198, p. 268-281, 2017.

AZMIR, Jannatul et al. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review. **Journal of Food Engineering**, v. 117, n. 4, p. 426-436, 2013.

BACCARIN, Thaisa et al. Influence of process conditions on physicochemical properties and antinociceptive activity in vivo of spray-dried *Rapanea ferruginea* Mez. stem bark extract. **Powder Technology**, v. 291, p. 66-74, 2016.

BAHIA, M.V. et al. Biflavonoids and other phenolics of *Caesalpinia pyramidalis* (Fabaceae). **Journal Brazilian Chemical Society**, v.16, p. 1402-1405, 2005

BAHIA, M.V.; DAVID^a, J. P.; DAVID^b, J. M.; Occurrence of biflavones in leaves of *Caesalpinia pyramidalis* specimens. **Química Nova**, v.33, p. 297-300, 2010

BARBOSA JUNIOR, A. M. et al. Comparative study of the susceptibility of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* (Sanfelice) against some antifungal agents of hospital use and plant extracts obtained from medicinal plants of the semiarid Sergipe region, Brazil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 1, p. 120-132, 2015.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.; BRUNS, R. **Planejamento e otimização de experimentos**. UNICAMP, Campinas, 1996. p.66.

BAS, D.; BOYACI, I. Modeling and optimization II : Comparison of estimation capabilities of response surface methodology with artificial neural networks in a biochemical reaction. **Journal Food Engenier**, 78, p.846–854, 2007.

BASSANI, V. L.; GONZALES, O. G.; PETROVICK, P. R. Desenvolvimento tecnologicode produtos fitoterapicos. **Revista Fitos**, v. 1, n. 1, p. 14-17, 2005.

BAZARIA, B; KUMAR, P. Optimization of spray drying parameters for beetroot juice powder using response surface methodology (RSM). **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, 2016.

BEZERRA, M. A. et al. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, v. 76, n. 5, p. 965-977, 2008.

BOHR, A. et al. Application of spray-drying and electrospraying/electrospinning for poorly water-soluble drugs: a particle engineering approach. **Current Pharmaceutical Design**, v. 20, n. 3, p. 325-348, 2014.

BORCHARDT, John K. The beginnings of drug therapy: Ancient mesopotamian medicine. **Drug News Perspect**, v. 15, n. 3, p. 187-192, 2002.

BORGES-DOS-SANTOS, R. R. et al. Biological effect of leaf aqueous extract of *Caesalpinia pyramidalis* in goats naturally infected with gastrointestinal nematodes. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, 2012.

BOTT R.F, LABUZA TP, OLIVEIRA, WP. Stability testing of spray- and spouted bed-dried extracts of *Passiflora alata*. **Drying Technology**, v. 28, p. 1255-1265, 2010

BRASIL. Ministério da Saúde. v Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos". **Diário Oficial da União**, Brasília, 02 de jun. 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 1, de 29 de julho de 2005. Determina a publicação do "Guia para realização de estudos de estabilidade". **Diário Oficial da União**, Brasília, 01 de agosto de 2005.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução-RDC nº 26, de 13 de maio de 2014. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 14 de maio de 2014.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos". **Diário Oficial da União**, Brasília, 25 de julho 2017.

CAL, Krzysztof; SOLLOHUB, Krzysztof. Spraydryingtechnique. I: Hardware and process parameters. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 99, n. 2, p. 575-586, 2010.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agent). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.33, p.179-89, 2000.

CAMPOS, S.C.L.; SILVA, C.G.L; CAMPANA, P.R.V.1; ALMEIDA, V.L.1. Toxicidade de espécies vegetais **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.18, (1), p.373-382, 2016.

CARTAXO, S.L.; SOUZA, M.M.A.; ALBUQUERQUE.; U. P. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 131, p. 326-42, 2010.

CARVALHO, A.C.B. et al. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no **Engenharia Sanitária e Ambiental**. v.10, n.2, p.106-110, 2005.

CHAUL, L.T, et al. Engineering spray-dried rosemary extracts with improved physicochemical properties: a design of experiments issue. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, n. 2, p. 236-244, 2017.

CHAVES, T.P. **Estudo químico-farmacológico do extrato seco de *Poincianella pyramidalis*(Tul.) L.P. Queiroz**. Trabalho de conclusão de curso (doutorado). Universidade

Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Etnobiologia e Conservação da Natureza. 2016.

CHONG, P. H, et al. Effects of spray drying conditions of microencapsulation of *Amaranthus gangeticus* extract on drying behaviour. **Agriculture and Agricultural Science Procedia**, v. 2, p. 33–42, 2014.

COSTA, A. C. de O. et al. Quantification of Chemical Marker of *Kalanchoe brasiliensis* (Crassulaceae) Leaves by HPLC–DAD. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 38, n. 7, p. 795-800, 2015.

COUTO, R. O. et al. Spray-dried rosemary extracts: Physicochemical and antioxidant properties. **Foodchemistry**, v. 131, n. 1, p. 99-105, 2012.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1830, n. 6, p. 3670-3695, 2013.

CRUZ, M.C.S. et al. Antifungal activity of Brazilian medicinal plants involved in popular treatment of mycoses. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 409–412, 2007

CUNICO, M. W. M. et al. Planejamento fatorial: uma ferramenta estatística valiosa para a definição de parâmetros experimentais empregados na pesquisa científica. **Visão Acadêmica**, v. 9, n. 1, p. 23, 2008.

D'ANDREA, G. Quercetin: A flavonol with multifaceted therapeutic applications. **Fitoterapia**, v. 106, p.256-271,2015.

DAZA, L. D. et al. Effect of spray drying conditions on the physical properties of Cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.) fruit extracts. **Food and Bioproducts Processing**, v. 97, p. 20-29, 2016.

DE LIMA, M. R. F. et al. Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants. **Journal of ethnopharmacology**, v. 105, n. 1, p. 137-147, 2006.

DE OLIVEIRA, W. P.; DE FREITAS, L. A. P.; FREIRE, J. T. Drying of pharmaceutical products. **Transport phenomena in particulate systems**, p. 148, 2012.

DEVALIYA, R.; SHIRSAT, M. Development and Validation of RP-HPLC Method for Quantification of Berberine in Ethanol Fraction of Methanol Extract and Developed Formulation of *Tinospora cordifolia*. **Oriental Journal of Chemistry**, v. 33, p.989-994, 2017.

DEVI, M.D.S. et al. Kaempferol and inflammation: From chemistry to medicine **Pharmacological Research**, v. 99, p. 1-10, 2015.

DINIZ, P.B.F, et al. Possible mechanisms of action of *Caesalpinia pyramidalis* against ethanol-induced gastric damage. **Journal Ethnopharmacology**, v. 168, p. 79-86, 2015

DISTASI, L. C. **Plantas Mediciniais: arte e ciência**. São Paulo: Unesp, 1996. 230p

DUTRA, R.C. et al. Medicinal plants in Brazil: pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological research**, v. 112, p. 4-29, 2016.

FUCINA, G. et al. Development and validation of a stability indicative HPLC–PDA method for kaurenoic acid in spray dried extracts of *Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski, Asteraceae. **Talanta**, v. 101, p. 530-536, 2012.

GAFNER, Stefan; BERGERON, Chantal. The challenges of chemical stability testing of herbal extracts in finished products using state-of-the-art analytical methodologies. **Current Pharmaceutical Analysis**, v. 1, n. 2, p. 203-215, 2005.

GALLO, L. et al. Influence of spray-drying operating conditions on *Rhamnus purshiana* (Cáscara sagrada) extract powder physical properties. **Powder Technology**, v. 208, n. 1, p. 205-214, 2011.

GEORGETTI, S.R. et al. Spray drying of the soybean extract: Effects on chemical properties and antioxidant activity. **LWT Food Science and Technology**, v. 41, n.2, p.1521–1527, 2008.

GESSER CESCA, T. et al. Validation of the stability-indicating HPLC method for the major flavonoids in spray-dried leaf extract of *Aleurites moluccana* L. Willd. **Current Pharmaceutical Analysis**, v. 8, n. 4, p. 349-359, 2012.

GOMES DE MELO, J. al. Antiproliferative activity, antioxidant capacity and tannin content in plants of semi-arid northeastern Brazil. **Molecules**, v. 15, n. 12, p. 8534-8542, 2010.

GOVINDARAGHAVAN, S.; SUCHER, N. J. Quality assessment of medicinal herbs and their extracts: Criteria and prerequisites for consistent safety and efficacy of herbal medicines. **Epilepsy&Behavior**, v. 52, p. 363-371, 2015.

HARVEY, A. L.; EDRADA-EBEL, R.A.; QUINN, R. J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, n. 2, p. 111-129, 2015.

HASLER, A.; STICHER, O.; MEIER, B. High-performance liquid chromatographic determination of five widespread flavonoid aglycones. **Journal of Chromatography A**, v. 508, p. 236-240, 1990.

HIEMORI, M; KOH, E; MITCHELL, A.E. Influence of cooking on anthocyanins in black rice (*Oryza sativa* L. *japonica* var. SBR). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 1908-1914, 2009.

INMETRO. Instituto Internacional de Metrologia. **Orientação sobre validação de métodos analíticos**. DOQ- CGCRE- 008 de fev. 2010 (revisão 3), 2010.

JAIN, V.; SHAIKH, M.S. Simultaneous RP-HPLC analysis of quercetin and kaempferol in different plant parts of *Cissus Quadrangularis*. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.6, p.534-537, 2014.

JIANG, B. et al. Extraction methods play a critical role in chemical profile and biological activities of black cohosh. **Natural product communications**, v. 3, n. 9, p. 1519-1532, 2008.

KAEFER, C. L. et al. Development and validation of a hplc-pda method and preliminary stability study of synephrine in *citrus aurantium* Dry extract. **Química Nova**, v. 38, n. 5, p. 709-714, 2015.

KHURI, A.I; MUKHOPADHYAY, S. Response surface methodology. **WIREs Computational Statistics**, 2010, 2: 128-149.

KLEIN, T. et al. Fitoterápicos : um mercado promissor. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v. 30, p. 241-248, 2010.

KRISHNAIAH, D., et al. Optimisation of spray drying operating conditions of *Morinda citrifolia* L. fruit extract using response surface methodology. **Journal of King Saud University-Engineering Sciences**, v. 27, n. 1, p. 26-36, 2015.

KRŪKLE-BĒRZIŅA, K.; ACTIŅŠ, A.. The effect of excipients on the stability and phase transition rate of xylazine hydrochloride and zopiclone. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 107, p. 168-174, 2015.

KWON, JOONG-HO et al. Effect of ethanol concentration on the efficiency of extraction of ginseng saponins when using a microwave-assisted process (MAP™). **International journal of food science & technology**, v. 38, n. 5, p. 615-622, 2003.

LANDIM, Leonardo P.; FEITOZA, George S.; DA COSTA, José GM. Development and validation of a HPLC method for the quantification of three flavonoids in a crude extract of *Dimorphandra gardneriana*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 1, p. 58-64, 2013.

LEUENBERGER, H.; LANZ, M. Pharmaceutical powder technology—from art to science: the challenge of the FDA's Process Analytical Technology initiative. **Advanced powder technology**, v. 16, n. 1, p. 3-25, 2005.

LIMA, M.R.F et al.. Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, p. 137–147, 2006.

LIST, P. H.; SCHMIDT, P.C. **Phytopharmaceutical Technology**. BocaRaton, Flórida, USA: CRC Press 1984, p.374, 2003.

LUNA, J.S. et al. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v.97 (2), p.199-206, 2005.

MAIA, G. N. Árvores e arbustos e suas utilidades. São Paulo: D & Z Computação gráfica e editora, 2004.

MARQUES, L. C.; VIGO, C. L. S. Preparacao e padronizacao de extratos vegetais. In: LEITE, J. P. V. **Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas**. Atheneu: Sao Paulo. p. 169- 204. 2009.

MELO, J.G. et al. Antiproliferative Activity, Antioxidant Capacity and Tannin Content in Plants of Semi-Arid Northeastern Brazil. **Molecules**, v. 15, p. 8534-8542, 2010

MENDES, C.C. et al. Constituents of *Caesalpinia pyramidalis*. **Fitoterapia**, v. 71, p. 205-207, 2000.

MIGLIATO, K. F. et al. Planejamento experimental na otimização da extração dos frutos de *Syzygium cumini* (L.) Skeels. **Quimica Nova**, v. 34, n. 4, p. 695-699, 2011.

MONTEIRO, J.M. et al. Teor de taninos em três espécies medicinais arbóreas simpátricas da caatinga. **Revista Árvore**, v. 29, p. 999-1005, 2005.

MORAES, J.P. et al. The Ethanol Extract of the Inner Bark of *Caesalpinia pyramidalis* (Tul.). Reduces Urinary Bladder Damage during Cyclophosphamide-Induced Cystitis in Rats. **Science World Journal**, v. 20, p.1-8, 2013.

MUTHUKUMAR, M.; MOHAN, D.; RAJENDRAN, M. Optimization of mix proportions of mineral aggregates using Box Behnken design of experiments. **Cement and Concrete Composites**, v. 25, n. 7, p. 751-758, 2003.

MUZAFFAR K, KUMAR P. Parameter optimization for spray drying of tamarind pulp using response surface methodology. **Powder Technology**, v. 279, p. 179-184, 2015

NOVAES, T.S et al. Atividade antibacteriana em alguns extratos de vegetais do semi-árido brasileiro. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13 supl2, p. 08-11, 2003.

NUNES, G. D. L.. **Investigação das Atividades Biológicas do Extrato Aquoso de *Poincianella pyramidalis* no controle de Hemoncose caprina**. Trabalho de conclusão de curso (Mestrado). Universidade Federal da Bahia, Salvador-BH. 2012.

OLIVEIRA W.P., BOTT R.F, SOUZA C.R.F. Manufacture of standardized dried extracts from medicinal Brazilian plants. **Drying Technology**, v. 24, p. 523-533, 2006.

OLIVEIRA, J. C. S. **Estudo químico e avaliação biológica do extrato das cascas das raízes de *Caesalpinia pyramidalis* Tul. (Leguminosae)**. Trabalho de conclusão de curso (Mestrado). Universidade Federal da Bahia, Salvador; 2010.

OLIVEIRA, J. C. S., DAVID^a, J. P., DAVID^b, J. M. Chemical composition of root barks and flowers of *Poincianella pyramidalis*(Fabaceae). **Química Nova**, v. 39, p. 189-193, 2016a.

OLIVEIRA, J. C. S., DAVID^a, J. P., DAVID^b, J. M. Biflavonoids from the bark roots of *Poincianella pyramidalis* (Fabaceae). **Phytochemistry Letters**, v. 16, p. 18-22, 2016b.

OLIVEIRA, K. B. de; OLIVEIRA, B. H. de. HPLC/DAD determination of rosmarinic acid in *Salvia officinalis*: sample preparation optimization by factorial design. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 24, n. 1, p. 85-91, 2013.

OLIVEIRA, O. W.; PETROVICK, P. R. Secagem por aspersão (spray drying) de extratos vegetais: bases e aplicações. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.20, p. 641-650, 2010.

OLSZEWSKA, M. Separation of quercetin, sexangularetin, kaempferol and isorhamnetin for simultaneous HPLC determination of flavonoid aglycones in inflorescences, leaves and fruits of three Sorbus species. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 48, p.629-635, 2008.

PATIL V.; CHAUHAN A.K.; SING R.P. Optimization of the spray-drying process for developing guava powder using response surface methodology. **Powder Technology**, v. 253, p. 230-236, 2014.

PEIXOTO, M. P. G.; FREITAS, L.A.P. Spray-dried extracts from *Syzygium cumini* seeds: physicochemical and biological evaluation. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 1, p. 145-152, 2013.

PERALTA-ZAMORA, P.; MORAIS, J. L.; NAGATA, N. Por que otimização multivariada? **Engenharia Sanitária e Ambiental**. v.10, n.2, p.106-110, 2005.

PINTO, Mariana Viana et al. Obtaining a dry extract from the *Mikania laevigata* leaves with potential for antiulcer activity. **Pharmacognosy magazine**, v. 13, n. 49, p. 76, 2017.

POWERS, R. F. Optimization models for logistics decisions. **Journal of Business Logistics**, v. 10, n. 1, p. 106, 1989.

PRADEEP, B.V. et al. Application of multifactorial experimental design for optimization of prodigiosin production using *Serratia marcescens* MBB01, MBB02 AND MBB05. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 9, p. 408-416, 2016.

PRISTA LN, ALVES, A.C, MORGADO, R. *Tecnologia Farmacêutica*. 1. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1996.

QUEIROZ L. P. **Leguminosas da Caatinga**. 1nd Ed. Feira de Santana (BA): Editora Universitária da UEFS; 2009.

RANGARI, V.D. **Pharmacognosy and phytochemistry**. Career Pub. (2nd ed) 2008;1:78–100.

RÊGO JÚNIOR, N. O. et al. Compostos bioativos e atividade antioxidante de extratos brutos de espécies vegetais da caatinga. **Brazilian Journal of Food Technology, Campinas**, v. 14, n. 1, p. 50-57, 2011.

RIBEIRO, A.R.S. et al. Gastroprotective activity of the ethanol extract from the inner bark of *Caesalpinia pyramidalis* in rats. **Journal of ethnopharmacology**, v. 147, n. 2, p. 383-388, 2013.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia seqüencial de planejamentos**. Campinas-SP: Casa do Pão Editora, 2005.

SACHAN, A. K.; KUMAR, A. Stability testing of herbal products. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 7, n. 12, p. 511-514, 2015.

SALVADOR, I. S. Estudos toxicológicos dos infusos e extratos secos nebulizados as drogas vegetais *Myracrodruon urundeuva* Allemão (aroeira), *Poinianella pyramidalis* Tul. (catingueira) e *Anadenanthera colubrina* var. cebil (angico). Trabalho de conclusão de curso (doutorado). Universidade Federal da Paraíba, 2017.

SANTANA, D.G. et al. Beneficial effects of the ethanol extract of *Caesalpinia pyramidalis* on the inflammatory response and abdominal hyperalgesia in rats with acute pancreatitis. **J.Ethnopharmacol.** v.142(2), p. 445-455, 2012.

SANTOS, C. A. Estudo farmacológico do extrato etanólico da entrecasca da *Caesalpinia pyramidalis* Tul. (Leguminosae). Trabalho de conclusão de curso (Dissertação) Universidade Federal de Sergipe, 2010.

SANTOS, A.C., et al. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Caesalpinia pyramidalis* in rodents. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 21(6), p. 1077-1083, 2011.

SANTOS, A.C. et al. Evaluation of mechanisms involved in the antinociception of the ethanol extract from the inner bark of *Caesalpinia pyramidalis* in mice. **Journal Ethnopharmacology** 148(1):205-209, 2013.

SARAIVA, Antonio Marcos et al. Antimicrobial activity and bioautographic study of antistaphylococcal components from *Caesalpinia pyramidalis* Tull. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, n. 1, p. 147-154, 2012.

SLADKOVSKY, R.; SOLICH, P.; OPLETAL, L. Simultaneous determination of quercetin, kaempferol and (E)-cinnamic acid in vegetative organs of *Schisandra chinensis* Baill. by HPLC. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 24, p.1049-1054, 2001.

SCHINOR, E. C. et al. Comparison of classical and ultrasound-assisted extractions of steroids and triterpenoids from three *Chresta* spp. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 11, n. 6, p. 415-421, 2004.

SCHWAAB, M; PINTO, J.C. **Análise de dados experimentais, volume II: planejamento de experimentos**, Rio de Janeiro: E-papers, 2011, 514p.

SCIBISZ, I; KALISZ, S; MITEK M. Thermal degradation of anthocyanins in blueberry fruit. **Zywnosc Nauka Technologia Jakosc**, v. 72, p. 56-66, 2010.

SHERIDAN, Cormac. Recasting natural product research. **Nature biotechnology**, v. 30, n. 5, p. 385, 2012.

SILVA, C.P; SANT'ANNA, A. P. Uma aplicação do planejamento de experimentos na indústria farmacêutica. **Sistemas e Gestão**, v.2, n.3, p. 274-284, 2007.

SILVA, L.B et al. Anatomia e densidade básica da madeira de *Caesalpinia pyramidalis* Tul. (Fabaceae), espécie endêmica da caatinga do Nordeste do Brasil. **Acta Botânica Brasileira**, v. 23, p. 436-445, 2009.

SILVA, C. H. T. P. da et al. Antioxidant capacity and phenolic content of *Caesalpinia pyramidalis* Tul. And *Sapium glandulosum* (L.) Morong from Northeastern Brazil. **Molecules**, v. 16, n. 6, p. 4728-4739, 2011.

SILVA, R. M. F. et al. Abordagem sobre os diferentes processos de secagem empregados na obtenção de extratos secos de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 1, p. 103-109, 2012.

SILVA, J.O. et al. Caracterização físico-química do extrato fluído e seco por nebulização de *Sympytmofficinale* L. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.2, n.16. 2006.

SIVAKUMAR, V. et al. Studies on the use of power ultrasound in solid-liquid myrobalan extraction process, **J. Clean. Prod.**, v.15.p.1813-818, 2007.

SONAGLIO, D. et al. Desenvolvimento tecnologico e producao de fitoterapicos. In: SIMOES,. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre/Florianopolis: UFRGS/UFSC, 2007. p. 289-326, 2007.

GOSMANN, G et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre/Florianopolis: UFRGS/UFSC, p. 289-326, 2007.

SOUZA M.Z. S.; ANDRADE L.R. S.; FERNANDES M.S.M.; Levantamento sobre plantas medicinais comercializadas na feira livre da cidade de Esperança – PB. **Biofar**, v. 5, p. 111-118, 2011

SOUZA, C.R. et al. Processing of *Rosmarinus officinalis* Linne extract on spray and spouted bed dryers. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 25, p. 59-69, 2008

SOUZA, T.P., **Desenvolvimento tecnológico e otimização de formas farmacêuticas sólidas contendo ao teor de produto seco por aspersão de *Phyllanthus niruri* L. (Euphorbiaceae)**, Trabalho de conclusão de curso (doutorado), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

SZENTMIHÁLYI, K. et al. Rose hip (*Rosa canina* L.) oil obtained from waste hip seeds by different extraction methods. **Bioresource Technology**, v. 82, n. 2, p. 195-201, 2002.

THIRUGNANASAMBANDHAM, K.; SIVAKUMAR, V. Influence of process conditions on the physicochemical properties of pomegranate juice in spray drying process: Modelling and optimization. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, 2015.

TOLEDO, A.C.O et al. Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. **Revista Lecta, Bragança Paulista**, v.21, n.1/2, p.7-13, 2003.

TOMAZZONI, M.I et al. Fitotrapia popular: a busca instrumental enquanto prática terapêutica. **Texto & Contexto Enfermagem**, v. 15, 2006.

TONON, R.V.; BRABET, C.; HUBINGER. M.D. Influence of process conditions on the physic chemical properties of acai powder produced by spray drying. **Journal of Food Engineering**, v. 88, p. 411-418, 2008.

TONON, R.V.; BRABET, C.; HUBINGER. M.D. Anthocyanin stability and antioxidant activity of spray-dried açai (*Euterpe oleracea* Mart.) juice produced with different carrier agents. **Food Research International**, v. 43, p. 907–914, 2010.

VASCONCELOS, E. A. F. et al. Influência da temperatura de secagem e da concentração de Aerosil® 200 nas características dos extratos secos por aspersão da *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, p. 243-249, 2005.

VEIT, M. Note for guidance on stability testing of existing herbal drug preparations and related herbal medicinal products. **Pharmaceutical Industry**, v. 64, p. 20-23, 2002.

VOIGT, R. **Pharmazeutische Technologie**. 9. Stuttgart: Wissenschaftliche, 2000.

WHO. **Quality control methods for medicinal plant materials**. WHO. Geneva, 1998.

WHO. World Health Organization Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations; Thirty-second report, **WHO Technical Report Series**, No.823, Geneva, 1992.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R.C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química nova**, v. 24, n. 1, p. 147-152, 2001.

ZANINE, A. M. et al. Composição bromatológica de leguminosas do semiárido brasileiro. **Livestock Research for Development**, v.17, p. 1-5, 2005.

ZU, Y. et al. Simultaneous determination of catechin, rutin, quercetin kaempferol and isorhamnetin in the extract of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaves by RP-HPLC with DAD. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 41, n. 3, p. 714-719, 20

APÊNDICE

APÊNDICE

Apêndice A - Artigo Científico Publicado no International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences.

Apêndice B - Artigo Científico Publicado no Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research.

Apêndice A - Artigo Científico Publicado no International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences.



International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences

ISSN- 0975-1491

Vol 9, Issue 6, 2017

Original Article

THERMAL DEGRADATION KINETICS OF KAEMPFEROL AND QUERCETIN IN THE PRE-FORMULATED OF THE STANDARDIZED EXTRACTS OF POINCIANELLA PYRAMIDALIS (TUL.) L. P. QUEIROZ OBTAINED BY SPRAY DRYER

AGNA HÉLIA DE OLIVEIRA^a, RENATA DA SILVA LEITE^b, FABRÍCIO HAVY DANTAS^b, VALMIR GOMES DE SOUZA^a,
JOSÉ VENÂNCIO CHAVES JÚNIOR^a, FÁBIO SANTOS DE SOUZA^a, RUI OLIVEIRA MACEDO^a

^aDepartamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brazil, ^bDepartamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil
Email: agnahelia@yahoo.com.br

Received: 05 Jan 2017 Revised and Accepted: 29 Apr 2017

ABSTRACT

Objective: The aim of this work was to evaluate the stability and determine the kinetic parameters of degradation of biomarkers kaempferol and quercetin in the pre-formulated of the extract of *Poincianella pyramidalis* obtained by a spray dryer.

Methods: A 2³ experimental design coupled with RSM was applied to evaluate and optimize the effects of processing parameters on the content of chemical markers in dry extracts by a spray dryer. Stability testing was performed to verify the influence of temperature on the degradation of kaempferol and quercetin present in the pre-formulated. The markers contents were determined by HPLC.

Results: Surface response analysis showed the influence of the independent variables on the responses of the concentration kaempferol and quercetin biomarkers on the process. The variables of the inlet air temperature, flow feed rate and the adjuvant ratio presented negative responses with significant difference ($p < 0.05$). According to the data obtained in the stability of the pre-formulated studied zero and second orders kinetics models the for degradation of the kaempferol and only second order kinetic model for the quercetin. It was also evaluated reducing the concentration of both biomarkers studied throughout the study.

Conclusion: In the present study, it was observed that all independent variables of the drying process by spray dryer showed the greatest influence on the concentration of the studied markers. Two markers had a different thermal behavior compared to the different excipients studied and there was degradation of both the quercetin biomarker and kaempferol during the study period.

Keywords: *Poincianella pyramidalis*, Spray dryer, Excipients, Stability

© 2017 The Authors. Published by Innovare Academic Sciences Pvt Ltd. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)
DOI: <http://dx.doi.org/10.22159/ijpps.2017v9i6.16935>

INTRODUCTION

Poincianella pyramidalis (Tul.) L. P. Queiroz is an arboreal species belonging to the family Fabaceae, endemic to the northeastern region of Brazil, mainly in the caatinga biome, popularly known as "catingueira", "pau de porco", "catinga de porco", "pau de rato", "mussilaba" e "catingueira-das-folhas-largas"[1]. It is used in traditional medicine for the treatment of gastritis, colic, diarrhea, asthma, bronchitis, diabetes, as an expectorant, cicatrizant, anti-inflammatory and diuretic [2-5].

Due to the great diversity of traditional uses and the importance of this species to the caatinga biome, several researchers from different areas of knowledge have shown interest in the study of this species. Phytochemical investigations have demonstrated the presence of secondary metabolites, such as flavonoids, diterpenes, tannins and lignans [6-10]. Several biological activities have already been tested with this species, among which we can highlight the antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella spp.*, *S. Aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, antioxidant, gastro protective, anti-inflammatory, antinociceptive and anthelmintic activity, which corroborates many of its traditional uses. Due to these proven pharmacological properties, this species has a great potential for the development of a herbal medicine with ample spectrum of action [11-16].

Obtaining standardized plant extracts has been one of the major challenges for the development of herbal medicines, especially in Brazil, and the herbal industry has sought alternatives to solve this problem, one of which would be the production of standardized dried extracts of medicinal plants aiming establishment of quality control parameters for the vegetable raw material [17-19].

Spray drying is one of the most commonly used drying techniques in the preparation of dried vegetable extracts, providing products with suitable technological properties in a short time of drying and with a high production capacity [20-21], however this process can also be affected significantly by parameters such as air inlet temperature, feed flow rate and concentration of carrier agent in the mixture [22-23]. Response surface methodology (RSM) is a widely used tool to evaluate the effects of the various factors in the process and to define the best conditions for the desired responses [23-25].

Ensuring the stability of the plant extracts is essential to preserve the quality, safety and efficacy of the final product, accelerated stability studies are considered predictive tools with emphasis on qualitative results, but of great use for the design of new formulations and products. Since from the first signs of instability of a drug or marker, it is possible to assist in the identification of potential problems of development, as well as to articulate strategies of stabilization and to suggest ways to optimize the manufacturing processes [26].

The aim of this work was to determine the thermal degradation kinetics of the biomarkers kaempferol and quercetin in the preformulated dry extract of *Poincianella pyramidalis*.

MATERIALS AND METHODS

Herbal material and chemicals

Leaves of *Poincianella pyramidalis*, were collected in the city of Serra Branca, State of Paraíba, Brazil. (7°30'51.1"S 36°41'91.5"O). The voucher specimen are deposited at the herbarium Lauro Pires Xavier of the Federal University of Paraíba, Brazil, under number NC36. The herbal material was dried in an oven with circulating air

(Tecnal®, Model TE-394-4), at 40°C. After drying the material was reduced in an industrial mill to obtain the powder.

In the present study, the ethanol absolute (Toscano®, Brazil), chloroform and hexane, analytical grade (Vetec®, Brazil), methanol grade HPLC (Tedia Brazil, Rio de Janeiro, RJ, Brazil) Anhydrous phosphoric acid (Merck®, Germany) were used. The water was purified using a Milli-Q system (Millipore, Massachusetts, USA).

The analytical standards kaempferol (purity: 98%) and quercetin (purity: 97%) were obtained from Sigma-Aldrich®. The pharmaceutical excipients: microcrystalline cellulose 102 (MC) starch (ST), lactose (LC), maltodextrin (MD) and carrier agent colloidal silicon dioxide 200 (CSD) were all purchased from Brazilian suppliers.

Preparation of hydro alcoholic extract

The leaf powder was subjected to maceration with ethanol-water 50:50 (v/v) at plant: solvent ratio of 20:100 (w/v), for a period of 120 h at room temperature. The extractive conditions were previously studied and optimized by our research group, in order to obtain the best yield of the biomarkers kaempferol and quercetin.

Spray drying

The spray-drying process was carried out in a mini Spray-Dryer (LabPlant®, model SD-05, Huddersfield, UK), with a concurrent flow regime, equipped with a peristaltic pump connected to a two-fluid atomizer, with an internal orifice of 1.2 mm, which operated with an air flow rate, $W_f=40L/min$ and constant pressure of 2.0 bar. The

operating parameters of the process were following: drying air inlet temperature (160, 170 and 180 °C), air flow feed rate of the drying composition fed to the spray drying (4, 6 and 8 ml/min) and proportion of colloidal silicon dioxide in the drying composition (10, 15 and 20%).

Experimental design

A 2³⁺¹ factorial experimental design coupled with surface response methodology (RSM) was applied to evaluate and optimize the effects of processing parameters on the content of chemical markers kaempferol (Y₁) and quercetin (Y₂). Therefore were investigated the individual and interactive effects of the following independent variables: drying air inlet temperature (X₁), air flow feed rate of the drying composition fed to the spray drying (X₂) and proportion of colloidal silicon dioxide in the drying composition (X₃). Table 1 shows the coded and encoded values in the design experimental.

Statistical analysis

The experimental data were analyzed with the aid of the Statistica 13.1 software program (Dell Inc., Tulsa, USA). The results were expressed as mean±SD and coefficient of variation. The means were compared using ANOVA/SRM. Differences were considered statistically significant at p<0.05 and larger values were not considered. A total of 9 experiments runs were performed, including the medium point, with nine, replicates for each of them.

The parameters of the kinetic models and the arrhenius equation were obtained by linear regression. The order of reaction was chosen by comparing the correlation coefficients.

Table 1: Factors coded and non-coded and their levels in fractional factorial design (2³⁺¹)

Runs	X ₁ (IT)	X ₂ (FFR)	X ₃ (CSD)	IT (°C)	FFR (ml/min)	CSD (%)
1	-1	-1	-1	160	4	10
2	-1	+1	-1	160	4	10
3	-1	-1	+1	180	8	20
4	-1	+1	+1	180	8	20
5	+1	-1	-1	180	4	10
6	+1	+1	-1	160	4	10
7	+1	-1	+1	180	8	20
8	+1	+1	+1	180	8	20
9	0	0	0	170	6	15

IT: air inlet temperature, FFR: air flow feed rate of the drying composition, CSD: the proportion of colloidal silicon dioxide.

Pre-formulated

Pre-formulated were prepared from fysical mixtures of the nebulized extract (NE) and the following pharmaceutical excipients: starch (ST), microcrystalline cellulose 102 (MC), maltodextrin (MD) and lactose (LC) in the proportion of 1:1. The powder of the blends was calibrated in 48 mesh sieves and mixed mechanically for 15 min. The tests were performed in 9 replicates.

Quantification of chemicals markes quercetin and kaempferol

The quercetin and kaempferol contents were determined using High-performance liquid chromatography (Shymadzu, Tokyo, Japan), equipped with LC-20 AT multi-solvent supply system, DGPU-20A5 degassing system, SIL-20A auto-sampler, CTO-20A column furnace and detection by electron spectrometry in the ultraviolet-visible region with SPD-M20A UV-VIS diode array, at 370 nm. The mobile phase used was a mixture of methanol: phosphoric acid 1% (47%: 53%) in the isocratic system, pH 3.1 and flow of 1.2 ml/min. The stationary phase was a C-18 Gemini 5µ, 150 x 4.6 mm x 0.5µm (Phenomenex) column.

Samples were prepared according to the previously described methodology [27]. A standard solution 4µg/ml of de kampferol and quercetin was prepared with methanol: water (70:30). All sample and standard solutions were filtered through 0.45 µm PTFE membrane (Millipore, Massachusetts, USA).

The method was previously validated by our working group. Parameters of validation, such as selectivity, linearity, detection and quantification limits and precision were established according to ICH Q2B [28]. The calibration curve was found to be linear over a kaempferol and quercetin concentration range of 0.4 to 7.6 µg/ml presenting a coefficient of the linear regression analysis was within>0.999. The Limit of Detection (LOD) for kaempferol and quercetin were 0.07 and 0.18 µg/ml, respectively. The Limit of Quantification (LOQ) for kaempferol and quercetin were 0.22 and 0.56 µg/ml, respectively. The method proved to be robust for small, deliberate changes in temperature, flow and pH of the mobile phase with RSD % <3.0%. The Relative Standard Deviation (%) values for markers (intra- and inter-day precision studies) were <5.0% and the accuracy was >95%.

Stability testing

Stability testing was performed to verify the influence of temperature on the degradation of bioactive compounds, present in the pre-formulated. Kaempferol and quercetin were used as chemicals markers. The tests were carried in a B. O. D (Tecnal TE-371) incubator with temperature control, for a period of 180 d under a temperature 40±2 °C. Approximately 3g of samples was placed in hermetic PVC-aluminum sachets. The amount of the kaempferol and quercetin markers were periodically analyzed (90 and 180 d) by HPLC and compared to that present at zero time. The assays were carried out in 9 replicates.

For the determination of kinetic parameters of reaction order (n) and decomposition rate constant (k) the Arrhenius equation was used:

$$\kappa = Ae^{-\frac{E_a}{RT}} \quad (1)$$

Where:

κ is the chemical reaction rate, Ae is the pre-exponential factor, E_a is the activation energy (J/mol), R is the ideal gas constant (8.314J/mol. K) and T is the absolute temperature.

Experimental data of kaempferol and quercetin degradation were fitted by zero and second-order kinetic models, given by Eqs. (2) and (3), respectively [29].

The zero-order reaction rate was obtained directly from the mass data and plotted against time according to the following equation:

$$C = C_0 - \kappa t \quad (2)$$

Where:

C is concentration at time t , C_0 is initial marker concentration, and κ' is the reaction constant zero-order.

The second-order reaction, the inverse of the concentration is plotted versus at time t , according to the following equation:

$$\frac{1}{[C]} = \frac{1}{[C_0]} + \kappa''t \quad (3)$$

Where:

C is concentration at time t , C_0 is initial marker concentration, and κ'' is the reaction constant second-order.

RESULTS AND DISCUSSION

Effect of drying operating conditions on the concentration of monitored chemical markers

According to the data obtained, it was verified that the operational conditions of drying by dry spray influenced the concentration of the two chemical markers studied, kaempferol and quercetin, a fact explained by the physicochemical characteristics. Table 2 shows the total number of experiments that were carried out and the concentrations of the chemical markers obtained in each of them, where it was observed that the highest concentration obtained for the kaempferol and quercetin markers, respectively, was in experiment 7 (0.87 mg/g±0.02 and 1.55 mg/g±0.04), corroborating with the response surface graphs (fig. 1), which show that the concentrations of the markers increase with minimum levels of the three factors studied, whereas the lowest concentrations recorded were obtained in experiments 1 and 5 for kaempferol and 1 and 8 for quercetin.

Table 2: Experimental design for spray drying runs, independent variables, with their corresponding response values

Run	Independent variables			Response 1	Response 2
	IT (°C)	FFR (ml/min)	SDC (%)	Kaempferol content (mg/g)*	Quercetin content (mg/g)*
1	180	4	20	0.68±0.02	1.28±0.05
2	180	8	20	0.70±0.02	1.34±0.03
3	180	4	10	0.75±0.03	1.39±0.05
4	160	8	10	0.79±0.03	1.44±0.06
5	160	8	20	0.68±0.02	1.31±0.04
6	180	8	10	0.74±0.03	1.35±0.06
7	160	4	10	0.87±0.02	1.55±0.04
8	160	4	20	0.75±0.01	1.28±0.05
9	170	6	15	0.79±0.03	1.45±0.06

*Values represent the mean±Standard deviation (n = 9), IT: air inlet temperature, FFR: air flow feed rate of the drying composition, CSD: proportion of colloidal silicon dioxide

Table 3 and fig. 1 shows the effects between the selected independent variables (IT, FFR and CSD) on the development and optimization of the drying process of the *P. pyramidalis* extract, using as a response the concentration of the markers kaempferol and quercetin.

Statistical analysis of the experimental data (table 3) showed that both the quercetin and kaempferol concentrations were significantly influenced by all the independent variables when the primary effects were evaluated, being the air inlet temperature (X_1) and the carrier ratio (X_2) were the most important variables in the analysis of the responses. The secondary effects were too observed for both responses in the following interactions: IT (X_1) x FFR (X_2) and IT (X_1) x CSD (X_3), with significance level $p < 0.05$. The tertiary interaction between IT x FFR x CSD factors exerted significant influence only on quercetin label. This shows that the concentrations obtained are also influenced by the nature of chemical markers.

Surface response analysis was used to evaluate the individual variables and interactive effects on drying process investigated in this study. A 3D response surface plot (fig. 1) showed the influence of the individual and secondary effects studied on the responses. The negatives effects of the inlet air temperature (X_1) and the adjuvant ratio (%) on the responses showed a significant difference ($p < 0.05$). This can be explained by the fact that at a higher temperature has a direct impact in the degradation of chemical compounds of the extract. Similar results were described by Thirugnanasambandham and Siva Kumar in the study of the influence of process conditions on the physicochemical properties of pomegranate juice in spray drying process [30] and by Patil, Chauhan and Singh, who performed a work for optimization of the spray-drying process for developing guava powder using response surface methodology [24]

Table 3: Summary of significant factor effects according to ANOVA

Independent variable	p-value	
	Kaempferol content	Quercetin content
IT (X_1)	0.000000*	0.000000*
FFR (X_2)	0.000972*	0.000444*
CSD% (X_3)	0.000000*	0.000000*
IT (X_1) x FFR (X_2)	0.001395*	0.000665*
IT (X_1) x CSD% (X_3)	0.000624*	0.015135*
FFR (X_2) x CSD% (X_3)	0.342668	0.129123
IT (X_1) x FFR (X_2) x CSD% (X_3)	0.280519	0.030913*

* $p < 0.05$ significant effect

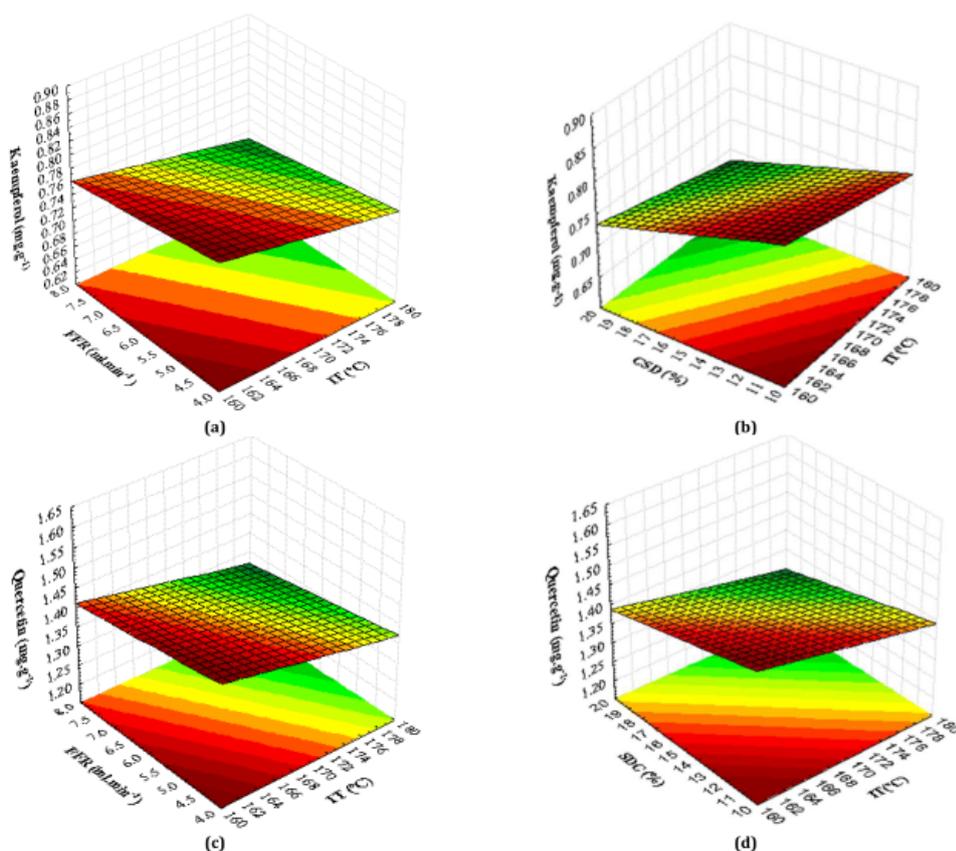


Fig. 1: Response surface showing the effects of the process parameters, air inlet temperature, air flow rate of the drying composition, proportion of colloidal silicon dioxide in kaempferol and quercetin contents

Stability testing

The Arrhenius method was used to determine the decomposition kinetic parameters following: reaction order (n), decomposed fraction $\alpha_{0.9}$ and rate constant (k).

Table 4 shows the kinetic parameters and regression coefficients (R^2) that defined two kinetic models for the biomarker kaempferol, zero order kinetic model for the preformulated NE: ST and NE: LAC and second order model kinetic for following binaries mixtures: NE: MC 102, this shows that the excipients directly influenced in the kaempferol degradation kinetics.

The values of the degradation constants of kaempferol marker are in accordance with the laws of classical kinetics, which showed an exponential progression in relation to the temperature (fig. 2). According to the results obtained in the kinetic study, the times corresponding to the fraction decomposed $\alpha_{0.9}$ of the concentrations of the marker studied presented values in the range 50.90 to 64.68 d, demonstrating a variation in the stability of the pre-formulated, with the following order of stability: NE: ST<NE: MC 102<NE: MD<NE: LAC.

The pre-formulations showed a second order kinetic degradation for the marker quercetin since the rate constants presented an

exponential behavior based on correlation coefficients (R^2) (fig. 3). The quercetin biomarker, a second-order kinetic model was defined for all preformulated, thus suggesting that the quercetin marker has a similar thermal behavior for the four excipients studied. The degradation constants showed that the kinetic decomposition profiles of ESN: ST, ESN: MMC 102 and ESN: MD showed differences in the times corresponding to the decomposed fraction $\alpha_{0.9}$ with variations between 67.31 to 107, 3 d (table 4).

The mechanism of flavonoids thermal degradation was explained by Scibisz, who suggested that under the influence of heat, glycosidic bonds in dye molecules undergo hydrolysis leading to unstable aglycones [31]. Also, it has been explained that polyphenols stability, eg. Anthocyanin, a decreases with increasing number of free hydroxyl groups in the B-ring increase [32]. The results obtained in this study are in agreement with others studies reported and indicate that the spouted bed and spray dryer extracts of medicinal plants, eg. *Passiflora alata* tended to be hygroscopic and have a short shelf life. The dried extracts of a medicinal plants are a very complex mixture of chemical substances and each one likely degrade at a different rate. However, the use of packaging with low water vapor permeability, for example, laminated aluminium film, and lower storage temperatures would significantly increase the product stability [33].

Table 4: Kinetics parameters of the chemical markers on the preformulated on conditions storage 40°C during 180 d

Samples	Kaempferol				Quercetin			
	k (d ⁻¹)	R ²	Decomposed fraction α _{0,9} (d)	Kinetic model	k (d ⁻¹)	R ²	Decomposed fraction α _{0,9} (d)	Kinetic model
ESN: ST	-2.85E-02	0.999	64,42	Zero-Order	1.00E-03	0.964	67,31	Second-Order
ESN: MMC 102	7.00E-05	0.993	63,21	Second-Order	1.00E-03	0.950	70,52	Second-Order
ESN: MD	5.00E-05	0.999	50,90	Second-Order	1.00E-03	0.898	107,3	Second-Order
ESN: LAC	-5.74E-02	0.970	64,68	Zero-Order	2.00E-03	0.988	248,5	Second-Order

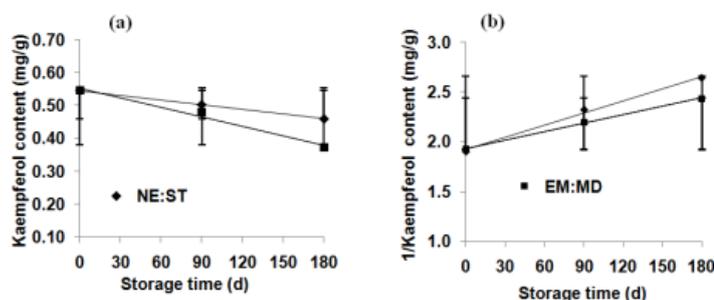


Fig. 2: Degradation kinetic kaempferol of the preformulated during times storage: (a) nebulized: starch, nebulized: lactose zero-order model (b) nebulized: maltodextrin, nebulized: microcrystalline cellulose, second-order model

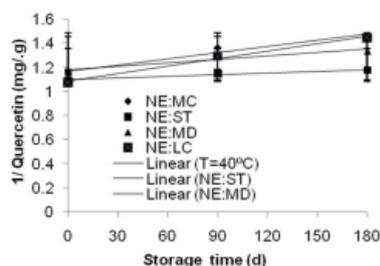


Fig. 3: Degradation kinetic quercetin of the preformulated during times storage

CONCLUSION

In the present study, the effects of the spray dryer process conditions, such as IT, FFR and CSD, on the following responses were evaluated: the levels of the phytochemical markers quercetin and canferol in obtaining the dry extract of *Polcianella pyramidalis* and the results showed that all the responses studied were significantly affected by the process conditions, and the IT and CSD were the independent variables that showed the greatest influence on the concentration of the studied markers. The analysis of the surface methodology allowed to define the optimum conditions of the process, to obtain the maximum concentrations of the monitored markers.

The stability study of the preformulateds showed a king different degradation kinetics for the kaempferol phytochemical marker, with zero order and second order kinetics, while the quercetin marker showed second order degradation kinetics, thus demonstrating that the two markers have a different thermal behavior compared to the different excipients studied.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors acknowledge the fellowships received from Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq)

AUTHOR CONTRIBUTION

Oliveira AH, performed analysis of all samples, interpreted data, wrote the manuscript and acted as the corresponding author; Leite, RS, Souza VG and Júnior, JVC and Dantas, FH, helped to carry out the experiments, data analysis, collection, and interpretation. Macêdo, RO, Souza, FS, supervised the development of work, helped in data interpretation and manuscript edition and evaluation, performed a critical revision of the article.

CONFLICT OF INTERESTS

The authors have not declared any conflict of interests

REFERENCES

- Queiroz LP. Leguminosas da Caatinga. 1^a Ed. Feira de Santana (BA): Editora Universitária da UEFS; 2009.
- Albuquerque UP, Medeiros PM, Almeida ALS, Monteiro JM, Lins Neto EMF, Melo JG, et al. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. J Ethnopharmacol 2007;114 Suppl 3:325-54.
- Cartaxo SL, Souza MMA, Albuquerque UP. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. J Ethnopharmacol 2010;131 Suppl 2:326-42.
- Souza MZS, Andrade LRS, Fernandes MSM. Levantamento sobre plantas medicinais comercializadas na feira livre da cidade de Esperança-PB. Biofar 2011;5 Suppl 1:111-8.
- Bahia MV, David JP, David JM. The occurrence of flavonoids in leaves of *Caesalpinia pyramidalis* specimens. Quim Nova 2010;33 Suppl 6:1297-300.
- Bahia MV, Santos JB, David JP, David JM. Biflavonoids and other phenolics of *Caesalpinia pyramidalis* (Fabaceae). J Braz Chem Soc 2005;16 Suppl 6b:1402-5.
- Melo JG, Araújo TAS, Castro VTNA, Cabral DLV, Rodrigues MD, Nascimento SC, et al. Antiproliferative activity, antioxidant

Oliveira et al.

Int J Pharm Pharm Sci, Vol 9, Issue 6, 123-128

- capacity and tannin content in plants of semi-arid Northeastern Brazil. *Molecules* 2010;15 Suppl 12:8534-42.
8. Mendes CC, Bahia MV, David JM, David JP. Constituents of *Caesalpinia pyramidalis*. *Fitoterapia* 2000;71 Suppl 2:205-7.
 9. Monteiro JM, Lins Neto EMF, Amorim ELC, Strattmann RR, Araújo EL, Albuquerque UP. Teor de taninos em três espécies medicinais arbóreas simpátricas da caatinga. *Rev Arvore* 2005;29 Suppl 6:999-1005.
 10. Oliveira JCS. Estudo químico e avaliação biológica do extrato das cascas das raízes de *Caesalpinia pyramidalis* Tul. (Leguminosae). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal da Bahia, Salvador; 2010.
 11. Ribeiro AR, Diniz PF, Estevam CS, Pinheiro M, Albuquerque-Jr RLC, Thomazzi S. Gastroprotective activity of the ethanol extract from the inner bark of *Caesalpinia pyramidalis* in rats. *J Ethnopharmacol* 2013;147 Suppl 2:383-8.
 12. Giulietti AM, Soares MBP, Santos RR. Atividade antibacteriana em alguns extratos de vegetais do semiárido brasileiro. *Rev Bras Farmacogn* 2003;13 Suppl 2:4-7.
 13. Pereira Jr LR, Andrade AP, Araújo KD, Barbosa AS, Barbosa FM. Espécies da caatinga como alternativa para o desenvolvimento de novos fitofármacos. *Floresta Ambient* 2014;21 Suppl 4:509-20.
 14. Santana DG, Santos CA, Santos ADS, Nogueira PCL, Thomazzi SM, Estevam CS, et al. Beneficial effects of the ethanol extract of *Caesalpinia pyramidalis* on the inflammatory response and abdominal hyperalgesia in rats with acute pancreatitis. *J Ethnopharmacol* 2012;142 Suppl 2:445-55.
 15. Santos AC, Ailane MPR, Passos FCA, Camargo EA, Estevam CS, Santos MRV, et al. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Caesalpinia pyramidalis* in rodents. *Braz J Pharmacogn* 2011;21:1077-83.
 16. Santos CA. Estudo farmacológico do extra to etanólico da entrecasca da *Caesalpinia pyramidalis* Tul. (Leguminosae). Dissertação de Mestrado-Universidade Federal da Paraíba, Aracajú; 2010.
 17. Souza CR, Shave to IA, Thomazini FCF, Oliveira WP. Processing of *Rosmarinus officinalis* Linne extracts on spray and spouted bed dryers. *Braz J Chem Eng* 2008;25:59-69.
 18. Oliveira WP, Bott RF, Souza CRF. Manufacturer of standardized dried extracts from medicinal Brazilian plants. *Drying Technol* 2006;24:523-33.
 19. Bott RF, Labuza TP, Oliveira WP. Stability testing of spray and spouted bed-dried extracts of *Passiflora alata*. *Drying Technol* 2010;28:1255-65.
 20. Thirugnanasambandham K, Sivakumar V, Prakash JN. Optimization of electrocoagulation process to treat grey wastewater in batch mode using response surface methodology. *J Environ Health Sci Eng* 2014;12:29.
 21. Sarala M, Velu V, Anandharamakrishnan C, Singh RP. Spray drying of *Tinospora cordifolia* leaf and stem extract and evaluation of antioxidant activity. *J Food Sci Technol* 2012;49:119-22.
 22. Tonon RV, Brabet C, Hubinger MD. Influence of process conditions on the physico-chemical properties of acal powder produced by spray drying. *J Food Eng* 2008;88:411-8.
 23. Muzaffar K, Kumar P. Parameter optimization for spray drying of tamarind pulp using response surface methodology. *Powder Technol* 2015;279:179-84.
 24. Patil V, Chauhan AK, Sing RP. Optimization of the spray-drying process for developing guava powder using response surface methodology. *Powder Technol* 2014;253:230-36.
 25. Pradeep BV, Akilandeswari P, Usha RV, Palaniswamy M. Application of multifactorial experimental design for optimization of prodigiosin production using *Serratia marcescens* MBB01, MBB02, AND MBB05. *Asian J Pharm Clin Res* 2016;9:408-16.
 26. Veit, M. Note for guidance on stability testing of existing herbal drug preparations and related herbal medicinal products. *Pharm Indian* 2002;64:20-3.
 27. Leite RS, Souza VG, Oliveira AH, Júnior JVC, Salvador IS, Andrade FHD, et al. Standardization and stability evaluation of dry extracts of *Myracrodruon urundeuva* Allemão obtained by spray drier. *Int J Pharm Pharm Sci* 2017;9:154-9.
 28. ICH Q2B. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation Research. Guidance for industry: ICH Q2B Validation of analytical procedures: methodology. Rockville; 1995.
 29. Klu MW, Addy BS, Oppong EE, Sakyi ES, Mintah NM. Effect of storage conditions on the stability of ascorbic acid in some formulations. *Int J Appl Pharm* 2016;8:26-31.
 30. Thirugnanasambandham K, Sivakumar V. Influence of process conditions on the physicochemical properties of pomegranate juice in spray drying process: Modelling and optimization. *J Saudi Soc Agric Sci* 2015.
 31. Scibisz I, Kalisz S, Mitek M. Thermal degradation of anthocyanins in blueberry fruit. *Zywn Nauk Technol Ja* 2010;72:56-66.
 32. Hiemori M, Koh E, Mitchell AE. Influence of cooking on anthocyanins in black rice (*Oryza sativa* L. *japonica* var. SBR). *J Agric Food Chem* 2009;57:1908-14.
 33. Bott RF, Labuza TP, Oliveira WP. Stability testing of spray and spouted bed-dried extracts of *Passiflora alata*. *Drying Technol* 2010;28:1255-65.
- How to cite this article**
- Agna Hélia De Oliveira, Renata Da Silva Leite, Fabrício Havy Dantas, Valmir Gomes De Souza, José Venâncio Chaves Júnior, Fábio Santos De Souza, Rui Oliveira Macedo. Thermal degradation kinetics of kaempferol and quercetin in the pre-formulated of the standardized extracts of poincianella pyramidalis (TUL.) L. P. queiroz obtained by spray dryer. *Int J Pharm Pharm Sci* 2017;9(6):123-128.

Apêndice B - Artigo Científico Publicado no Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research.

ASIAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL AND CLINICAL RESEARCH

Vol 10, Issue 12, 2017



NNOVARE
ACADEMIC SCIENCES

ISSN - 2455-0991
P-ISSN - 0974-2441

Research Article

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH DIODE ARRAY DETECTOR METHOD TO ANALYSIS OF KAEMPFEROL MARKER FROM EXTRACTS OF *POINCIANELLA PYRAMIDALIS* (TUL.) L.P QUEIROZ

AGNA HELIA DE OLIVEIRA, VALMIR GOMES DE SOUZA*, FÁBIO SANTOS DE SOUZA, RUI OLIVEIRA MACEDO

Department of Pharmaceutical Sciences, Medicine Development and Assays Unified Laboratories, Federal University of Paraíba, João Pessoa, PB, Brazil. Email: valmirfarmaceutico@gmail.com

Received: 10 July 2017, Revised and Accepted: 24 August 2017

ABSTRACT

Objective: This study aims to develop the extraction of the marker kaempferol in the fluid extract (FE) and validate an analytical method that monitors the quality of extracts of *P. pyramidalis*.

Methods: The *P. pyramidalis* leaves were collected and then were dried to milling process. The extracts were drawn up at 20% weight. Volume (w/v) by maceration, and the extraction system used was hydroethanol solution ratio at 50:50 volume: Volume (v: v). From the hydroalcoholic extract, a method of extracting the kaempferol biomarker was developed and validated by high-performance liquid chromatography coupled with diode array detector. To validate a method, the following parameters were evaluated: Specificity, selectivity, linearity, limit of quantification (LOQ) and detection (LOD), precision, accuracy, robustness, and stability.

Results: The method developed proved to be efficient, as it allowed the analysis of the interferences free marker, with recovery above 90%, linear over the range 1.4–26.6 µg/mL, correlation coefficient R²=0.999, and LOD and LOQ 0.07 and 0.22 µg/mL, respectively; specificity, precision, accuracy, and robustness.

Conclusion: The extraction methodology of the kaempferol marker was successfully developed interferences free and the validated method by HPLC-DAD represents a useful tool in the quality control of *P. pyramidalis* herbal medicines.

Keywords: Analytical validation method, *Poincianelle pyramidalis*, Kaempferol, High-performance liquid chromatography with diode array detector.

© 2017 The Authors. Published by Innovare Academic Sciences Pvt Ltd. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>) DOI: <http://dx.doi.org/10.22159/ajpcr.2017.v10i12.21321>

INTRODUCTION

Poincianelle pyramidalis (Tul.) L.P QUEIROZ is a species belonging to the genus *Poincianelle* Britton & Rose to the family Fabaceae, native to northeastern Brazil region, popularly known as "atingueira [1-3]." It is used in folk medicine for the treatment of asthma, bronchitis, diarrhea, gastritis, inflammation, and diabetes [4,5]. Several biological activities were tested with this plant, among which we can highlight the anti-inflammatory activities, gastroprotective, antioxidant, anthelmintic, and antimicrobial, thus confirming some of its traditional uses [6-8].

Phytochemical investigations showed the presence of terpenes, lignans, tannins, flavonoids, and mainly bioflavonoids [9,10]. The kaempferol was isolated from the chloroformic extract of the leaves of *P. pyramidalis*, and several studies have demonstrated pharmacological potential of this compound, especially its anti-inflammatory properties [2,11]. Although the phytochemical profiles are complex and the constituents can vary qualitatively and quantitatively, it is necessary to establish criteria for the quality of this material, to guarantee the effectiveness and safety of the herbal medicines products [12].

Considering all proven pharmacological activities and their large number of secondary metabolites, this vegetable species represents potential candidate for an herbal medicine product; however, some challenges for the drug development and quality control should be addressed [13,14]. One of the most important requirements is an analytical methodology for quality control, since the raw material to finished product and in the case of natural products, appropriate standardization of vegetal drug [13-14].

One of the most challenges to validate analytical methodologies is to ensure the application of methods to monitor the quality since of the raw material up to the finished product and in the case of plant drugs, the proper standardization [15-17].

Chromatographic methodologies have been one of the principal tools in quality control of herbal medicines and widely applied on separation of constituents present in complex matrices. In the development of herbal medicines, it is essential to develop analytical methods that ensure reliable results [10]. Several analytical methodologies have been developed for the identification and quantification of phytochemical markers in plants and their derivatives by high-performance liquid chromatography with diode array detector (HPLC-DAD), but one of the limitations lies in the fact that the most methods do not present a thorough validation [16].

The non-compliance of some validation methods can be checked in the lack of the markers or analytes recovery data and the poor evaluation of matrix effect, demonstrating the challenges in the development of methods that comply with the analytical requirements prioritizing for the sample clean-up interferences free [16]. Special attention should be taken to the preparation of samples of vegetal derivatives involves processes that can result in the degradation of the components of the complex matrix, generating interferences that result in poor selectivity and low reproducibility of the data [20-22].

Samples as biological fluids and plant extracts exhibit a phenomenon known as the matrix effect which corresponds to the influence and interference that all components of the sample in their entirety can exert in the analysis of a component or group of them [23-25]. The interfering

compounds make it impossible to transpose the method, without right pretreatment of the samples. The great challenge of employing an analytical method to analyze any complex sample for which the method has not been validated lies in the matrix effect that this complex sample may present through interfering substances [25-28].

In the case of *P. pyramidalis* analysis, the chlorophyll and the grassees of the leaves may influence the chromatographic run and render the analysis unfeasible. For situations such as these, we use the sample pretreatment techniques that take on the cleaning the sample, making an exhaustive recovery of the analytes, and pre-concentrating the analytes of the sample [29] only the evaluate of analyte recovery can assure that the methodology used in the pretreatment of the sample is efficient for the removal of interferences, and only it can confirm the accuracy of the complex matrix analysis. [30,31].

With the analytical validation of the method, it is possible to complement the standardization of the extract in terms of the marker concentration. This standardization is important not only for quality control of the final product but also is an indispensable tool in preclinical and clinical studies [32,33].

Therefore, the purpose of this work was to validate an analytical method by HPLC-DAD by monitoring the isomepferol marker and to develop an extractive method for the recovery of isomepferol in complex matrices of the *P. pyramidalis* extract, thus allowing the standardization of the extract as raw material for the production of herbal medicine.

This work is a contribution to broaden the collection of technical and scientific literature about the specie *P. pyramidalis*, providing chromatographic and spectral characterization by HPLC-DAD for the marker isomepferol extracted from the leaves. The novelty of the method lies in isomepferol analytical recovery, free of interferences on complex matrices of *P. pyramidalis* and validation of the parameters, thus satisfying the requirements of the official guides.

METHODS

Chemicals and solvents

Isomepferol standard: 97% (Cat. 520-18-3)(Sigma Aldrich®, Brazil), methanol HPLC grade (Sigma Aldrich®, Brazil), orthophosphoric acid (Merck®, Germany), Hexano FA ACS (Vetec®, Brazil), ethanol 96% (Tocantins®, Brazil), and dichloromethane HPLC grade (Vetec®, Brazil) were used.

Plant material

The *P. pyramidalis* leaves were collected at Maravilha farm, located in Serra Bonoca municipality carri region in the state of Paraíba in May 2015. The research project with *P. pyramidalis* received authorization from the Ministry of the Environment of Brazil (ICMbio/SISBio/MMA-Brazil) for scientific activities of number: 53346-1. The exsiccata of the plant species was deposited in the Lauro Fries Xavier Herbarium, UFFPE Joao Pessoa - Brazil, under number: N216.

Drying and obtaining powdered plant drug

The leaves of *P. pyramidalis* were dried in a circulating air oven at a temperature of 40±2°C for 3 days. The dry vegetable drug was submitted to milling process in a vertical rotor mechanical mill. The powdered vegetable drug was packed in a hermetically sealed plastic bag protected from light and moisture.

Standardization of ethanolic extracts

The standardization of the fluid extract (FE) was established with a proportion of 20% weight: Volume (w/v) mass of the sprayed vegetable drug and the solvent system. The extraction system used was 50:50 volume: Volume (v/v) hydroethanol solution ratio by maceration.

Chromatographic conditions

It was used HPLC with DAD (SHIMADZU, Japan), pump 20AT Degasser DGU20A5, interface CSM 20A, auto-injector SIL 20A, SPD

detector M20A, and oven CTO 20A. Control system was carried out by LC Solutions®. Stationary phase octadecylsiloxane-L1 (Genini nuc-18) particle size: 5 µm length: Internal diameter 150×4.6 mm (Phenomenex®); precolumn Genini C-18 (4×3.0 mm)(Phenomenex®), mobile phase filtered through a membrane 0.45 µm PTFE (Anow®, USA) and degassed methanol: 1% phosphoric acid (47:53%). Flow of the mobile phase: 1.2 mL/min; oven temperature at 40°C, monitored wave number 370 nm; injection volume 20 µL; chromatographic run time of 30 min.

System suitability testing

The system suitability test was performed as a procedure to guarantee the reliability of the validation results and to monitor possible variations from changes in the chromatographic equipment. The daily test consisted of 5 runs from the same standard solution of isomepferol with defined concentration. The areas and peak retention times were monitored and the relative standard deviation (RSD) value was at most 1.0 %.

Validation of method

In general, a validated methodology for analyzing an analyte Y in a matrix A should not be applied directly to analyze an analyte Z in a matrix B, due to the intrinsic complexity of each matrix [34-35]. But the chromatographic conditions of a given method can be a good reference for the validation of another complex matrix, especially when the analytes or markers belong to the same class of secondary metabolites. Two published papers show validated methods for analyzing quercetin content in two different matrices [36, 37].

In the method validation, the following parameters were evaluated: Specificity, selectivity, linearity, limit of quantification (LOQ) and detection (LOD), precision, accuracy, robustness, and stability. In this work, a method by HPLC-DAD to quantify the isomepferol marker in FE of *P. pyramidalis* was validated as per the ICH guide Q2-R1 [37].

To demonstrate specificity and selectivity of the method, were performed runs in triplicate with samples of *P. pyramidalis* extract, standard solution and blank of mobile phase. The selectivity of method was evaluated by analyze the retention time characteristics of the marker and were recorded the chromatograms of the extract, isomepferol standard, and blank of the mobile phase, in the range of the ultraviolet (UV) spectrum from 200 to 600 nm in an interval of 20 nm.

To evaluate the linearity, calibration curve was prepared with concentrations in the range between 0.4 µg/mL and 7.6 µg/mL. This procedure was performed in triplicate for each concentration level.

The determination of the LOQ and LOD was based on the treatment of linearity data by statistical method. The calculation of the LOQ and the LOD was obtained from the deviation of the linear regression and slope of the line.

The repeatability was determined from the injection of 6 samples with isomepferol content close to the mean value (100%) of the standard linearity curve. The intermediate precision was determined from the analysis of 6 samples of the extract with analytes and different days. Eighteen chromatographic runs were performed, and the acceptance criterion was 5% maximum.

The accuracy of the analytical method was assessed by post-addition recovery of the isomepferol marker standard on FE samples. The three levels of concentrations (low, medium, and high) were monitored with values corresponding to 20%, 100%, and 180% against the concentration obtained in the precision. Samples were prepared in triplicate and injections were performed in duplicate for each recovery level, and relative standard deviations and recoverability were assessed.

The determination of the recovery calculation follows the following equation.

Where:

$$\text{Rec. X(\%)} = \frac{[Y]}{[Z+W]} \times 100$$

Where:

X: Is the level recovery;
Y: Is the measured concentration of kaempferol in the FE;
Z: Is the initial concentration of kaempferol in FE, and
W: Is concentration of standard substance added.

In the robustness was evaluated variations in the conditions of oven temperature of the column with a variation of $\pm 2^\circ\text{C}$, variation of the pH of the mobile phase varying ± 0.1 , and change of the flow of the mobile phase ± 0.1 ml. Variations in the chromatographic profile such as retention time, peak chromatographic area, and spectral profile of the samples were monitored. Quantification of the marker in samples of the extract of *P. pyramidalis* was determined with standard kaempferol in the same analytic condition parameter robustness.

To evaluate the chemical stability in the storage of the standard solutions and FE samples, they were analyzed at time 0 and 24 h subjected to ambient temperature. To demonstrate the stability, the chromatographic profile, the analysis of the peaks areas, the retention time, and the spectral profile of the marker were verified.

Development of recovery of kaempferol marker

Pre-treatments were performed to remove interferences. The first step was performed out to remove non-polar compounds with hexane solvent. For the second step, 0.5 ml aliquot of first stage was reserved, the extract was submitted to liquid-liquid extraction under agitation of tubes, followed by phase separation by centrifugation at 2325 $\times g$ (relative centrifugal force) for 10 min. In the evaluation of the kaempferol marker extraction, the sample volume was 1 ml of the FE.

Three continuous extractions were carried out with dichloromethane, generating in each extraction stage 3 ml of extractive fraction. An aliquot of 4 ml of extractive fraction was evaporated at 50°C . After removal of dichloromethane solvent, the dry fraction was reconstituted in the mobile phase diluent, followed by filtration and injection in the chromatographic system.

Determination of kaempferol content

The concentration factor was determined according to the successive dilutions made in multiple extraction continued and allowed to quantify the kaempferol content on the extract in $\mu\text{g/ml}$.

The equation 1 shows how to determine the concentration of the marker in the hydroalcoholic extracts (HAE).

$$C_a = C_p \times T_A \times A_a \div A_p \quad (1)$$

Where:

C_a: Is the concentration of the kaempferol marker in the HAE sample, expressed in $\mu\text{g/ml}$;
A_a: Is the area of the chromatographic peak marker on HAE;
A_p: Is the kaempferol standard chromatographic peak;
C_p: Is the concentration of the chemical reference substance kaempferol;
T_A: Is the analyte factor and is calculated by equation 2;
 $T_A = T_a \div [(T_a + F_{ec}) \times F_{exp}] \div V_{rec}$ (2)

Where:

T_a: Is HAE sample taking
F_{exp}: Is organic fraction aliquot
F_{ec}: Is fraction continuous extraction in 3 batches
V_{rec}: Is volume of reconstitution in the mobile phase.

Specificity and selectivity assessment.

To demonstrate specificity and selectivity of the method, were performed runs in triplicate with samples of *P. pyramidalis* extract,

standard solution and blank of mobile phase. The selectivity of method was evaluated by analyze the retention time characteristic of the marker and was recorded the chromatograms of the extract, kaempferol standard, and blank of the mobile phase, in the range of the UV spectrum from 200 to 600 nm in an interval of 20 nm.

Statistical analysis

Statistical analysis of the data was determined from using ANOVA analysis of variance in PRISM® 6.01 software, considering a significance level $\alpha=0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

Specificity and selectivity assessment

Methods described in pharmacopoeias monographs are best suited for quality control and analysis of herbal products; however, there are still no monographs for the species *P. pyramidalis* [20]. In addition, no chromatographic methodology was validated to quantify the kaempferol marker in hydroalcoholic extracts of *P. pyramidalis*. To validate an analytical methodology, validation parameters should be evaluated and data should be monitored following official guidelines for analytical methods validation. In this work, we follow guidelines of the ICH Q2(R8) guide and evaluate: System suitability, specificity, selectivity, sensitivity (limit of detection and quantification), linearity, precision, accuracy (robustness), robustness and stability [37].

The specificity of the method was demonstrated by comparing the chromatograms between a sample of extract, kaempferol standard, and mobile phase blank. Fig. 1 shows that the retention time of kaempferol standard presents is the same of the marker in extract monitored at 17.5 min. The chromatogram of the blank mobile phase indicates that it does neither contain the analyte nor interfering compounds that absorb in the region of 370 nm. Fig. 2 shows that both the extract of *P. pyramidalis* and the kaempferol standard even show similar UV spectra with UVmax at 370 nm and spectral purity equal to 1.

In this work, the specificity of the method assures that the method is specific for the analyte monitored under the described conditions, through the identification and analytical separation, which makes possible the quantification of kaempferol in botanical matrices of the species *P. pyramidalis*.

To evaluate the selectivity of the method, the dichloromethane fraction of the extract was analyzed, after the sample clean-up process. The results of this run demonstrate that the method is selective for the marker kaempferol indicating that the sample pre-treatment in the step with dichloromethane is selective for analysis of polyphenolic compounds, as for marker kaempferol identified at 17.4 min. Fig. 3 shows the chromatographic profile of extract in

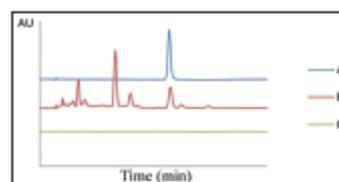


Fig. 1: Chromatograms, (a) peak of standard kaempferol at 17.4 min, (b) sample *Poincetonella pyramidalis* extract, and (c) blank of mobile phase

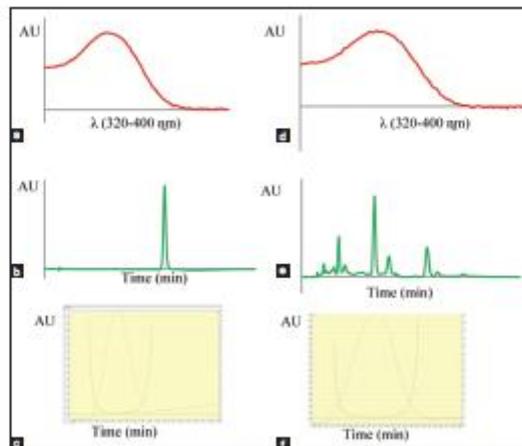


Fig. 2: Ultraviolet spectrum, chromatograms, and peak purity: (a-c) Standard Kaempferol, and (d-f) sample Polygonum pyramidalis extract

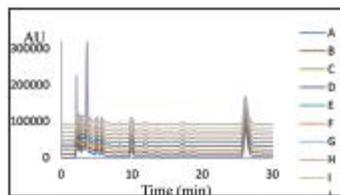


Fig. 3: Chromatogram extract in the range 200-600 nm. (a) 220 nm, (b) 220 nm, (c) 240 nm, (d) 260 nm, (e) 300 nm, (f) 320 nm, (g) 340 nm, (h) 360 nm, (i) 380 nm, and (j) 400 nm

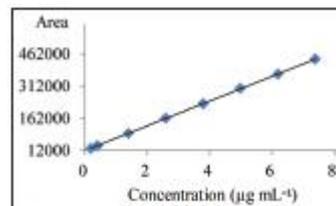


Fig. 4: Data calibration curves of standard kaempferol. Average from three calibration curves with eight concentrations levels

Table 1: Statistical parameters of the linearity

Variables	Curve 1 ^a	Curve 2 ^a	Curve 3 ^a
Slope	59438.7	57592.7	56132.5
Y-intercept	4061.7	3052.4	4921.7
Intercept X	59438.7	57592.7	56132.5
1/Slope	1.68E ⁻⁰⁶	1.74E ⁻⁰⁶	1.78E ⁻⁰⁶
Confidence Interval	95%		
R ²	0.999	1.000	0.999

^an=9/4 (Each curve contains 9 points); n = number of determinations

System stability testing

The system stability parameters were evaluated by the replicate injections of the kaempferol standard solution at 4.0 µg/ml. The data obtained demonstrate peak areas of the reproducible pattern, constant retention time at 17.4 min with variation not greater than 1%.

a range of the UV spectrum from 200 to 400 nm in an interval of 20 nm.

The selectivity of the proposed method was proved by the excellent chromatographic resolution of the marker peak, by the compatibility of UV spectrum bands between the marker and the kaempferol standard, the absence of interferences around the retention time characteristic of the monitored marker, as well as along the Spectral range of 200 to 400 nm.

The way of approaching selectivity can be confirmed with published works and the results obtained are in agreement with the official guides [37] and by Qing An and cols. analyzed quercetin by HPLC-DAD in *Rubus chingii* Franch in the ultraviolet range of 200 to 400 nm showing the chromatographic profiles in the ultraviolet range to identify absorbance maxima and possible interferences present in the complex matrix [40].

Determination of sensitivity

The limit of detection (LOD) is the lowest amount of analyte in the sample, which can be detected but not necessarily quantified as an exact value. The quantification limit (LOQ) is the lowest amount of analyte in the sample, which can be quantitatively determined with suitable precision and accuracy. Both LOD and LOQ were calculated based on the statistical application of linearity data, presenting values of 0.22 µg mL⁻¹ for LOD and 0.072 µg mL⁻¹ for LOQ.

Determination of linearity

The linearity of the method was evaluated by analyzing the linear regression from three calibration curves with eight concentrations

Table 2: The repeatability and intermediate precision of *P. pyramidalis* extract

Repeatability ^a		
	Concentration of kaempferol (µg/mL)	RSD (%)
Intermediate precision (intraday) ^b		
Day		
1	18.12±0.03	0.6
2	17.23±0.27	1.6
3	17.90±0.51	2.9
4	18.12±0.43	2.4
Intermediate precision (interday) ^c		
Average±SD	17.7±0.60	3.10

^an=6, ^bn=18, ^cn = Number of determinations

levels. It was demonstrated by the linear regression equation and correlation coefficient R². The relation between the independent variable (concentration) and the dependent variable (mean area) presented the regression equation Y=0.7721X-1010.0, R²=0.999 in the range at 0.4-7.6 µg/mL. The data of the curve area, with their respective concentrations, allowed to construct the calibration curve, shown in Figure 4 with correlation coefficient 0.999. The Table 1 shows the statistical analysis.

The linearity of the method was demonstrated by evaluating the linear correlation R² coefficient obtained by linear regression and analysis to single factor variance, where it was shown that the F Tabulated (Critical) is greater than the calculated F value, for a significance level of 95%. Based on ANOVA, the variations between values obtained from the three curves were not significant.

Blaindi and colleagues when validating a method by HPLC-DAD for quantification of gallicacatin and epigallocatechin in *Ulmum brasiliense* rhizomes obtained r² results of analysis of variance for linearity compatible and consistent with the present work [41].

Precision assessment

Repeatability and intermediate precision

Repeatability was evaluated using the same analytical parameters, with six chromatographic runs of the extract sample. Intermediate precision was assessed in 3 days with 18 chromatographic runs of the extracted samples for determination of the analyte concentration in the matrix.

Table 3: Evaluate of recovery of the method

Level of addition (%)	Experimental values (µg/mL)	Average of recovery±SD	Recovery % RSD (%)
Low (20) ^a	21.01±0.26	21.0±0.07	98.7±0.56
	20.89±0.47		
	20.99±0.22		
Medium (100) ^b	32.95±1.61	32.7±0.41	94.9±1.26
	32.27±1.25		
	33.01±2.44		
High (100) ^c	44.14±0.62	44.6±0.46	93.0±1.04
	44.47±0.45		
	45.05±1.09		

^an=18, ^bn=18, ^cn = Standard deviation, RSD: Relative standard deviation, n = Number of determinations

Table 4: Evaluation of conditions of column oven temperature, flow of the mobile phase, and pH in robustness of the method

Normal condition	Temperature (°C)		Flow (mL/min)		pH	
	40		1.2		1.6	
Main concentration (µg/mL) ±SD	17.7±0.5					
RSD (%)	2.6					
Tested condition	38	42	1.1	1.3	1.5	1.7
Main concentration (µg/mL) ±SD	17.85±0.3		18.1±0.4		17.9±0.3	
RSD (%)	1.5		1.7		2.0	

^an=6, ^bn=18, ^cn = Standard deviation, RSD: Relative standard deviation

Table 5: Evaluation of separation efficiency parameters on robustness

Tested condition	Temperature °C		Flow mL/min		pH		Parameter ^a
	38	42	1.1	1.3	1.5	1.7	
R _s	2.89	2.05	2.33	2.13	2.95	2.14	R _s >1.5
K'	7.76	5.85	7.7	7.08	7.12	7.08	1.6K' ≤10
T	1.09	1.07	1.07	1.05	1.05	1.06	0.5T ≤ 2
α	1.15	1.11	1.14	1.13	1.14	1.13	α>1
N	45239	43290	46900	44267	45626	44838	N>2000

^aR_s: Resolution, K': Retention factor, T: Tailing factor, α: Separation efficiency, N: Theoretical plates. Kaempferol peak in normal condition Temperature = 40°C, flow = 1.2 mL/min, pH = 2.5 to determine the parameter values. R_s>1.5, K'>1, T<1.1, α>1 and N>2000

Oliveira et al.

Acta J Pharm Clin Res, Vol 10, Issue 12, 2017, 252-259

Table 6: Stability assessment

	Concentration of kaempferol ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	
	Stability (time zero)	Stability (24 h after time zero)
Main concentration* ($\mu\text{g}/\text{mL}$) \pm SD	18.12 \pm 0.6;	17.91 \pm 0.6;
RSD (%)	3.4	3.2

* μg , SD: Standard deviation, RSD: Relative standard deviation. T0: Sample solution in time 0, T24: Sample solution after 24 h the time 0

In the ANOVA statistical analysis, was not set significant differences between the data considering a level of significance of 95% and *F* values greater than 0.05. Intermediate precision showed a mean concentration value of 17.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$,¹ and RSD of 3.3% as showed in Table 2. These results corroborate with the selectivity data, confirming the precision of the method to analyze fluid extract of *P. pyramidalis*.

Pascale et al. when addressing the precision of the analytical method by gas chromatography to analyze components that cause the greenhouse effect, procedures similar to those carried out in this work were used. The statistical data obtained from both methods meets the requirements of the official guide of the International Conference on Harmonization (ICH) [42].

Accuracy assessment

The accuracy of the analytical method was assessed by the addition of known quantities of the kaempferol standard in three concentrations: low, medium, and high. The standard kaempferol addition presents values of 20%, 500%, and 100% in the extract sample for determination of concentration of the analyte in the matrix. Samples were prepared in triplicated and injections in duplicates for each concentration level. Relative standard deviations and recovery capacity were measured.

Table 2 shows the recovery data for the proposed method. It contains the values of mean concentrations obtained for each level of recovery with their respective values of deviations. In the ANOVA statistical analysis, a confidence interval of 95% was defined, with a level of 0.05, there was no significant difference in the recovery data set, the $p < 0.05$.

Hollands et al. validated an analytical method by HPLC for the determination of procyanidins in apple extracts employing the solvent hexane for the removal of nonpolar compounds such as greases and pigments in the pretreatment of samples. In the evaluation of the recovery, the authors achieved a recovery above 90% for 4 markers against a total of 10 monitored peaks. This demonstrates the difficulty of working with complex matrices even after the pretreatment step of samples [43].

Robustness assessment

The robustness evaluation evaluated the parameters of column oven temperature, mobile phase flow, and mobile phase pH. Samples were prepared in triplicate, and analyses were performed in duplicate for each condition evaluated.

In the evaluation of the influence of the temperature variations of the column oven, in the peaks areas, it was observed that this parameter in the evaluated conditions $\pm 2^\circ\text{C}$ did not influence in analysis of marker, indicating that the temperature in the robustness does not influence the analysis. In the evaluation of the influence of the variations in the flow of the mobile phase in analytical results, it was observed that the parameter evaluated did not influence in the conditions of 0.1 mL in more or less. In the evaluation of the influence of the variations in the pH of the mobile phase, it was observed that this parameter in the evaluated conditions ± 0.1 did not influence in the data of the area of the peak analyte. Statistical analysis ANOVA with 95% confidence intervals had $p > 0.05$, showing no significant difference in the set of data. The robustness of the method is shown in Table 4.

Potvinale and colleagues, validated a HPLC-DAD method for determination of ginsenosagens, gallic acid and 10-*O*-glycyrrhetic acid.

When monitoring the parameter robustness, they changed composition of the mobile phase ($\pm 1\%$), phase pH (± 0.1), phase flow and detection wavelength ($\pm 2\text{ nm}$). The obtained results presented deviation below 2% for the area of the monitored peaks. As the work cited, the present work investigated possible changes in the proposed method to confirm its robustness, confirming at the end that the method is robust in the conditions analyzed [44].

The robustness of the method was also assessed based on the parameters of the chromatographic separation, evaluating how the temperature, flow, and pH in limit conditions could interfere in analysis of extracts of *P. pyramidalis*. The analysis of the chromatographic separation parameters, namely peak resolution (*R_s*), retention index (*R_i*), tailing factor (*T_f*), separation efficiency (*e*), and theoretical plate numbers (*N*) was performed in relation to the main peak of kaempferol that was monitored. The results show that the method is robust, with no changes in the separation efficiency of kaempferol in relation to the other peaks of flavonoids, as observed in Table 5.

Evaluation stability

The stability of extracted samples was analyzed at time 0 and 24 h. The coefficient of variation of the data and variation of analyte content was determined. The stability data are plotted in Table 6. The stability data show that up to 24 h there was sample stability maintained at room temperature and that the variation obtained was satisfactory.

Unlike other methods, reported in the literature that use acid hydrolysis with heating and high preparation time, the proposed method presents advantages in the application in direct analysis of extracts, being able to be applied in the study of accelerated stability and without degradation due to the heating process, generating more reliable data with better correlation with the long duration data of the confirmatory stability study [45].

These results are according to the minimal official guide requirements [27,46], for methods of validating and demonstrating that the developed method can be suitably used for analysis of kaempferol in the *P. pyramidalis* extract samples.

CONCLUSION

The development analytical method by HPLC-DAD showing a linear, precise, accurate, and specific for analyte kaempferol in complex matrices of *P. pyramidalis* FE allowed free analysis of interference and selective for the marker may be applied for standardization of extracts and quality control of herbal medicines from *P. pyramidalis*.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the National Scientific and Technological Development Council (CNPQ) and the Pharmaceutical Studies Development Institute (IDSP) for financial support and the Federal University of Paraíba for supporting the laboratory infrastructure. The authors also thank the researcher Alexandra Vieira Lacerda, for contribution to the botanical identification of the species.

REFERENCES

1. Aguiar MF, Silva KN, Dantas II, Freitas PF, Barbosa-Filho JM. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. Rev Bras Farmacogn 2008;18:475-508.

2. Tabita MV, Santos JB, David JR, David JM. Flavonoids and other phenolics from *Cassipouira pyramidalis* (Fabaceae). *J Braz Chem Soc* 2005;16:1402-5.
3. Alviano WS, Alviano DS, Diniz CO, Antonelli AR, Alviano CS, Farias LM, et al. *In vitro* antioxidant potential of medicinal plant extracts and their activities against oral bacteria based on Brazilian folk medicine. *Arch Oral Biol* 2008;53:545-52.
4. de Albuquerque UF, de Medeiros PM, de Almeida AI, Monteiro JM, de Freitas Lima Neto EM, de Melo JO, et al. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. *J Ethnopharmacol* 2007;114:325-54.
5. Santos AC, Alhozeir MP, Passos FC, Cezarino EA, Esteves CS, Santos MR, et al. Antioxiante and anti-inflamatória effects of *Cassipouira pyramidalis* in rodents. *Rev Bras Farmacogn* 2011;21:1077-83.
6. Santana DX, Santos CA, Santos AD, Nogueira PC, Thomazzi SM, Esteves CS, et al. Beneficial effects of the ethanol extract of *Cassipouira pyramidalis* on the inflammatory response and abdominal hyperalgesia in rats with acute pancreatitis. *J Ethnopharmacol* 2012;142:445-55.
7. Diniz PB, Ribeiro AR, Esteves CS, Basti CC, Thomazzi SM. Possible mechanism of action of *Cassipouira pyramidalis* against ethanol-induced gastric damage. *J Ethnopharmacol* 2015;168:79-86.
8. Ribeiro AR, Diniz PB, Esteves CS, Pinheiro MS, Albuquerque-Junior RL, Thomazzi SM. Gastroprotective activity of the ethanol extract from the inner bark of *Cassipouira pyramidalis* in rats. *J Ethnopharmacol* 2013;147:303-9.
9. Tabita MV, David JR, David JM. Occurrence of flavonoids in leaves of *Cassipouira pyramidalis* specimens. *Quim Nova* 2010;33:1297-300.
10. Monteiro JM, Lima NT, Amorim FL, Strutzmann RR, Araújo EL, Albuquerque UF. Tannin concentration in three singular medicinal plants from caatinga vegetation. *Rev Arvens* 2005;26:996-1005.
11. Devi KP, Malai DS, Nabavi SF, Senada A, Xiao J, Nabavi SM, et al. Kaempferol and inflammation: From chemistry to medicine. *Pharmacol Res* 2015;99:1-10.
12. Govindalingam S, Sacher NJ. Quality assessment of medicinal herbs and their extracts: Criteria and perspectives for consistent safety and efficacy of herbal medicines. *Epilepsy Behav* 2015;52:363-71.
13. Jain HK, Deora DD. Bioanalytical method development and validation for estimation of clopidogrel bisulfate in human plasma by RP-HPLC. *Int J Appl Pharm* 2016;8:18-21.
14. Tikhanga PT, Kapepola PM, Kapanga MC, Luponu HK, Ngombi NK, Kalenda DT, et al. Finger printing and validation of a LC-DAD method for the analysis of flavonoides in *Garcinia kola*-based antimicrobial improved traditional medicines. *J Pharm Biomed Anal* 2016;128:182-90.
15. Deono D, Mellano MG, Coratti AK, Becaro GL. Biogenic amines and natural medicine preparation: Analysis of new sources of bioactive compounds from *Ficus* and *Faba* spp. *Bada. Pharmaceutica (Brazil)* 2016;9: pii: 17.
16. Fortin HM, Parlati B, Costa DS, Magnani RF, Souza GD. Concerns and considerations about the quality control of natural products using chromatographic methods. *Curr Chromatogr* 2015;2:20-31.
17. Migliato KF, Correia MA, Salgado HR, Topoff JC, Sacramento LX, Mello JC, et al. Factorial design of the optimization extraction of *Clypeanthus* (*C. jelskii*) fruits. *Quim Nova* 2011;34:695-9.
18. Seibe PS, Dighe VV. HPLC METHOD development and validation for quantification of trigonelline from *Mirabilis jalapa* Linn. leaves and enhancement in extraction yield from ultra-fine powder. *Int J Curr Pharm Res* 2017;9:62-4.
19. Nagahi ZI, Charyapada B. Simultaneous estimation of clopidogrel and atorvastatin in human plasma using bio analytical RP-ultra fast liquid chromatographic. *Int J Curr Pharm Res* 2015;7:30-5.
20. Landim LJ, Feltrin GR, de Costa JO. Development and validation of a HPLC method for the quantification of three flavonoids in a crude extract of *Dioscorea alata*. *Rev Bras Farmacogn* 2013;23:58-64.
21. Oliveira KB, de Oliveira BH. HPLC/DAD determination of rosmarinic acid in *Salvia officinalis*: Sample preparation optimization by factorial design. *J Braz Chem Soc* 2013;34:15-19.
22. Zu Y, Li C, Pu Y, Zhao C. Simultaneous determination of catechin, rutin, quercetin kaempferol and isorhamnetin in the extract of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaves by RP-HPLC with DAD. *J Pharm Biomed Anal* 2006;41:71-4-9.
23. Aparca CH, Madhav LN, Suresh R, Govindasakar D. A review on matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Asian J Pharm Clin Res* 2015;8:28-33.
24. Jancar JO, Costa RM, Tavares PM, Barbosa WT. Quality Control of Herbal Medicines and Their Derivatives. In: Shoyama Y, editor. Rijeka, Croatia: Intech; 2011. p. 63-81.
25. Matamoros V, Calderín-Prado D, Domínguez C, Bayona JM. Analytical procedure for the determination of emerging organic contaminants in plant material: A review. *Anal Chim Acta* 2012;722:8-20.
26. Mokhtar M, Rizzo M, Cacciola F, Donato P, Giuffrida D, Ricci A, et al. Capsaicinoids and Carotenoids in *Capiscow annuus* L.: Optimization of the extraction method, analytical characterization, and evaluation of its biological properties. *Food Anal Methods* 2016;9:1183-90.
27. Van Bock TA. Chemical analysis of *Goodya nitida* leaves and extracts. *J Chromatogr A* 2002;967:23-55.
28. Souza VO, Andrade FH, Souza FS, Macedo RD. Analytical method by hplc-dad allows quantification of quercetin marker in standardized extract of *Andeanonchocaulobolus* var. *Café*. *Int J Pharm Pharm Sci* 2017;9:123-8.
29. Liang YZ, Xie P, Chan K. Quality control of herbal medicines. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2004;812:55-70.
30. Ong ES. Extraction methods and chemical standardization of botanical and herbal preparations. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2004;812:23-33.
31. World health organization, et al. Guidelines for good clinical practice (GCP) for trials on pharmaceutical products. WHO Tech Rep Ser 1995;450:97-137.
32. Siddiqui MR, Alkhatib ZA, Rahman N. Analytical techniques in pharmaceutical analysis: A review. *Arabian J Chem* 2013;10:1409-21.
33. ICH Q2B. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation Research. Guidance for industry: ICH Q2B Validation of analytical procedures: Methodology. Rockville: ICH Q2B; 1995.
34. Monago-Marula O, de la Peña AM, Galano-Díaz T. Isocratic LC-DAD-PLD method for the determination of flavonoids in poplar samples by using a rapid resolution column and post-column pH change. *Talanta* 2016;152:15-22.
35. Nakauriya O, Okamoto S, Schiffman RM, Henzlik WT. Curcumin nanoformulations: A review of pharmaceutical properties and practical studies and clinical data related to cancer treatment. *Biomaterials* 2014; 35:3265-83.
36. Raponez FI, Martin D, Herrera E, Barba C. Chromatographic analysis of o-tocopherol and related compounds in various matrices. *J Chromatogr A* 2001;935:45-69.
37. Hao Z, Fuhrer B, Knapp M, Yu LL. Simultaneous quantification of o-tocopherol and four major carotenoids in botanical materials by normal phase liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2005;1094:33-40.
38. Salvador IS, Leite ES, Souza VO, Andrade FH, Batista RS, Souza FS, et al. The study of the acute and sub-acute oral toxicities of the n-hexane extract of *Micondrosium urundeuva* Allenaes in rabbits. *Int J Pharm Pharm Sci* 2017;9:154-60.
39. ICH Q2B. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation Research. Guidance for Industry: ICH Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology. Rockville; 1995.
40. Pandey A, Tripathi S. Concept of standardization, extraction and phytochemical screening strategies for herbal drug. *J Pharmacogn Phytochem* 2014;2:115-9.
41. El-Dekany AM, Haidar SM, Saad AA. Extraction-spectrophotometric determination of some antihypertensive drugs in dyestuffs. *Int J App Pharm* 2015;7:10-7.
42. An Q, Lu N, Dong Y. Chromatographic fingerprint coupled with hierarchical clustering analysis and principal component analysis for quality evaluation and original discrimination of *Trichostema tibeticum* Franch by HPLC-DAD. *Anal Methods* 2013;5:5775-84.
43. Blaindy A, Antonelli-Daltrino TM, Godoy G, Leite-Mello EV, Mello JC. Pharmacognostic evaluation, and development and validation of a HPLC-DAD technique for gallicaceticin and epigallocatechin in rhizomes from *Lincolnia brasiliensis*. *Rev Bras Farmacogn* 2017;27:162-9.
44. Pascale R, Cavonius M, Bachiocchi A, Mancini JM, Basso G, Caracci D. Validation of an analytical method for simultaneous high-precision measurements of greenhouse gas emissions from wastewater treatment

Oliveira et al.

Asian J Pharm Clin Res, Vol 10, Issue 12, 2017, 252-259

- plants using a gas chromatography-fluorimetric detector system. *J Chromatogr A* 2017;1480:62-9.
43. Hildebrandt WJ, Ugozowski R, Jacobs G, Ashby E, Meisland A, Garcia-Valdés R, et al. Development, validation and evaluation of an analytical method for the determination of monomeric and oligomeric procyanidins in apple extracts. *J Chromatogr A* 2017;1495:46-56.
44. Ponomarev SE, Ponomarev PD, Gubina SV, Melnikova EE. A validated isocratic RP-UPLC method for concurrent estimation of ginsenosides, gallocatechin and 1HP-glycyrrhetic acid in polyherbal formulation. *Int J Pharm Pharm Sci* 2014;6:88-92.
45. Monago-Muradella C, de la Peña AM, Calzadillo-T. Isocratic LC-DAD-MS/MS method for the determination of flavonoids in paprika samples by using a rapid resolution column and post-column pH change. *Talanta* 2016;152:15-22.
46. ANVISA. National Agency for Health vigilance, Pharmacopoeia Brasileira. 5th ed. Brasília, Brazil: ANVISA; 2010.