



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

VALMIR GOMES DE SOUZA

**Tecnologias de produção e de controle de qualidade da matéria-prima
vegetal, obtida a partir das folhas de angico (*Anadenanthera colubrina*
(Vell) Brenan var. cebil (Griseb.) Altschul)**

JOÃO PESSOA

2018

VALMIR GOMES DE SOUZA

Tecnologias de produção e de controle de qualidade da matéria-prima vegetal, obtida a partir das folhas de angico (*Anadenanthera colubrina* (Vell) Brenan var. cebil (Griseb.) Altschul)

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 em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos.

1º Orientador: Prof. Dr. Rui Oliveira Macedo

2º Orientador: Prof. Dr. Fábio Santos Souza

JOÃO PESSOA

2018

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

S729t Souza, Valmir Gomes de.

Tecnologias de produção e de controle de qualidade da matéria-prima vegetal, obtida a partir das folhas de angico (*Anadenanthera colubrina* (Vell) Brenan var. *cebil* (Griseb.) Altschul) / Valmir Gomes de Souza. - João Pessoa, 2018.

139 f. : il.

Orientação: Rui Macedo.

Coorientação: Fábio Santos de Souza.

Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

1. *Anadenanthera colubrina*. 2. Spray drying. 3. Método de validação - analítica. 4. CLAE-DAD. 5. Estudo de estabilidade - medicamentos. I. Macedo, Rui. II. Título.

UFPB/BC

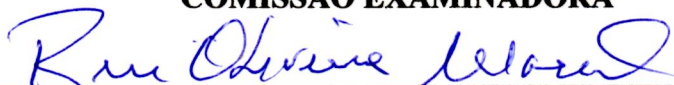
VALMIR GOMES DE SOUZA

Tecnologias de produção e de controle de qualidade da matéria-prima vegetal, obtida a partir das folhas de Angico (*Anadenanthera colubrina* (Vell) Brenan var. cebil (Griseb.) Altschul)

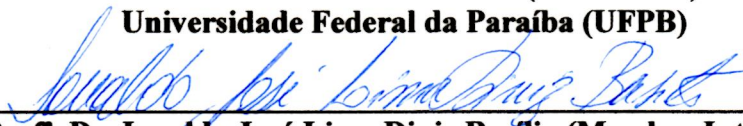
Trabalho de tese, apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos da Universidade Federal da Paraíba, como requisito para obtenção do título de doutor em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos.

Aprovada em: 26 / 02 / 2018

COMISSÃO EXAMINADORA



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



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



Prof. Dr. Diego Nunes Guedes (Membro Interno)
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)



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



Prof. Dra. Francinalva Dantas Medeiros (Membro Externo)
Universidade Federal de Campina Grande (UFCG)

SOUZA, V. G. **Tecnologias de produção e controle de qualidade da matéria-prima vegetal, obtida a partir das folhas de angico (*Anadenanthera colubrina* (Vell) Brenan var. *cebil* (Griseb.) Altschul).** 139p. Tese (Doutorado em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba; João Pessoa, 2018.

RESUMO

Anadenanthera colubrina (angico) é uma planta medicinal, nativa da caatinga, cujas soluções extrativas são popularmente usadas para tratar infecções e inflamações de doenças do trato gástrico e respiratório, sendo uma das dez plantas medicinais mais usadas no Nordeste do Brasil. Pesquisadores, avaliando estudos fitoquímicos de extratos de *A. colubrina* demonstraram a presença de metabólitos secundários, como: alcaloides, esteroides, triterpenóides, compostos fenólicos e flavonóides como a quercetina, sendo assim o objetivo deste trabalho foi propor a validação e covalidação de método analítico para análise de marcador quercetina por CLAE-DAD, realizar a padronização da matéria prima ativa vegetal de *A. colubrina* (extrato fluido, extrato seco), otimização das condições de secagem do extrato por *spray drying* e produção de pré-formulados com diferentes adjuvantes tecnológicos e realizar estudo de estabilidade acelerada dos mesmos. A validação do método analítico seguiu protocolos da RDC 899/2003 (ANVISA). A padronização do extrato fluido das folhas de *A. colubrina*, avaliou a influência do teor alcoólico e do tamanho de partícula da droga vegetal no processo extrativo, sendo a eficiência extrativa determinada em função da concentração do marcador quercetina, analisado por CLAE-DAD. A padronização do extrato seco nebulizado (ESN) avaliou a influência da temperatura de entrada de ar, fluxo de alimentação da bomba e proporção de adjuvante através de planejamento fatorial 2^3+1 empregando como resposta o teor do marcador quercetina e rendimento do processo. Os pré-formulados foram produzidos por mistura física 1:1, contendo extrato seco nebulizado (ESN) e amido pré-gelatinizado, celulose microcristalina 102, maltodextrina e lactose M 200, sendo então realizado estudo de estabilidade acelerada durante 180 dias conforme guia oficial (RDC 45/2012). Os resultados demonstram que a eficiência extrativa ocorre nas condições de proporção de solvente á 50 e 70% de etanol com concentração de quercetina de 122,5 e 124,2 µg/ mL respectivamente. A avaliação dos tamanhos de partículas no processo extrativo, demonstrou que a medida que se reduz o tamanho de partícula, há aumento na eficiência extrativa do flavonoide quercetina nas condições avaliadas. O método analítico validado por CLAE-DAD demonstrou que o método é específico, linear, sensível, preciso, excelente recuperação, robusto e adequados para a finalidade pretendida, conforme guias oficiais. O planejamento fatorial aplicado na produção do extrato seco de *A. colubrina*, apontou a condição ótima de secagem, como sendo 10% de proporção de adjuvante, 160°C a temperatura de entrada e 8mL/min de fluxo de alimentação da bomba. Os resultados do estudo de estabilidade acelerada dos pré-formulados de extrato seco de *A. colubrina*, demonstraram que os pré-formulados eram estáveis e que seguem modelo cinético de degradação de ordem zero. O estudo determinou o tempo necessário para que o teor de quercetina degradasse 10% em relação ao teor inicial, sendo obtido os seguintes tempos em ordem decrescente de estabilidade: amido > celulose microcristalina > maltodextrina > lactose sendo os pré-formulados amido (41 meses) e celulose (15 meses) os que tiveram melhor desempenho. Os resultados obtidos no presente estudo permitiram agregar novas tecnologias na produção e controle de qualidade de produtos derivados de *A. colubrina*, produzindo extrato seco padronizado por *spray-drying*, com manutenção das características de sua qualidade.

PALAVRAS-CHAVE: *Anadenanthera colubrina*, *Spray drying*, Método de validação - analítica, CLAE-DAD, Estudo de estabilidade - medicamentos

SOUZA, V. G. **Tecnologias de produção e controle de qualidade da matéria-prima vegetal, obtida a partir das folhas de Angico (*Anadenanthera colubrina* (Vell) Brenan var. *cebil* (Griseb.) Altschul).** 139p. Tese (Doutorado em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba; João Pessoa, 2018.

ABSTRACT

Anadenanthera colubrina (angico) is a medicinal plant, native to caatinga, whose extractive solutions are popularly used to treat infections and inflammations of diseases of the gastric and respiratory tract, being one of the ten medicinal plants, most used in Northeast Brazil. Researchers, evaluating phytochemical studies of extracts of *A. colubrina* demonstrated the presence of secondary metabolites, such as: alkaloids, steroids, triterpenoids, phenolic compounds and flavonoids such as quercetin, thus the purpose of this work was to propose the validation and covalidation of analytical method for analysis of quercetin by CLAE-DAD, standardization of *A. colubrina* plant extract (fluid extract, dry extract), optimization of the drying conditions of the extract by spray drying and pre-formulated production with different technological adjuvants and study of their accelerated stability. The validation of the analytical method followed protocols of RDC 899/2003 (ANVISA). The standardization of the fluid extract of the leaves of *A. colubrina* evaluated the influence of the alcoholic content and the particle size of the vegetal drug in the extractive process, being the extractive efficiency determined as a function of the concentration of the quercetin marker, analyzed by HPLC-DAD. The standardization of the nebulized dry extract (ESN) evaluated the influence of air inlet temperature, pump feed flow and adjuvant ratio through factorial design $2^3 + 1$ using as answer the quercetin marker content and process yield. The pre-formulations were produced by physical mixing 1:1, containing dried nebulized extract (ESN) and pregelatinized starch, microcrystalline cellulose 102, maltodextrin and lactose M 200, and then accelerated stability study for 180 days according to official guide (RDC 45/2012). The results demonstrate that the extractive efficiency occurs at the conditions of solvent proportion at 50 and 70% ethanol with quercetin concentration of 122.5 and 124.2 $\mu\text{g} / \text{mL}$ respectively. The evaluation of particle sizes in the extractive process has shown that as particle size is reduced, there is an increase in the extractive efficiency of flavonoid quercetin under the conditions evaluated. The analytical method validated by CLAE-DAD demonstrated that the method is specific, linear, sensitive, accurate, excellent recovery, robust and suitable for the intended purpose, according to official guides. The factorial design applied to the production of the dried extract of *A. colubrina* indicated the optimum drying condition, such as 10% adjuvant ratio, 160°C inlet temperature and 8mL / min pump flow. The results of the accelerated stability study of *A. colubrina* pre-formulated dry extract showed that the pre-formulated were stable and follow the zero-order kinetic model of degradation. The study determined the time required for the quercetin content to degrade by 10% in relation to the initial content, and the following times were obtained in decreasing order of stability: starch > microcrystalline cellulose > maltodextrin > lactose and the pre-formulated starch (41 months) and cellulose (15 months) the ones that had better performance. The results obtained in the present study allowed to add new technologies in the production and quality control of products derived from *A. colubrina*, producing dry extract standardized by spray-drying, with maintenance of the characteristics of its quality.

KEYWORDS: *Anadenanthera colubrina*, Spray drying, Validation method - analytical, HPLC-DAD, Stability study - medicines

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição de ocorrências de <i>A. colubrina</i> var. <i>cebil</i> no Brasil.....	24
Figura 2 - Distribuição de ocorrências de <i>A. colubrina</i> var. <i>colubrina</i> no Brasil	25
Figura 3 - <i>Anadenanthera colubrina</i> var. <i>cebil</i> (Griseb.) Altschul.....	26
Figura 4 - Folhas e flores de <i>Anadenanthera colubrina</i> var. <i>cebil</i> (Griseb.) Altschul.....	26
Figura 5 - Caule de <i>Anadenanthera colubrina</i> var. <i>cebil</i> (Griseb.) Altschul.....	27
Figura 6 - Folhas- frutos de <i>Anadenanthera colubrina</i> var. <i>cebil</i> (Griseb.) Altschul	27
Figura 7 - Esquema do desenvolvimento do método de pré-tratamento de amostra	54
Figura 8 - Perfil cromatográfico do padrão quercetina, amostra de extrato fluido e solução da fase móvel.	56
Figura 9 - Perfil espectral da quercetina (referencia) e do marcador monitorado no extrato fluido das folhas de <i>A. colubrina</i>	57
Figura 10 - Perfis cromatográficos dos 8 níveis da linearidade.....	59
Figura 11 - Linearidade da relação entre a concentração recuperada e concentração de fortificação de quercetina.	63
Figura 12 - Distribuição do tamanho de partícula da <i>A. colubrina</i>	67
Figura 13 - Perfis cromatográficos dos extratos produzidos de diferentes tamanhos de partícula.....	71
Figura 14 - Avaliação da seletividade através de comparação de perfis cromatográficos....	72
Figura 15 - Avaliação da seletividade através de comparação de perfis espectrais da quercetina com λ_{max} (370nm) entre padrão, extrato fluido e extrato nebulizador.	73
Figura 16 - Linearidade da relação entre a concentração recuperada e concentração de fortificação de quercetina no extrato seco nebulizado.....	76
Figura 17 - Gráfico de superfície resposta, mostrando os efeitos dos parâmetros temperatura e fluxo do processo sobre o teor de quercetina.....	79
Figura 18 - Gráfico de superfície resposta, mostrando o efeito da temperatura e proporção do dióxido de silício coloidal sobre o teor de quercetina.	79
Figura 19 - Gráfico de superfície resposta, mostrando os efeitos dos parâmetros proporção do dióxido de silício coloidal e fluxo da bomba sobre o teor de quercetina.	80
Figura 20 - Gráficos de superfície resposta, mostrando os efeitos dos parâmetros temperatura e fluxo do processo sobre o rendimento de processo.....	82
Figura 21 - Gráficos de superfície resposta, mostrando o efeito da temperatura e proporção do dióxido de silício coloidal sobre o rendimento de processo.	82

Figura 22 - Gráficos de superfície resposta, mostrando os efeitos dos parâmetros proporção do dióxido de silício coloidal e fluxo da bomba sobre o rendimento de processo.....	83
Figura 23 - Tempo predito de estabilidade dos pré-formulados obtidos por mistura física..	85
Figura 24 - Teor de quercetina dos pré- formulados durante o tempo de estudo.....	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Lista de equipamentos e instrumentos de análise	39
Tabela 2 - Processo de avaliação da exatidão do método.	42
Tabela 3 - Abertura de malha de tamis versus tamanho de partícula.....	44
Tabela 4 - Planejamento fatorial 2^3+1 com variáveis codificadas e não codificadas.....	47
Tabela 5 - Parâmetros de eficiência de separação cromatográfica.....	53
Tabela 6 - Valores dos níveis de concentração versus áreas de picos.....	58
Tabela 7 - Parâmetros de regressão linear das curvas de calibração.....	59
Tabela 8 - Análise de variância da linearidade do padrão	59
Tabela 9 - Repetibilidade e precisão intermediária do método.....	60
Tabela 10 - Avaliação da exatidão do método através da recuperação.....	62
Tabela 11 – Avaliação da exatidão pelo método da regressão linear.....	63
Tabela 12 - Parâmetros avaliados na robustez do método	64
Tabela 13 - Avaliação dos parâmetros de eficiência de separação na robustez	65
Tabela 14 - Avaliação da estabilidade de amostras de A. colubrina.....	66
Tabela 15 - Granulometria dos pós da droga vegetal.....	67
Tabela 16 - Eficiência do sistema de solvente no processo extrativo	69
Tabela 17 - Influência da granulometria no processo extrativo.	70
Tabela 18 - Repetibilidade e precisão intermediária da covalidação do método	74
Tabela 19 - Avaliação da exatidão para extrato seco através da recuperação.....	75
Tabela 20 - Avaliação da exatidão para extrato seco através método da regressão linear	75
Tabela 21 - Avaliação dos parâmetros tecnológicos versus teor de quercetina	77
Tabela 22 – Análise de variância das condições de secagem sobre o teor de quercetina.	77
Tabela 23 - Avaliação dos parâmetros tecnológicos versus rendimento.....	80
Tabela 24 - Análise de variância das condições de secagem sobre o rendimento	81
Tabela 25 - Parâmetros cinéticos dos extrato seco e pré-formulados durante 180 dias.	85

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMD	Amido
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CM	Celulose microcristalina
CV	Coeficiente de variação ou desvio padrão relativo
DAD	Detector arranjo de diodo
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
DPR	Desvio padrão relativo
DPR	Desvio padrão relativo
EHA	Extrato hidroalcoólico
ESN	Extrato seco nebulizado
F _b	Fluxo de bomba de alimentação
IFA	Insumo farmacêutico ativo
LAC	Lactose M 200
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MD	Maltodextrina
MSR	Metodologia de superfície resposta
OMS	Organização Mundial da Saúde
P&D	Pesquisa e desenvolvimento
P _{dsc}	Proporção de adjuvante dióxido de silício coloidal
RDC	Resolução da diretoria colegiada
T _e	Temperatura de entrada
UV-vis	Ultravioleta visível

SUMÁRIO

1. Introdução.....	16
2. Objetivos.....	19
2.1. Objetivo geral	19
2.2. Objetivos específicos	19
3. Referencial teórico.....	21
3.1. Plantas medicinais	21
3.2. Medicamentos e mercado de fitoterápicos.....	22
3.3. <i>Anadenanthera colubrina</i> (Vell) Brenan var. <i>cebil</i> (Griseb.) Altschul	23
3.3.1. Aspectos botânicos	23
3.3.2. Usos	27
3.3.3. Fitoquímica.....	28
3.3.4. Atividades biológicas.....	29
3.3.4.1. Atividade anti-inflamatória.....	29
3.3.4.2. Atividade antimicrobiana.....	30
3.3.4.3. Atividade antioxidante	30
3.3.5. Toxicidade	31
3.4. Extratos vegetais.....	32
3.5. Secagem por <i>spray dryer</i>	32
3.6. Planejamento experimental.....	33
3.7. Pré-Formulados	34
3.8. Validação de métodos analíticos por CLAE	34
3.9. Estudo de estabilidade de medicamentos fitoterápicos.....	36
4. Metodologia.....	38
4.1. Obtenção da droga vegetal.....	38
4.2. Identificação botânica	38
4.3. Solventes e padrões analíticos	38
4.4. Equipamentos e instrumentação de análise.....	38
4.5. Desenvolvimento de método analítico por CLAE-DAD.	39
4.5.1. Sistema cromatográfico	39
4.5.2. Parâmetros de validação	40
4.5.2.1. Avaliação da especificidade.....	40
4.5.2.2. Determinação da linearidade	40
4.5.2.3. Limites de quantificação e detecção	40

4.5.2.4. Avaliação da precisão (repetibilidade).....	41
4.5.2.5. Avaliação da precisão (precisão intermediária)	41
4.5.2.6. Avaliação da exatidão.....	41
4.5.2.7. Avaliação da robustez.....	42
4.5.2.8. Avaliação da estabilidade das soluções	43
4.6. Avaliação granulométrica dos pós de <i>A. colubrina</i>	43
4.7. Avaliação do processo de maceração	44
4.7.1. Sistema de solvente.....	44
4.7.2. Tamanho de partícula	44
4.8. Determinação de resíduo seco	45
4.9. Obtenção dos extratos secos por <i>spray dryer</i>	45
4.10. Determinação do marcador quercetina nas amostras de extrato seco nebulizado	46
4.11. Validação parcial do método analítico para matriz extrato seco nebulizado	46
4.12. Planejamento fatorial e otimização experimental na obtenção do extrato seco	46
4.13. Rendimento do processo de secagem	47
4.14. Preparação dos pré-formulados	47
4.15. Estudo de estabilidade acelerada	48
4.16. Determinação dos parâmetros cinéticos.....	48
4.17. Análise estatística	50
5. Resultados e discussão.....	52
5.1. Desenvolvimento do método analítico por CLAE-DAD	52
5.1.1. Pré-tratamento de amostras de extrato de <i>A. colubrina</i> e extração da quercetina	54
5.1.2. Determinação do Fator de Análise.....	55
5.1.3. Parâmetros de validação do método analítico para matriz extrato fluido por CLAE-DAD.....	55
5.1.3.1. Avaliação da seletividade do método	55
5.1.3.2. Determinação da linearidade do método.....	57
5.1.3.3. Determinação do limite de detecção e quantificação do método	59
5.1.3.4. Avaliação da precisão do método (Repetibilidade e precisão intermediária)	60
5.1.3.5. Avaliação da exatidão do método	61
5.1.3.6. Avaliação da Robustez	63
5.1.3.7. Avaliação da estabilidade das soluções amostra.....	65
5.2. Padronização do extrato fluido de <i>A. colubrina</i>	66
5.2.1. Determinação da granulometria dos pós das folhas da droga vegetal.....	66
5.2.2. Avaliação do processo de maceração.....	68
5.2.3. Avaliação do sistema de solvente no processo de maceração.....	68
5.2.4. Influência do tamanho de partícula da droga vegetal no processo extrativo.....	69

5.2.5. Determinação de resíduo seco	71
5.3. Covalidação do método analítico para matriz extrato seco nebulizado	71
5.3.1. Avaliação da seletividade do método de covalidação.....	72
5.3.2. Avaliação da precisão do método de covalidação.....	73
5.3.3. Avaliação da Exatidão do método de covalidação.....	74
5.4. Obtenção e padronização do extrato seco de <i>A. colubrina</i>	76
5.4.1. Avaliação dos parâmetros tecnológicos de secagem sobre concentração do marcador quercetina	76
5.4.2. Análise da influência dos parâmetros de secagem sobre o teor de quercetina através da metodologia de superfície resposta.....	78
5.4.3. Rendimento do processo de secagem por <i>spray dryer</i>	80
5.4.4. Análise da influência dos parâmetros de secagem sobre o rendimento de processo através da metodologia de superfície resposta.....	81
5.5. Estudo de estabilidade acelerada de pré-formulados e determinação dos parâmetros cinéticos.....	84
5. Conclusão	90
6. Referências	93
7. Apêndice.....	110
Apêndice A - Artigo científico publicado no periodico International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences.	111
Apêndice B - Artigo científico submetido no periódico Planta Médica	120

DEDICATÓRIA

Ao Deus de amor, revelado na pessoa de Jesus Cristo que se entregou por mim, para que diante de Deus fosse justificado.

A minha mãe, Marli Gomes de Souza, meu exemplo de afeto e amor e ao meu pai Jose Miguel de Souza (*in memorian*), minha referência de conduta ética e moral.

AGRADECIMENTOS

À Deus que me presenteou com pessoas especiais e experiências singulares que marcaram minha trajetória acadêmica e me influenciaram na minha trajetória profissional;

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

Ao prof. Dr. Fábio Santos Souza, pela amizade verdadeira, pelas muitas experiências compartilhadas, pelo contínuo incentivo na academia, pela orientação e por exercer com tanto amor e energia a arte de formar o profissional do medicamento;

A pessoas que contribuíram e me influenciaram na minha trajetória acadêmica, durante a iniciação científica: Teresa Saldanha, Sara Regina, Aline Silva, Maria Mônica, Socorro Oliveira, Vânia Medeiros e durante a habilitação em farmácia industrial: Leonardo Gouveia, Rodrigo Albuquerque, Valdilanio Procópio, Elisana Afonso, Halisson Menezes, Marcia Ferraz, Lidiane Pinto, Vinicius Trajano, Wemerson Matias, Severino Lima, Caio Batista e Horacina Cavalcanti.

Aos meus colegas doutores, Islaine Salvador, Renata Leite pelas experiências compartilhadas e pela colaboração na execução deste trabalho; em especial a minha amiga Dra. Agna Helia, exemplo de resiliência e companheirismo;

Aos meus companheiros de experimentos, Fabrício Ravy, José Venâncio, Taynara Lins, Rayanne Sales e John pelo companheirismo sempre.

Aos técnicos Flaviano, Arimatéia, Herta e Glória.

Aos meus amigos, Marcelo Brito, Eduardo Ribas, Robério Dantas, Luciana Xavier, Eva Lena e Glauco Meireles.

A minha família, pelo apoio e incentivo nos estudos;

A minha esposa, Samara Moraes, paciente e tolerante diante de minhas ausências;

Ao LCQPF, pelo crescimento pessoal e profissional ao longo dos últimos 10 anos.

A todos os professores e servidores que compõem o PPgDITM na UFPB, UFRN, UFC e UFRPE.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida.

A UFPB, pelo incentivo a carreira científica junto ao programa de iniciação científica e pela formação em nível de bacharelado e pós-graduação *strictu sensu* (doutorado).

INTRODUÇÃO

1. Introdução

A *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. *cebil* (Griseb) Altschul (*Fabaceae*) é uma espécie vegetal nativa do semi-árido brasileiro, sendo popularmente conhecida como angico, angico branco, angico vermelho, apresentando importância econômica, ambiental e medicinal (BARRANDEGUY et al., 2012; ORTOLANI, et al., 2010).

Extratos hidroalcólicos e decoctos de folhas e cascas de *A. Colubrina* são utilizados na medicina tradicional como antimicrobiano e anti-inflamatórios, no tratamento de doenças do trato gástrico e respiratório. Estudos pré-clínicos e clínicos avaliaram e confirmaram a ação cicatrizante e atividade antimicrobiana dos extratos de *A. Colubrina* (HAJDU; HOHMANN, 2012; PESSOA et al., 2012; MORETÃO et al., 2004).

A. Colubrina possui vasta classe de metabolitos secundários, como: taninos, alcaloides e flavonoides reconhecidos por sua atividade antioxidante anti-inflamatória. Um flavonoide isolado a partir de extratos de folhas de *A. colubrina*, é a quercetina; um dos mais abundantes flavonoides no reino vegetal (DIAS; DAVID; DAVID et al., 2016; SOTERO, 2002; SANTANA et al., 2010).

A qualidade de um medicamento fitoterápico, baseia-se não exclusivamente em estudos clínicos, mas na padronização de produtos e caracterização dos processos de produção dos insumos de ativos vegetais até o produto acabado, recorrendo para tanto a análises quantitativas de marcadores químicos presentes na droga vegetal (DONNO et al., 2016; ROSSI FORIM et al., 2015).

O desenvolvimento de métodos para análises desses marcadores, fundamentam-se em técnicas de amostragem, pré-tratamento de amostra e avaliação de parâmetros de validação que assegurarão a confiabilidade das medições analíticas (SOUZA; ANDRADE.; SOUZA; MACEDO, 2017).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), é vantajosa devido a eficiência de separação e identificação de compostos, quando associada à sistema de detecção apropriados, fornecendo assim, informações qualitativas e quantitativas de constituintes presentes na droga vegetal (SHI et al., 2014;).

As matérias primas para produção de medicamentos fitoterápicos majoritariamente são extratos secos, devido as características de estabilidade físico-química e microbiológica que o estado sólido confere a esse insumo (SANSONE et al., 2011). Um dos processos de secagem mais comumente empregados na obtenção de extratos secos é a nebulização por *spray drying*,

caracterizado pela secagem rápida, pequeno tempo de exposição as condições de secagem e transposição de escala, fornecendo produtos com propriedades tecnológicas adequadas (MARTINS et al., 2013; SARALA et al, 2012).

O processo de secagem, *spray drying* é influenciado por condições operacionais, tais como temperaturas de entrada, temperaturas de saída, velocidade de fluxo, seleção do adjuvante tecnológico, teor de resíduo seco do extrato fluído, entre outras variáveis. A técnica por *spray drying* permite a manipulação das condições de secagem do extrato em função da qualidade desejada (TONON, 2011; MUZAFFAR, 2015; GALLO, 2011; TUYEN; NGUYEN; ROACH, 2010).

A avaliação dos parâmetros com objetivo de obter um produto com características tecnológicas de qualidade, pode ser alcançada através do emprego de planejamentos fatoriais adequados, avaliando as variáveis de processo que exercem efeito de significância na produção do extrato seco desejadas (TONON; BRABET; HUBINGER, 2011).

Na cadeia de produtiva do fitoterápico, a matéria prima vegetal é submetida a métodos físicos e químicos que podem acarretar em alterações em suas propriedades físicas, químicas e biológicas, como: pH, concentração de marcadores, teor de umidade, o tamanho da partícula dos pós, a densidade e reologia (BAJAJ; SINGLA; SAKHUJA, 2012).

Estudos de pré-formulação são importantes, pois os adjuvantes tecnológicos melhoram as propriedades tecnológicas dos medicamentos, mas também pode impactar na estabilidade dos mesmos (JIANG et al, 2008).

Os estudos de estabilidade são rotineiros na indústria farmacêutica, contudo em se tratando de medicamentos fitoterápicos, esses estudos representam grande desafio; principalmente devido à natureza complexa da matriz vegetal e dificuldade de avaliar os mecanismos de degradação de ativos vegetais (BHOPE et al., 2011; HEIGL; FRANZ, 2003).

Nesse contexto, o presente projeto de desenvolvimento de tecnologias analíticas, de produção e controle de qualidade de pré-formulados contendo extratos secos padronizado de *A. colubrina* e excipientes farmacêuticos vem contribuir com o desenvolvimento da cadeia farmacêutica de fitoterápicos.

OBJETIVOS

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Desenvolver tecnologias de produção e controle de qualidade de insumo farmacêutico ativo vegetal, a partir do extrato hidroalcoólico das folhas de *Anadenanthera colubrina* var. *cebil*

2.2. Objetivos específicos

- ✓ Desenvolver e validar metodologia analítica para identificação e quantificação do marcador químico quercetina nos extratos fluido e seco de *A. colubrina*, por cromatografia líquida de alta eficiência;
- ✓ Obter a droga vegetal em diferentes granulometrias;
- ✓ Estabelecer parâmetros de extração, para obtenção do extrato fluido das folhas de *A. colubrina*;
- ✓ Caracterização do extrato fluido de *A. colubrina*;
- ✓ Padronizar e otimizar o método de secagem por *spray dryer*, empregando planejamento fatorial e metodologia de superfície resposta;
- ✓ Realizar o estudo de estabilidade acelerada de pré-formulados do extrato seco;
- ✓ Determinar os parâmetros cinéticos de degradação do marcador quercetina nos pré-formulados;

REFERENCIAL TEÓRICO



3. Referencial teórico

3.1. Plantas medicinais

Desde a antiguidade as plantas medicinais têm sido utilizadas pelo homem para tratar e prevenir doenças. Nas civilizações do Egito e Mesopotâmia, plantas medicinais de uso tradicional, como: óleo de *Cedrus* sp. (cedro), a *Glycyrrhiza glabra* (alcaçuz) e a *Papaver somniferum* (papoula), já eram usadas para tratar resfriados, doenças parasitárias e inflamações (PESSOA et al., 2012; LEITE, 2009).

Em 1978, a Organização Mundial de Saúde (OMS), reconheceu e incentivou a todos os Estados membros que adotassem políticas voltadas para o uso de plantas medicinais (TÔRRES et al., 2005). A OMS estima que mais de 80% da população de países em desenvolvimento, dependem das plantas medicinais na atenção primária a saúde, sendo que para muitas comunidades, é a única opção terapêutica (ÁLVARES et al., 2017; AZIZ et al., 2017).

Uma pesquisa, investigando as indicações terapêuticas de 119 fármacos disponíveis no mercado, obtidos a partir de plantas medicinais, demonstrou que 74% dos fármacos avaliados apresentavam as mesmas indicações terapêuticas recomendadas no uso tradicional das plantas medicinais (FANSWORTH, 1988).

Estima-se que 95% da biodiversidade global, ainda não tenha sido avaliada nem explorada quanto ao seu potencial terapêutico (DAVID; WOLFENDER; DIAS, 2015). O Brasil possui mais de um terço da biodiversidade mundial, diversidade étnica e cultural, uso tradicional de plantas medicinais por povos e comunidade indígenas, quilombolas e ribeirinhos, que coloca o Brasil em posição privilegiada e estratégica no cenário de desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos (COSTA et al., 2017; BRASIL, 2016; KLEIN et al., 2010).

No Brasil em 2006, o governo brasileiro promulgou o decreto de nº 5.813 criando a política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos (PNPMF), que tem como objetivo fortalecer a cadeia produtiva de plantas medicinais e uso sustentável da biodiversidade (SOUZA-MOREIRA, 2010). Dois anos depois o governo Brasileiro, instituiu o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, voltado para ações práticas de fortalecimento dos arranjos produtivos locais, desenvolvimento e produção de insumos vegetais e fitoterápicos e promoção de parcerias público-privadas (BRITO, 2017).

3.2. Medicamentos e mercado de fitoterápicos

O uso de plantas medicinais, como fonte de desenvolvimento de fitoterápicos eficazes e seguros, requerem estudos de identificação botânica, análises fitoquímicas, toxicológicas, farmacológicas (estudo pré-clínicos e clínicos), além do desenvolvimento de formulações e metodologias aplicadas ao controle de qualidade, do processo de produção, da matéria prima e do produto acabado (CORDELL, 2012).

Por definição, medicamento fitoterápico é um produto tecnológico, obtido exclusivamente a partir de matéria prima ativa vegetal, o qual tem como forma de comprovação de segurança e eficácia, os dados de pesquisa clínica, bem como a caracterização da constância de sua qualidade. O produto tradicional fitoterápico, também é obtido a partir de matéria prima ativa vegetal, contudo os dados de segurança e eficácia se baseiam em publicações técnico-científicas (BRASIL, 2014).

Droga vegetal, por sua vez corresponde a planta medicinal ou sua(s) parte(s), a qual contém as substâncias responsáveis pela ação terapêutica, após processo de colheita, estabilização, secagem, podendo encontra-se na forma íntegra ou triturada (BRASIL, 2014).

Para garantir a constância da qualidade de um medicamento fitoterápico é necessário realizar a padronização da droga vegetal, o qual representa um dos grandes desafios durante o desenvolvimento do medicamento, sendo motivo de indeferimento de muitas solicitações de registros de medicamento fitoterápico (LANDIM; FEITOZA; DA COSTA, 2013). A definição de qualidade um medicamento fitoterápico, deve considerar o conjunto de parâmetros de referência ou características intrínsecas, aferição de parâmetros constantes, definição de valores qualitativos e quantitativos que assegurarão a qualidade, eficácia, segurança e a reprodutibilidade lote a lote do produto tecnológico (PANDEY; TRIPATHI, 2014; FOLASHADE, 2012).

Até meados de 1990, esses produtos fitoterápicos considerados até então de baixo risco, eram produzidos e comercializados sem grandes requerimentos de qualidade. Contudo, foi partir de 1995 com a publicação da portaria da ANVISA de nº 06 em 31 de janeiro, que foi estabelecida normas para registro e comercialização de fitoterápicos no Brasil, sendo um marco histórico importante na regulamentação de fitoterápicos (DE OLIVEIRA et al., 2016).

O Brasil é um país que apresenta baixa competitividade no mercado de produção de drogas vegetais quando comparado com o mercado internacional; o que é um contraste, pois o mesmo, possui rica biodiversidade e extensa área territorial. Um dado que exemplifica esse contraste brasileiro, é o registro de importação de produtos (arnica, boldo, sene, ginseng

guaraná, ipecacuanha e algas frescas), os quais foram exportados, indicando que essas drogas foram apenas processadas no exterior e importadas (DE CASTRO; ALBIERO, 2016; ALVES, 2005).

Em 2011, o mercado global de medicamentos atingiu a cifra de 800 bilhões de dólares, desse total, 26 bilhões de dólares foi parcela do mercado de fitoterápicos. No ranking dos mercados a América do Norte ocupa o primeiro lugar com 38,2%, seguido da Europa 28%, Japão com 11,3% e por último a América latina com 6,6% (ALVES, 2013).

Em 2011, o setor de fitoterápicos no Brasil, cresceu 13% em relação ao ano anterior, alcançando a cifra de R\$ 1,1 bilhão. Uma demonstração da atratividade desse mercado é que no período de 2009 a 2015, um total de 25 indústrias de fitoterápicos foram compradas por outras 15, sendo que 10 dessas empresas investidoras era de capital internacional (HASENCLEVER et al., 2017; ALVES, 2013).

Esse crescimento no segmento de fitoterápicos pode estar associado a vários fatores como: formação de pesquisadores na área, aumento do número de grupos de pesquisa em plantas medicinais e fitoterápicos, aumento de aportes financeiros por agências de fomento, investimento em pesquisa e desenvolvimento (P&D) do setor privado, participação de universidades e institutos de pesquisa nas parcerias público-privada e adequação das empresas as novas exigências técnicas dos órgãos reguladores (HASENCLEVER et al., 2017; NASCIMENTO; MALDONADO; ARNÓBIO, 2015).

3.3. *Anadenanthera colubrina* (Vell) Brenan var. *cebil* (Griseb.) Altschul

3.3.1. Aspectos botânicos

O gênero *Anadenanthera*, pertence à ordem *Fabales*, à família *Fabaceae*, sub-família *Mimosoideae*, foi descrito primeira vez em 1737 na Holanda. O gênero foi inicialmente proposto por J. P. M. Brenan e Reis Altschu, composto por quatro espécies, mas uma revisão taxonômica desse gênero pelo pesquisador Siri Von Reis Altschul, considerou que apenas duas espécies compunham o gênero: *A. Peregrina* (L.) Speg. e *A. colubrina* (Vell.) Brenan, cada uma com duas variedades, sendo diferenciadas através de caracteres morfológicos e suas localizações geográficas de origem ou distribuição (DE VIANA et al., 2014; BARRANDEGUY et al., 2012; AGRA; FREITAS; BARBOSA-FILHO, 2007).

A *Anadenanthera colubrina* (Vell) Brenan var. *cebil* (Griseb.) Altschul é uma espécie de regiões subtropicais, nativa da caatinga, sendo conhecida popularmente como angico,

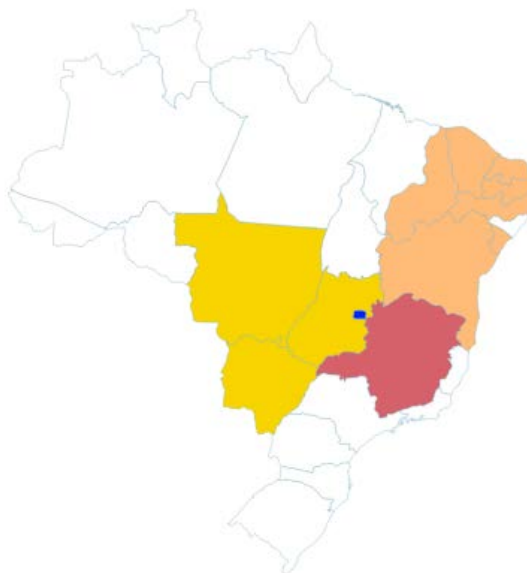
angico branco, cambuí-angico, goma de angico, angico de casca e angico vermelho, curupay, yopo, cohoba, vilca, cebil colorado (WEBER et al., 2011; SOLÍS; BARRANDEGUY; GARCIA, 2014; FERREIRA NEPOMUCENO et al., 2009).

Apesar da *A. colubrina* ser nativa do bioma caatinga, não é exclusiva do Brasil, mas pode ser encontrada em vários países da América do Sul, como: Argentina, Venezuela, Bolívia, Paraguai e Peru (RODRIGUES; OSUNA, 2004; NEPOMUCENO et al., 2007).

No Brasil é bastante conhecida e comum no Nordeste, sua distribuição ocorre nos estados do Ceará, Rio Grande do Norte, Piauí, Paraíba, Pernambuco, Sergipe, Bahia, Sudeste: Minas Gerais, Centro Oeste: Distrito federal, Mato Grosso e Mato grosso do Sul (WEBER et al., 2011; DE SOUZA et al., 2007, MORIM, 2017).

A distribuição geográfica das variedades da *A. colubrina*, pode servir como indicação de identificação, as regiões de distribuição comum limitam-se ao estado da Bahia e Minas Gerais, sendo que nas demais regiões há essa distribuição distinta. As figuras 1 e 2, ilustram as distribuições de cada variedade de *A. colubrina*.

Figura 1 - Distribuição de ocorrências de *A. colubrina* var. cebil no Brasil



Fonte: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB18072>

Figura 2- Distribuição de ocorrências de *A. colubrina* var. *colubrina* no Brasil



Fonte: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB18073>

A *A. colubrina* é uma árvore que pode atingir de 15 a 30 metros de altura, tronco de 30 a 45 cm de diâmetro, as folhas são compostas, folíolos rígidos, com flores brancas hermafroditas e frutos longos de leguminosas, descritos como uma vagem achatada, são polinizadas por abelhas e as sementes são dispersas com auxílio do vento (ABRAHAM DE NOIR; BRAVO; ABDALA, 2002; BARRANDEGUY et al., 2012; GARCÍA et al., 2014).

As figuras 3, 4, 5 e 6 mostram ilustrações de partes da espécie de *A. colubrina*.

Figura 3- *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Griseb.) Altschul



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

Figura 4 - Folhas e flores de *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Griseb.) Altschul



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

Figura 5 - Caule de *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Griseb.) Altschul



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

Figura 6 - Folhas- frutos de *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Griseb.) Altschul



Fonte: Autor (2018)

3.3.2. Usos

A grande maioria dos trabalhos publicados com *A. colubrina*, apresenta descrição botânica da planta medicinal, as formas de apresentação, usos populares, indicações terapêuticas e modos de administração (ALVES, 2013; ORTOLANI et al., 2010; DE VIANA

et al., 2014).

A *A. colubrina* é uma planta de grande importância econômica e ambiental, apresentando muitas utilidades e aplicações. Sua madeira é muito empregada na construção civil, naval, marcenaria, carpintaria e na indústria de curtume (FERREIRA-NEPOMUCENO et al., 2009).

A *A. colubrina* é indicado em projetos de arborização, podendo ser aproveitada no plantio de florestas mistas, destinadas à recomposição de áreas degradadas. Seu pólen e néctar servem como alimento de abelhas, representando utilidade econômica na apicultura (DE SOUZA et al., 2007; ALMEIDA et al. 2006).

O uso medicinal da *A. colubrina* ocupa posição de destaque entre as plantas medicinais no nordeste brasileiro, sendo uma das mais usadas popularmente na forma de tintura e decoctos, como adstringente, depurativo e hemostático (PESSOA et al., 2012; DELGOBO et al., 1998; WEBER, 2011).

3.3.3. Fitoquímica

Extratos de *A. colubrina* apresentam em sua composição várias classes de metabólitos secundários, como: alcaloides, esteroides, triterpenóides, flavonoides, flavonas, flavonóis, xantonas, chalconas, auronas, flavononas e outros compostos fenólicos. A entrecasca do caule é rica em taninos, que conferem a essa parte da planta, atividades biológicas importantes, como ação anti-inflamatória, antioxidante e atividade antimicrobiana. A seiva de *A. colubrina* demonstrou atividade antitumoral (GU et al., 2014; COLACITE, 2015; MONTEIRO et al., 2014; DE ALBUQUERQUE et al., 2007).

Análise fitoquímica de extratos aquosos e hidroalcoólicos de *A. colubrina* produzidos a partir da casca do caule, apresentaram compostos fenólicos de polaridade intermediária e apolares, sendo atribuídos, respectivamente a classe dos taninos e flavonoides (DE ARAÚJO et al., 2015).

De Araújo e colegas (2017), investigando a composição fitoquímica de folhas e frutos de *A. colubrina*, demonstrou por cromatografia em camada delgada (CCD), que a fração acetato de etila de ambas as partes utilizadas tinha flavonóides, derivados cinâmicos, terpenos, glicosídeos cianogênicos e proantocianidinas. Neste mesmo trabalho, foi feita a caracterização das frações extrativas, por cromatografia líquida de alta eficiência, sendo possível separar 15 compostos fenólicos.

Alguns metabólitos secundários foram isolados de partes aéreas de *A. colubrina*, como:

quercitrina, isoquercetrina, quercetina, apigenina, anadantoflavona; ácido cinâmico, ácido 4-hidroxibenzoico; alnusenol β -amirina, α -amirina, lupeol, lupeona, ácido betulínico; β -sitosterol, stigmasterol. Já da casca do caule foram isolados: anadantosídeo, prosopina; lupeol, lupeona, β -sitosterol, daucosterol e palmitato de β -sitosteril (MONTEIRO et al., 2014; SANTANA et al., 2010; GUTIERREZ-LUGO et al., 2004; MIYAUCHI et al., 1976; PIACENTE et al., 1999).

Estudos *in-vitro* e *in-vivo*, realizados com os flavonóides, demonstram seu largo espectro de atividade biológica, como antioxidante, anticarcinogênica, antiinflamatória e antimicrobiana (DAJAS, 2012; PROCHÁZKOVÁ; BOUŠOVÁ; WILHELMOVÁ, 2011; AMADO, 2011; JESUS; CUNHA, 2012).

3.3.4. Atividades biológicas

Extratos hidroalcolicos e decoctos de folhas e cascas de *A. colubrina* são utilizados popularmente no tratamento de doenças do trato gástrico, doenças respiratórias, infecções e inflamações; sendo uma das dez plantas medicinais mais usadas em comunidades da caatinga no nordeste do Brasil (HAJDU; HOHMANN, 2012; JUNIOR; LADIO; ALBUQUERQUE, 2011).

3.3.4.1. Atividade anti-inflamatória

As plantas medicinais constituem misturas complexas de vários compostos químicos, biologicamente ativos, apresentando evidências clínicas de sua indicação terapêutica, mas com mecanismos farmacológicos de difícil elucidação (ALVES, 2005).

Os taninos e flavonoides são compostos fenólicos, produto do metabolismo secundário vegetal, reconhecidos por seu emprego no tratamento de feridas, queimaduras e inflamações (BRUNETON, 1991).

A ação anti-séptica dos taninos, pode estar associada a capacidade desses fenólicos de precipitar as proteínas da mucosa lesionada, formando uma película protetora e assim inviabilizar o desenvolvimento de microrganismos (HASLAM, 1996).

Segundo, Silva e colaboradores (2006), metabólitos secundários como os flavonoides são os responsáveis pela inibição da lipoxigenase, uma enzima que é importante nos processos inflamatórios.

Pessoa e colaboradores (2012) confirmaram a atividade anti-inflamatória do extrato

hidroalcoólico de *A. colubrina*, ao estudar o processo de cicatrização da pele de ratos. Análises morfológicas demonstraram um maior volume de fibroblastos, altas concentrações de fibras de colágeno e aumento da vascularização na região ferida, indicando o processo de neoangiogênese.

A atividade antinoceptiva e antiinflamatória do extrato liofilizado de *A. colubrina*, foi investigada através dos modelos de placa quente e indução de inflamação na pata do rato.

Os autores, concluíram que a atividade antinociceptiva e antiinflamatórias foram consistentes e que a planta medicinal tem potencial para ser desenvolvido, como agente terapêutico para tratar os processos inflamatórios e dores (SANTOS et al., 2013).

3.3.4.2. Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana da *A. colubrina*, normalmente está associada aos flavonoides e taninos presentes nessa planta medicinal. Vale salientar, que a disponibilidade desses compostos pode variar entre as partes da planta utilizada, bem como durante o processo de extração (ARAÚJO et al., 2008; DIAS; DAVID; DAVID et al., 2016).

Araújo e colaboradores (2015), ao investigarem a atividade antimicrobiana do extrato aquoso e hidroalcoólico de *A. colubrina*, frente às cepas de *Staphylococcus aureus*, concluíram que o extrato aquoso apresentou melhores resultados de inibição de crescimento bacteriano que o extrato hidroalcoólico. Nesse mesmo trabalho, essa atividade antimicrobiana é associada à ação dos taninos sobre os mecanismos de desestabilização da membrana citoplasmática, permeabilização da membrana, inibição de enzimas extracelulares, influenciando assim, no metabolismo bacteriano.

Frações extrativas das folhas e frutos de *A. colubrina* apresentaram atividade antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*, sendo mais ativas contra organismos Gram positivos (De Araújo et al., 2017).

3.3.4.3. Atividade antioxidante

A avaliação da atividade antioxidante de extratos de plantas, comumente utilizadas com finalidade anti-inflamatória, demonstra que os extratos metanólicos produzidos a partir da casca de *A. colubrina*, são os que demonstram maior atividade antioxidante (DESMADÉCHELIER et al., 1999).

A atividade antioxidante de extratos de 14 planta medicinais da caatinga, foi avaliada pelo método DDPH, onde *A. colubrina* apresentou potencial antioxidante com IC50 igual a $73,24 \pm 1,47 \mu\text{g/mL}$, utilizando como controle positivo ácido ascórbico, que mostrou uma IC50 de $21,74 \pm 3,23 \mu\text{g}$ (GOMES de MELO et al., 2010).

DAJAS (2012), investigando in vitro a atividade neuroprotetora da molécula quercetina, concluiu, que o flavonoide apresenta potencial, como ferramenta terapêutica em neuroproteção devido a sua propriedade antioxidante.

3.3.5. Toxicidade

Nos Estados Unidos, o Instituto nacional de diabetes e doenças digestivas e de rim (NIDDK) estabeleceu a rede de lesões do fígado induzidas por drogas. Segundo esse instituto, em março de 2013, 839 pacientes deram entrada com lesão hepática, confirmada a causa como de uso de drogas. De total, 130 pacientes (15,5%), ingeriram produtos a base de drogas vegetais com múltiplos ingredientes. A maioria desses produtos era suplementos para musculação ou perda de peso (SEEFF et al., 2015).

Portanto, estudos toxicológicos, estudos farmacocinéticos pré-clínicos e clínicos devem ser realizados para evitar reações adversas e efeitos colaterais indesejados. Os estudos de toxicológicos pré-clínicos devem assegurar a confiabilidade de medicamento disponível ao público (KLEIN et al., 2010).

Atividade toxicológica das folhas de *A. colubrina*, foi investigada em bovinos, que ingeriram a planta fresca e seca, confirmando a toxicidade e que a mesma estava relacionada a glicosídeo cianogênicos (HCN). Processos físicos podem levar a eliminação do HCN, mas no estudo realizado a secagem apenas reduziu o efeito toxico (AMORIM; MEDEIROS; RIET-CORREA, 2006).

Nos animais, os sinais clínicos da intoxicação por HCN, se evidenciam impossibilidade de deglutir, dificuldades respiratórias e em casos mais graves desequilíbrio. Essa sintomatologia é decorrente da interação do HCN com citocromo c-oxidase que participa da respiração aeróbia mitocondrial (MANZANO; DE SOUZA; GÓRNIK, 2006; SMITH, 1994).

Souza e colaboradores (2006), avaliaram a toxicidade de infusos de *A. colubrina*, produzidos a partir da casca. O estudo histopatológico demonstrou que os fígados dos camundongos tratados se mostraram morfológicamente semelhantes em relação do grupo controle, mas foi registrado focos de inflamação crônica.

Um produto fitoterápico, contendo extrato fluido de *A. colubrina*, foi submetido a estudo toxicológico pré-clínico conforme guia oficial, demonstrando ao fim do estudo que o produto fitoterápico apresentou um baixo grau de toxicidade pré-clínica (ARAÚJO et al., 2006).

3.4. Extratos vegetais

Extratos vegetais são apresentações líquidas, semi-sólidas ou sólidas, produzidas sob condições controladas, para efetiva extração de constituintes químicos a partir da droga vegetal, através de diferentes técnicas de extração (SONAGLIO et al., 2007; MARQUES; VIGO, 2009).

A maceração é uma técnica extrativa relativamente simples, com baixo custo, quando comparado com as outras técnicas e bastante utilizado para obtenção de extratos vegetais. A maceração pode ocorrer em sistema fechado com ou sem agitação, mas normalmente com baixo rendimento extrativos em comparação com outras técnicas. Algumas estratégias podem aumentar a eficiência do processo extrativo, resultando em aumento do rendimento, como emprego de sistemas aquecimento e agitação mecânica (BONOMINI et al., 2013; ISAAC et al., 2009; CARDOSO, 2015).

As principais variáveis que influenciam na composição fitoquímica e na qualidade dos extratos vegetais são: tipos de técnica extrativa, origem do material vegetal, parte da planta usada, tamanho de partícula da droga vegetal, tempo de extração, tipo de solvente empregado, polaridade do solvente e concentração do solvente (PANDEY, 2014; EHLERT et al., 2013).

O uso de plantas medicinais, como matéria-prima para produção de fitoterápicos, tem como pré-requisito a padronização das drogas e extratos vegetais através de diferentes técnicas e procedimentos com objetivo de estabelecer especificações e atributos de qualidade, garantindo assim a eficácia e segurança pretendida (DE CASTRO; ALBIERO, 2016; KLEIN et al., 2010; DE SOUSA OLIVEIRA et al., 2014).

3.5. Secagem por *spray dryer*

A matéria prima de fitoterápicos é predominantemente produzida como extratos secos, o que pode ser atribuído a vantagem de apresentar maior estabilidade química, físico-química e microbiológica, mais fácil padronização, maior teor de constituintes ativos e possibilidade de transformação em outras formas farmacêuticas sólidas (OLIVEIRA, 2010; LEITE et al.,

2017).

A secagem por nebulização ou aspersão é definida como a transformação de um sistema líquido (suspensão, dispersões, emulsões) em um pó seco. Nesse processo, o sistema líquido é carregado através de bombeamento e atomizado por um bico aspersor na câmara de secagem, formando microgotículas que em condições de pressão e temperaturas apropriadas, evapora instantaneamente o (s) solvente(s) e formam as partículas secas (LARGO-AVILA et al., 2015; OLIVEIRA; PETROVICK, 2010).

Na secagem de um extrato fluido por *spray drying*, as características finais do produto (tamanho de partícula, higroscopicidade, reologia, teor de marcadores), são influenciadas por uma série de variáveis de processo que precisam ser monitoradas através de um planejamento experimental (SILVA et al., 2013; TUYEN; NGUYEN; ROACH, 2010).

Adjuvantes de secagem, tais como: maltodextrina, amidos, proteínas e dióxido de silício coloidal podem ser adicionados aos extratos fluidos, a fim de melhorar as propriedades do extrato e proteger os compostos bioativos durante o processo. (SOUZA et al., 2013; LAURO et al., 2015).

Esse melhoramento das características tecnológicas que a técnica propicia, traduz-se em melhor estabilidade do produto, reduzida degradação química de constituintes, melhor reologia e qualidade assegurada do produto (OLIVEIRA; PETROVICK, 2010; VASCONCELOS et al., 2005).

Parâmetros externos, como resíduo sólido, viscosidade e tensão superficial do extrato fluido, influenciam diretamente na formação das microgotículas na câmara de secagem, e consequente, determinam as características físicas morfológicas dos pós (PARAMITA et al., 2010; COUTO et al., 2013).

Processos de secagem e encapsulação de derivados vegetais (extratos fluidos, óleo essencial) de plantas medicinais, tem empregado a técnica de *spray drying*, resultando em melhorias nas características tecnológicas do produto (COUTO et al., 2012).

Extrato de *Eugenia dysenterica*, foi submetido a planejamento fatorial, para otimizar as condições de secagem do extrato hidroalcoólico. Análises estatística e metodologia superfície resposta demonstraram que os parâmetros avaliados (fluxo de ar, temperatura de entrada de ar de secagem e fluxo de alimentação do extrato) influenciam significativamente na maioria dos indicadores de qualidade monitorados (COUTO et al., 2012)

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 (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).

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 influenciados 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) (NETO, 1996; BEZERRA et al., 2008).

3.7. Pré-Formulados

A primeira etapa no desenvolvimento racional na formulação de medicamentos é o estudo de pré-formulados. Esses estudos, permitem avaliar as propriedades físico-química dos insumos farmacêuticos ativos (IFA) isolados e combinados com adjuvantes tecnológicos, bem como investigar possíveis incompatibilidades na formulação (LEITE, et al., 2013; ROWE; SHESKEY; OWEN, 2006).

Os adjuvantes tecnológicos são usados para viabilizar a administração de medicamentos, promover estabilidade da formulação e modular a liberação do componente ativo dentre outras finalidades (CHANDRAKUMAR et al., 2016; MORSELLI, 2014).

Os sistemas de misturas binárias (1:1) é o método comumente empregada, para avaliar a compatibilidade entre componentes ativos e excipientes da formulação, armazenadas sob condições extremas de temperatura e umidade, sendo também usado como método de indicação de estabilidade através de métodos analíticos como a cromatografia líquida de alta eficiência acoplados a detectores apropriados a natureza química dos analitos (COLMAN et al., 2015; BHARATE; BHARATE; BAJAJ et al., 2016).

3.8. Validação de métodos analíticos por CLAE

De acordo, com a RDC nº 899/2003 ANVISA, a validação de um método analítico deve garantir, através de dados experimentais, que a metodologia satisfaz às exigências de aplicação analítica, assegurando a confiabilidade dos resultados. Com este objetivo deve-se avaliar a especificidade, linearidade, precisão, limite de quantificação e detecção, exatidão, robustez e dados de adequabilidade do sistema, adequados à análise (BRASIL, 2003).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma técnica reconhecida por sua vasta aplicação nas análises de substâncias, especialmente devido a eficiência de separação e identificação de compostos, quando associados a sistemas de detecção apropriados a natureza química dos analitos, fornecendo assim informações qualitativas e quantitativas do fitocomplexo vegetal (SHI et al., 2014; BARNI et al., 2009).

Muitas técnicas são aplicadas na identificação e quantificação de metabólitos secundários de drogas vegetais, sendo que a cromatografia líquida é a mais comumente empregada devido a sua versatilidade e sensibilidade analítica frente a outras técnicas (LANDIM et al, 2013).

As tecnologias analíticas aplicadas ao controle de qualidade, recorrem a técnicas cromatográficas e espectroscópicas na validação de métodos que assegurem análise confiável dos analitos (SHI et al., 2014, DAI, 2010). Técnicas cromatográficas, tais como HPLC, TLC, GC e eletroforese capilar e técnicas espectroscópicas tais como IV, RMN e UV podem também ser utilizados para se obter as impressões digitais desses produtos (LANDIM et al., 2012).

O desenvolvimento de métodos analíticos baseia-se em condições fundamentais, como amostragem, pré-tratamento de amostra e avaliação de parâmetros de validação que asseguram a qualidade, reprodutibilidade e confiabilidade de resultados analíticos (JAIN, 2016; TSHIBANGU et al., 2016).

Avanços recentes em tecnologias analíticas aplicadas a controle de qualidade de fitoterápicos demonstram que amostras complexas, apresentam interferentes que coeluem nas corridas cromatográficas, sendo difícil a separação e caracterização reproduzível de extratos (STEINMANN, 2011; DAI, 2010).

Nesse contexto, o pré-tratamento de amostras é uma etapa crucial no desenvolvimento de métodos de análise de componentes em matrizes complexas, devendo garantir a extração dos analitos de interesse para serem analisados através de instrumentação apropriada (MATAMOROS et al., 2012). A remoção de interferentes da amostra melhora a sensibilidade analítica, permite resultados mais robustos, reprodutíveis e conserva a vida útil das colunas cromatográficas (LEDOUX, 2011).

Tão importante quanto um método analítico validado é o posterior estudo de estabilidade da formulação, para assegurar a constância da qualidade exigida para tais produtos (KLEIN et al., 2010; DAI, 2010).

3.9. Estudo de estabilidade de medicamentos fitoterápicos.

A estabilidade de um medicamento é a capacidade que esse produto possui de manter as suas propriedades físicas, químicas, biológicas e características biofarmacêuticas dentro dos limites de especificação ao longo do tempo de validade do produto (KAUR et al., 2016; SOUZA et al., 2013).

A qualidade de medicamento é condição *Sine qua non*, para fins de registro, junto ao órgão regulador sanitário, sendo assim no contexto de um medicamento fitoterápico da RDC ANVISA de nº 26/2014, esses produtos devem realizar estudos de estabilidade acelerada e de longa duração conforme guias oficiais, para demonstrar os pré-requisitos de qualidade (BRASIL, 2014, BRASIL, 2005).

As interações ativo-excipientes em pré-formulados, têm como principal evidência, a aceleração da degradação química através de reações de hidrólise, oxidação e fotólise, resultando diminuição de concentração de ativos e consequente perda de estabilidade (AHLNECK; ZOGRAFI 1990, KIM, 2004).

Interações intermoleculares podem resultar na diminuição da concentração de constituintes ativos e consequente redução da atividade biológica. A presença de enzimas e ação da luz e umidade pode favorecer a reações de oxidação, hidrólise e enzimática, resultando no aumento da taxa de degradação dos marcadores (BANSAL et al., 2016; THAKUR et al., 2018).

Há poucos estudos de estabilidade de fitoterápicos, realizados conforme guias oficiais (RDC 45/2012) e mesmo assim, os poucos registros ao demonstrar as interações físicas, químicas e biológicas entre excipientes e os marcadores, não entram no cerne dos mecanismos de degradação, nem investigam os fenômenos na escala micro (DE OLIVEIRA, 2011; BAJAJ; SINGLA; SAKHUJA, 2012; SOUZA et al., 2013;)

METODOLOGIA



4. Metodologia

4.1. Obtenção da droga vegetal

As Folhas da *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Griseb.) Altsch, foram coletadas no município de Caraúbas localizado na microrregião do cariri no estado da Paraíba (Lat. 7°30'48''S; Long. 36°41'81.0''O, 530 m de altitude) em maio de 2015. O projeto de pesquisa com *A. colubrina* recebeu autorização do ministério do meio ambiente do Brasil (ICMBio\SISBio\MMA-Brasil) para atividades com finalidade de pesquisa científica de nº 41277-2.

4.2. Identificação botânica

A identificação botânica da planta medicinal em estudo foi realizada pela professora Dra. Alessandra Vieira Lacerda (CDSA/UFCG), cuja exsicata foi depositada no herbário Lauro Pires Xavier, UFPB Joao Pessoa – Brasil, sob número de coleta: NC262. A desidratação das folhas do *A. colubrina* foi realizada em estufa com circulação de ar, à temperatura de 40±2 °C.

4.3. Solventes e padrões analíticos

Foram utilizados os solventes metanol grau HPLC (Sigma Aldrich®, Estados Unidos), ácido ortofosfórico (Merk®, Alemanha) e água ultra purificada, hexano PA ACS (Vetec®, Brasil), etanol 96% (Toscano®, Brasil) e diclorometano grau HPLC (Vetec®, Brasil). Padrão analítico quercetina com pureza de 98% da fabricante Sigma Aldrich® (Estados Unidos).

4.4. Equipamentos e instrumentação de análise

Todos os equipamentos e instrumentos utilizados nas análises, foram monitorados através de testes de adequabilidade do sistema, relatórios de auto checagem, testes de performance e laudos de qualificação de equipamentos. Na tabela 1, são listados os principais equipamentos e instrumentos utilizados.

Tabela 1 - Lista de equipamentos e instrumentos de análise

Equipamento/instrumento	Marca	Modelo	Finalidade de uso
Cromatógrafo líquido	Shimadzu®	Proeminence	Separação cromatográfica
<i>Spray dryer</i>	LabPlant®	SD05	Secagem dos extratos
Incubadora D.B.O.	Tecnal®	TE -371	Estudo de estabilidade
Moinho Mecânico	Laboremus®	-	Pulverização do material vegetal
Agitador granulométrico	Bertel®	BT-001	Ensaio de granulometria
Conjunto de tamises	Bertel®	-	Separação granulométrica
Estufa de ar circulante	Tecnal®	TE-394-4	Secagem do material vegetal
Agitador de tubos tipo vortex	Phoenix®	AP-56	Agitação e extração
Centrífuga	Centribio®	-	Separação de fases de soluções
Balança analítica	Shimadzu®	AW-220	Pesagem de amostras

4.5. Desenvolvimento de método analítico por CLAE-DAD.

Foi validado um método analítico por CLAE-DAD para quantificação do marcador quercetina em amostras de extrato fluido de *A. colubrina*.

O desenvolvimento do método foi realizado de acordo com o guia ICH Q2 (R1) e a resolução RDC ANVISA nº 899/98, onde foi avaliado os seguintes parâmetros: especificidade, seletividade, linearidade, limite de quantificação e detecção, precisão, exatidão, robustez e estabilidade das soluções (BRASIL, 2003; ICH Q2, 1995). Considerou-se desvio de até 2% na avaliação da adequabilidade do sistema cromatográfico e coeficiente de variação de até 15% para os demais parâmetros.

A escolha do marcador quercetina baseou-se em pesquisas bibliográficas de composição fitoquímica e ensaios preliminares de caracterização do extrato fluido de *A. colubrina* que apontou o mesmo como sendo majoritário (DE ARAÚJO et al., 2017; ARAÚJO et al., 2015).

4.5.1. Sistema cromatográfico

Utilizou-se Sistema de cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodo (CLAE-DAD) (SHIMADZU®, Japão); bomba 20AT, degaseificador DGU20A5, interface CBM 20A, auto injetor SIL 20A, detector SPD M20A, forno CTO 20A. Sistema de

controle foi realizado pelo software LC Solutions[®]. Fase estacionaria octodecilsilano C-18 Gemini nx 5 μ 150 x 4,6mm x 0,5 μ m (Phenomenex[®]); pré-coluna Gemini C-18 4 x 3,0mm (Phenomenex[®]), fase móvel filtrada em membrana PTFE de 0.45 μ m (Anow, Estados Unidos) e degaseificada: metanol: ácido fosfórico 1%, sistema isocrático (47: 53%). Fluxo da fase móvel: 1,2 mL/min; temperatura do forno da coluna 40°C; Número de onda monitorado em 370 nm; volume de injeção 20 μ L; tempo de corrida cromatográfica 30 minutos.

4.5.2. Parâmetros de validação

4.5.2.1. Avaliação da especificidade

A especificidade de um método, reside na capacidade de analisar determinado analito em uma matriz, de forma inequívoca mesmo em meio a substâncias interferentes e ou produtos de degradação. Para demonstrar a especificidade do método foram realizadas corridas analíticas em triplicata, das amostras do extrato fluido de *A. colubrina*, solução padrão de quercetina e solução da fase móvel do sistema cromatográfico, avaliando o perfil cromatográfico das amostras e pureza espectral do pico do padrão e marcador no extrato fluido.

4.5.2.2. Determinação da linearidade

A linearidade de um método é demonstrada através da capacidade de obter sinais analíticos diretamente proporcionais à concentração do analito presente na amostra, devendo apresentar relação linear em toda a faixa avaliada (Brasil, 2003).

A linearidade do método foi determinada mediante a construção de três curvas de calibração contendo oito pontos, a partir da solução estoque padrão de quercetina preparada a 200 μ g/mL. A partir da solução estoque foram obtidas soluções com concentrações correspondentes a 1,4 μ g/mL, 2,1 μ g/mL, 5,6 μ g/mL, 9,8 μ g/mL, 14 μ g/mL, 18,2 μ g/mL, 22,4 μ g/mL, 26,6 μ g/mL para construir a curva de linearidade. Este procedimento foi realizado em triplicata para cada nível de concentração.

4.5.2.3. Limites de quantificação e detecção

A determinação do limite de quantificação e detecção baseou-se no tratamento de dados da linearidade por método estatístico. O cálculo do limite de quantificação (LQ) foi obtido a partir da razão entre o desvio da regressão linear (EPADYX) pela inclinação da reta (IR), multiplicado por 10. O cálculo do Limite de detecção (LD) foi obtido a partir da razão entre o desvio da regressão linear pela inclinação da reta, multiplicado por 3,3. As equações 1 e 2 descrevem, respectivamente, o cálculo dos limites de quantificação e detecção para o método

proposto:

$$LQ = \frac{EPADYX}{IR} \times 10 \quad (1)$$

$$LD = \frac{EPADYX}{IR} \times 3,3 \quad (2)$$

4.5.2.4. Avaliação da precisão (repetibilidade)

A precisão de um método analítico é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem. A repetibilidade ou precisão intracorrida é a concordância entre os resultados dentro de um curto período com o mesmo analista e mesma instrumentação.

A repetibilidade foi demonstrada a partir da injeção de 06 amostras com teor de quercetina próximos ao valor médio (100%) da curva de linearidade do padrão. O critério de aceitação deste parâmetro foi um desvio padrão relativo de no máximo 5%.

4.5.2.5. Avaliação da precisão (precisão intermediária)

A precisão intermediária do método ou precisão intercorridas mede a concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes.

A precisão intermediária foi determinada a partir da análise de 06 amostras do extrato fluido, analistas diferentes e dias diferentes, com teor de quercetina próximos ao valor médio (100%) da curva de linearidade do padrão. Foram realizadas 18 corridas cromatográficas e o critério de aceitação foi de no máximo 5%.

4.5.2.6. Avaliação da exatidão

A exatidão de um método analítico mede a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. A exatidão é calculada como porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado à amostra, ou como a diferença percentual entre as médias e o valor verdadeiro aceito, acrescida dos intervalos de confiança.

A exatidão do método analítico para *A. colubrina* foi avaliada através da recuperação, após adição de concentrações conhecidas do padrão de quercetina, em amostras de extrato fluido. Três níveis de concentrações (baixa, média e alta) foram monitorados com valores correspondendo a 20%, 100% e 180% frente à concentração obtida na precisão. As amostras

foram preparadas em triplicata e as injeções foram realizadas em duplicata para cada nível de concentração, e avaliados os desvios padrão relativos e capacidade de recuperação.

A capacidade de recuperação foi calculada a partir do valor médio de concentração do marcador no extrato fluido padronizado. Na Tabela 2 é demonstrado como foram determinadas as concentrações de adição padrão e valores de recuperação em percentual do marcador para todos os níveis.

Tabela 2 - Processo de avaliação da exatidão do método.

Recuperação da adição padrão				
Nível	A ($\mu\text{g/ml}$)	B ($\mu\text{g/ml}$)	C ($\mu\text{g/ml}$)	% Recuperação (Rec)
20%	$[W_1]$	$[0,2 W_1]$	$[W_2]$	$\text{Rec } 20\% = \frac{[C]}{[A + B]} \times 100$
100%	$[W_1]$	$[W_1]$		$\text{Rec } 100\% = \frac{[C]}{[A + B]} \times 100$
180%	$[W_1]$	$[1,8 W_1]$		$\text{Rec } 180\% = \frac{[C]}{[A + B]} \times 100$

A (Concentração inicial de quercetina no extrato); B (Concentração do padrão adicionado); C (Concentração de quercetina no extrato pós recuperação); $[W_1]$ Concentração média da precisão intermediária; $[W_2]$ Concentração média experimental.

O parâmetro exatidão também foi avaliado através do estudo da regressão linear, onde é verificado se as recuperações apresentam distribuição linear com relação aos níveis de fortificação. Nessa avaliação parte-se do pressuposto que valores de recuperação devem ser o mais próximo possível dos valores de concentrações de fortificação, o que pode ser facilmente visto através dos coeficientes angular e de correlação (R^2).

4.5.2.7. Avaliação da robustez

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Esse parâmetro avalia a confiabilidade da análise em condições normais. Constatando-se a susceptibilidade do método a variações nas condições analíticas, estas deverão ser controladas e precauções devem ser incluídas no procedimento de análise.

Na avaliação da robustez do método foram as monitoradas variações nas condições de: temperatura do forno da coluna com variação de $\pm 2^\circ\text{C}$; variação do pH da fase móvel variando $\pm 0,1$ e alteração do fluxo da fase móvel $\pm 0,1$. Variações nos perfis cromatográficos como

tempo de retenção, área do pico cromatográfico e perfil espectral das amostras foram monitoradas.

A quantificação do marcador nas amostras do extrato fluido de *A. colubrina* foi determinada com substância padrão quercetina na mesma condição de análise do parâmetro robustez.

4.5.2.8. Avaliação da estabilidade das soluções

Este parâmetro de validação tem a finalidade de avaliar se um analito mantém-se quimicamente inalterado em dada matriz sob condições específicas, num determinado intervalo de tempo.

Para avaliar a estabilidade química no armazenamento das soluções do marcador e amostras do extrato fluido, as mesmas foram analisadas no tempo zero e 24 horas submetidas temperatura ambiente. Para demonstrar a estabilidade verificou-se perfil cromatográfico, análise das áreas dos picos cromatográficos, tempo de retenção e perfil espectral do marcador.

4.6. Avaliação granulométrica dos pós de *A. colubrina*

As folhas de *A. colubrina* foram desidratadas em estufa de ar circulante e trituradas em moinho mecânico. A determinação da granulometria dos pós da droga vegetal foi realizada em triplicata usando um sistema de tamises em plataforma auto vibratória com malhas entre 16 e 200 Mesh (1190 e 74 µm), massa 250 g de material, por 20 minutos. A massa retida nos tamises foi removida para um papel impermeável e realizada a pesagem do pó. O cálculo do percentual retido em cada tamis foi determinado conforme a equação 3:

$$\% \text{ Retido no tamis} = \frac{P_1}{P_2} \times 100 \quad (3)$$

Onde:

P1 = Massa da amostra retida em cada tamis (em gramas);

P2 = Soma das massas retidas em cada tamis e no coletor (em gramas);

No ensaio de granulometria foi avaliado a faixa de tamanho de partícula conforme mostrado na tabela 3:

Tabela 3 - Abertura de malha de tamis versus tamanho de partícula

Abertura de malha (Mesh)	Tamanho de partícula (μm^*)
>18	>1000
18-20	999 - 841
20-35	840 - 500
35-60	499 - 250
60-200	249 - 74

* μm (micrometros)

A Farmacopeia Brasileira apresenta uma abordagem para avaliação granulométrica, classificando os pós como descrito a seguir (BRASIL, 2010).

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 .

4.7. Avaliação do processo de maceração

4.7.1. Sistema de solvente

A droga vegetal foi moída e em seguida foram preparados os macerados com sistema de solvente composto por etanol e água (v/v), com objetivo de avaliar qual proporção do sistema de solvente possui melhor eficiência extrativa. Foram avaliadas três condições: 30:70 (v/v); 50:50 (v/v) e 70:30 (v/v) com proporção da massa da droga vegetal fixada em 20% (m/v) frente ao volume do sistema de solvente. A medida da eficiência extrativa das condições avaliadas foi determinada em função da concentração do marcador quercetina, quantificado por CLAE-DAD.

4.7.2. Tamanho de partícula

A eficiência extrativa também foi avaliada em função da influência do tamanho de

partícula da droga vegetal no processo de maceração, composto por sistema de solvente etanol: água 50% estabelecido previamente. A avaliação da influência do tamanho de partícula foi realizada na faixa entre 355 à 74µm (42 à 200 mesh), em função da concentração do marcador quercetina no extrato, empregando método analítico validado por CLAE-DAD.

4.8. Determinação de resíduo seco

A determinação do resíduo seco do extrato fluido foi realizada de acordo metodologia farmacopeica (BRASIL, 2010), onde 2 mL da solução extrativa foi pesada, em placa de petri previamente tarada em balança analítica e em seguida a solução foi evaporada em banho maria a 50°C. Após evaporação dos solventes, as amostras foram dessecadas em estufa a 105°C, por 3 horas.

Os resultados foram expressos em porcentagem (m/v) sobre o valor médio das variáveis das três determinações conforme a equação 4 abaixo:

$$\% \text{ Resíduo seco} = \frac{m}{v} \times 100 \quad (4)$$

Onde:

m = massa em gramas do resíduo seco

v= volume da amostra em mL

4.9. Obtenção dos extratos secos por *spray dryer*

Os extratos secos foram obtidos por processo de nebulização (aspersão) em mini *Spray Dryer*, LabPlant® (Huddersfield, Reino unido), modelo SD-05, com bico atomizador duplo fluido pneumático com orifício de 1,2 mm em fluxo concorrente, operado a uma taxa de fluxo de ar 40L/min e pressão de 2.0 bar. Uma bomba peristáltica move a amostra até o bico atomizador na câmara de secagem.

Alguns aspectos determinantes das características do extrato seco nebulizador, devem ser considerados antes do processo de secagem, como: resíduo seco do extrato fluido, teor alcoólico do macerado, porcentagem de adjuvantes de secagem que se pretende trabalhar e variáveis de processo do equipamento de secagem.

Os parâmetros avaliados durante o processo de secagem foram objeto de otimização experimental. O extrato seco nebulizado obtido foi acondicionado em sistema fechado e armazenada ao abrigo da luz e umidade.

A determinação da massa de adjuvante que se pretende adicionar no extrato fluido de

A. colubrina durante o processo de secagem foi baseada no resíduo seco do extrato fluido. Portanto de forma genérica, considerando um extrato fluido com resíduo seco de X% (m/v), e pretendendo-se obter um extrato seco com Y% (m/v) de adjuvante de secagem, a determinação da massa do adjuvante a ser adicionado no extrato fluido é calculado conforme a equação 5:

$$Z(g) = \frac{Y(g) \times X(g)}{100(g)} \quad (5)$$

Onde:

Z(g) é a massa de adjuvante que se deve adicionar ao extrato fluido;

Y(g) é a percentagem de adjuvante que se quer presente no extrato seco;

X(g) é o resíduo seco do extrato fluido;

4.10. Determinação do marcador quercetina nas amostras de extrato seco nebulizado

A determinação de quercetina no extrato seco nebulizado foi possível após reconstituição de 300mg em 5 mililitros (mL) de uma solução hidroalcolica a 50% (v/v).

A preparação de soluções padrão, o pré-tratamento de amostra do extrato seco reconstituído, foi realizado conforme estabelecido no método validado para o extrato fluido.

A avaliação de desempenho para assegurar a confiabilidade da medição analítica na quantificação do marcador, bem como o pré-tratamento de amostra do extrato seco, foram analisados conjuntamente com a co-validação do método analítico

4.11. Validação parcial do método analítico para matriz extrato seco nebulizado

Os parâmetros avaliados na validação parcial para análise do extrato seco foram especificidade, precisão e exatidão, sendo a abordagem e os critérios de aceitação os mesmos considerados na validação para o extrato fluido.

4.12. Planejamento fatorial e otimização experimental na obtenção do extrato seco

Um planejamento fatorial fracionário 2^3+1 foi aplicado para otimizar as condições experimentais do processo de secagem. Neste planejamento fatorial, as variáveis de processo (variáveis independentes) foram avaliadas para identificar os efeitos que cada uma das condições produziria sobre a concentração de quercetina a partir do extrato seco nebulizado.

As variáveis do processo foram avaliadas para identificar qual condição produziria extrato seco com maior teor de quercetina. As variáveis avaliadas foram: temperatura de

entrada (T_e) com 160, 170 e 180 °C, fluxo da bomba de alimentação (F_b) com 4,0, 6,0 e 8,0 ml/min e proporção do adjuvante dióxido de silício coloidal (P_{dsc}) com 10, 15 e 20 %.

A escolha do dióxido de silício coloidal (Aerosil^{®200}), como adjuvante tecnológico de secagem, baseou-se em suas características tecnológicas de produção de extratos com melhor estabilidade, tamanhos esféricos das partículas, características de fluxo e menor tendência a formação de aglomerados (VASCONCELOS et al., 2005; OLIVEIRA; PETROVICK, 2010).

A metodologia de superfície de resposta (MSR) foi aplicada aos dados para analisar os efeitos das variáveis do processo (individual e interativo) na variável dependente. Na tabela 4, estão discriminadas as variáveis codificadas e não codificadas, assim como os níveis do planejamento experimental a ser realizado.

Tabela 4 - Planejamento fatorial 2^3+1 com variáveis codificadas e não codificadas

	X_1	X_2	X_3	$X_1 (T_e \text{ } ^\circ\text{C})$	$X_2 (F_b \text{ mL min}^{-1})$	$X_3 (P_{dsc} \text{ } \%)$
1	-1	-1	-1	160	4.0	10
2	-1	-1	1	160	4.0	20
3	-1	1	1	160	8.0	20
4	-1	1	-1	160	8.0	10
5	0	0	0	170	6.0	15
6	1	-1	1	180	4.0	20
7	1	-1	-1	180	4.0	10
8	1	1	-1	180	8.0	10
9	1	1	1	180	8.0	20

(X_1): temperatura de entrada, (X_2): razão do fluxo da bomba, (X_3): proporção do dióxido de silício coloidal.

4.13. Rendimento do processo de secagem

O rendimento do processo de secagem foi calculado após a secagem do extrato. O produto seco foi pesado e teve sua massa calculada percentualmente em relação ao teor de sólidos presentes nas soluções extrativas conforme a seguinte equação 6:

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{m_1}{m_2} \times 100 \quad (6)$$

Onde:

m_1 é a massa experimental obtida do extrato seco nebulizado

m_2 é a massa teórica de extrato seco (resíduo do extrato mais a massa do adjuvante adicionado)

4.14. Preparação dos pré-formulados

Os pré-formulados contendo extrato seco de *A. colubrina* foram preparados através de mistura física em triplicata contendo massa de 1,5g extrato seco obtido na otimização do planejamento experimental e 1,5g de massa dos excipientes farmacêuticos: amido pré-gelatinizado, celulose microcristalina 102 (MC), maltodextrina (MD) e lactose M 200 (LAC), onde foram misturados por 10 minutos em potes plásticos.

4.15. Estudo de estabilidade acelerada

Os testes de estabilidade acelerada têm o objetivo de induzir o aumento da velocidade de degradação química e/ou alterações físicas no pré-formulado contendo extrato seco de *A. colubrina*, através de condições extremas de armazenamento, com o propósito de monitorar as reações de degradação e estimar o prazo de validade do pré-formulado (MEIRELLES, 2014; VELASCO et al., 2009; ISAAC et al., 2009).

O estudo de estabilidade acelerada dos pré-formulados contendo extrato seco de *A. colubrina*, foi realizado conforme guias oficiais da Agencia Europeia de Medicamentos e RDC 45/2012 da Agencia Nacional de Vigilância Sanitária (GUIDELINE, 2003; ANVISA, 2005), com os pré-formulados acondicionados em embalagem primária e armazenados na câmara climática DBO® com controle de temperatura por um período de 180 dias, sob temperatura de $40 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade relativa de 75%.

Uma massa de 3g do pré-formulado composto por extrato seco de *A. colubrina* e excipientes (amido, celulose microcristalina 102, maltodextrina e lactose) foi transferido para sachês impermeáveis (PVC-Alumínio) em triplicata. O estudo de estabilidade avaliou o teor de quercetina ao longo de 180 dias (0, 90, 180) através de CLAE-DAD.

Análise de amostras dos pré-formulados

A análise dos pré-formulados obtidos seguiu metodologia covalidada por CLAE-DAD para análise do extrato seco de *A. colubrina*. Para tanto foi pesado 600mg da massa do pré-formulado e seguiu procedimento descrito para análise de extratos secos.

4.16. Determinação dos parâmetros cinéticos

Os parâmetros cinéticos, ordem de reação (n) e constante de decomposição (k) foram obtidos pela equação 7, conhecida como equação de Arrhenius:

$$k = A \exp \frac{E_0}{RT} \quad (7)$$

Onde:

A é o fator pré-exponencial;

R é a constante ideal dos gases (8.314J/mol.K);

T é a temperatura absoluta;

E₀ é a energia de ativação (J/mol)

A ordem da reação de degradação é estabelecida avaliando-se os ajustes dos modelos de zero, primeira e segunda ordens através do coeficiente de correlação linear (R²). Recorrendo a equação de Arrhenius é calcula-se a constante de velocidade da reação (k) a 25 °C por extrapolação e, diante deste valor, calcula-se o prazo da validade, t₉₀ ou α_{0,9} na temperatura de 25 °C. O α_{0,9} representa o tempo necessário para que o ativo degrade 10% da concentração do tempo zero, sendo então aceito como determinação de prazo de validade (OLIVEIRA, 2011).

Os modelos cinéticos de degradação do marcador quercetina foram definidos como de ordem zero, primeira e segunda ordem de acordo com as equações (8), (9) e (10), respectivamente.

$$m = m_0 - k_0 T \quad (8)$$

Onde:

m é a massa no tempo avaliado

m₀ é a massa inicial do marcador;

k₀ é a constante de ordem-zero.

Para as reações de primeira ordem, o logaritmo da massa no tempo avaliado é plotado em função da temperatura e do logaritmo da massa inicial, conforme a seguinte equação 9:

$$\log m = \frac{k_1 T}{2,303} + \log m_0 \quad (9)$$

Onde:

m é a massa no tempo em análise

m₀ é a massa inicial do marcador;

k₁ é a constante de segunda ordem.

Para as reações de segunda ordem o inverso da massa é plotado em função da

temperatura, de acordo com a seguinte equação 9:

$$\frac{1}{m} = \frac{1}{m_0} + k_2 T \quad (10)$$

Onde:

m é a massa no tempo em análise

m₀ é a massa inicial do marcador;

k₂ é a constante de segunda ordem.

4.17. Análise estatística

Os dados experimentais foram analisados com o auxílio do software STATISTICA[®], versão trial 13.1 (Dell Inc[®], Tulsa, USA) e software Excel for Windows[®] (Microsoft[®]). Os resultados foram expressos em média e desvio padrão (± DP) e coeficiente de variação em termos percentuais (CV %). As médias foram comparadas usando análise de variância (ANOVA), onde as diferenças foram consideradas estatisticamente significantes para valores de p<0,05.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. Resultados e discussão

5.1. Desenvolvimento do método analítico por CLAE-DAD

O desenvolvimento de métodos cromatográficos é de fundamental importância, pois estabelece condições ótimas de separação dos constituintes de uma matriz multicomponente, avalia os parâmetros de eficiência de separação cromatográfica, bem como auxilia nos processos de pré-tratamento de amostras.

Timóteo e colaboradores (2015) ao validarem um método para análise de chás medicinais descobriram que um único pico cromatográfico correspondia a três constituintes. A separação precisa dos constituintes só foi possível após a variação das condições de separação, utilizando a fase estacionária com diferentes características, dimensões e monitoramento da pureza espectral.

O delineamento do método para extrato fluido de *A. colubrina* foi realizado por CLAE-DAD com um sistema de fase móvel composto por metanol grau HPLC e 0,1% de ácido ortofosfórico 85%, com pH 2,5 e variando a proporção do componente orgânico em 30:70, 50:50 e 70:30 (v/v).

No desenvolvimento do método analítico, as amostras de extrato fluido de *A. colubrina* e padrão de quercetina foram avaliados nas mesmas condições cromatográficas, sendo que as condições 30:70 e 70:30 (v/v) produziram perfis cromatográficos com amontoados de picos, já analisando a condição 50:50 (v/v) foi possível obter eluição do marcador quercetina porém sem pureza espectral indicando co-eluição de um componente em menor quantidade, esta interferência na co-eluição foi comprovada pela pureza espectral do padrão quercetina na mesma condição de análise.

De acordo com uma revisão sobre os recentes avanços em tecnologia analítica aplicada a controle de qualidade de plantas medicinais, matriz complexa, substâncias interferentes e co-eluições de picos nas separações cromatográficas, não permitem uma caracterização reprodutível de extratos (STEINMANN; GANZERA, 2011; DAI; MUMPER, 2010).

Chabariberi e colaboradores (2009) ao validarem uma metodologia por espectrofotometria para análise de flavonóides em extratos de *Maytenus* (*Celastraceae*) e *Passiflora* (*Passifloraceae*) encontraram diferenças entre as absorbâncias máximas de análise e as registradas no método oficial de monografia farmacopeica que quantificaram os flavonoides totais expressos em rotina. Essas diferenças podem ser atribuídas a mudanças no pré-tratamento da amostra, bem como à complexidade da matriz vegetal e

da fração analisada.

O efeito matriz é um parâmetro ainda pouco avaliado nos protocolos de validação, e tem sido omitido na maioria dos métodos até aqui citados. No entanto, este parâmetro é muito importante para obter um método analítico com todas as prerrogativas de significado que o termo validação possui (SPÍNOLA; LLORENT-MARTÍNEZ; CASTILHO, 2014).

O desenvolvimento do método mostrou a necessidade de otimizar a condição de eluição para 47:53, metanol 0,1% de ácido fosfórico, pH 2,5 e de realizar um pré-tratamento de amostra que assegurasse análises mais limpas e livres de interferentes como graxas e pigmentos (HSU et al., 2017).

Substâncias ácidas como: ácido fórmico, fosfórico e clorídrico são muito frequentes nas análises de flavonoides por cromatografia e isso se deve ao fato de grupamentos OH pertencentes a estrutura dos flavonoides facilmente se ionizarem. A caracterização cromatográfica dessa ionização é demonstrada na formação de picos assimétricos com caudas, daí a necessidade de suprimir a ionização das hidroxilas, assegurando a eluição do analito em meio ácido (DE OLIVEIRAa et al., 2017; DIAS; SOUZA; ROGEZ, 2010).

Além dos aspectos considerados até aqui, a seleção da condição de separação do método foi baseada nos parâmetros de resolução de pico (R_s), índice de retenção (k'), fator de cauda (T), eficiência de separação (α) e número de pratos teóricos (N) em relação ao pico do flavonoide quercetina.

Conforme mostrado na tabela 5, as condições otimizadas geraram cromatogramas com excelentes resultados analíticos, com fator de retenção dentro da faixa ideal ($1,0 < k' < 10$), valor de eficiência de separação superior a 1,0 e resolução de pico acima de 2,0. A fase estacionária mostrou-se ótima com fator de cauda entre 0,5 e 2,0 e número de pratos teóricos com valor de 3878, superior ao recomendado de 2000.

Tabela 5 - Parâmetros de eficiência de separação cromatográfica

Quercetina padrão (Tempo de retenção = 10,1 min)	Fase móvel*	Valores de referência
Resolução (R_s)	2,07	$R_s > 1.5$
Fator de retenção (K')	3,76	$1 \leq K' \leq 10$
Fator de cauda (T)	1,020	$0.5 \leq T \leq 2$
Eficiência de separação (α)	1,23	$\alpha > 1$
Número de pratos teóricos (N)	3878	$N > 2000$

* Fase móvel constituída por 47% metanol e 53% ácido fosfórico 0,01%.

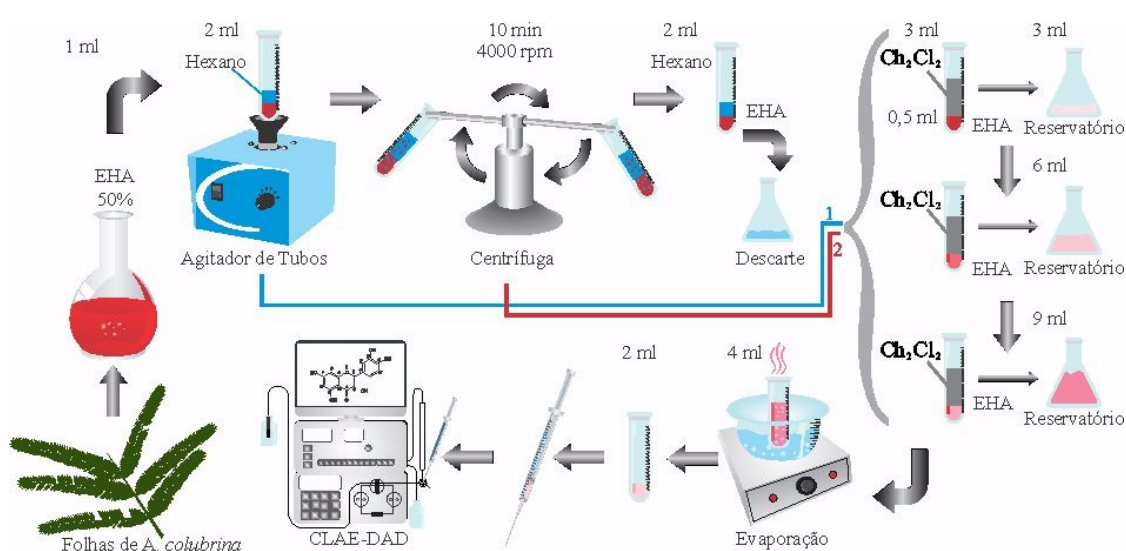
5.1.1. Pré-tratamento de amostras de extrato de *A. colubrina* e extração da quercetina

O desenvolvimento do método de extração do marcador de quercetina do extrato e análise por CLAE-DAD foi possível após o pré-tratamento das amostras, onde foram avaliados o potencial extrativo de solventes com diferentes polaridades, como diclorometano, acetato de etila e clorofórmio.

A extração com acetato de etila mostrou um sistema monofásico com difícil separação, não sendo possível realizar a extração. Já o solvente clorofórmio foi capaz de extrair o marcador, porém com limitação, cuja recuperação apresentou reprodutibilidade variável. O solvente diclorometano mostrou-se o mais adequado para extrair o analito de forma eficiente, através de extração líquido-líquido.

A recuperação do marcador também foi avaliada através de diferentes frações aquosas de extrato hidroalcoólico de 0,5 a 2 mL, onde foi determinada a recuperação e a seletividade do marcador na extração. A melhor recuperação foi obtida na fração de 0,5 mL com extração múltipla contínua (três etapas), obtendo-se uma separação do marcador com seletividade e recuperação adequada. A etapa final do pré-tratamento da amostra foi a evaporação a 50°C de 4,0 mL de fração diclorometano obtida nas extrações múltiplas contínuas e seguida de reconstituição da mesma na fase móvel. A solução reconstituída foi filtrada e transferida para “vials” para injetar no sistema cromatográfico. Na figura 9, é mostrado um quadro esquemático do desenvolvimento de pré-tratamento das amostras de extrato de *A. colubrina*.

Figura 7 - Esquema do desenvolvimento do método de pré-tratamento de amostra



Fonte: Autor (2018)

5.1.2. Determinação do Fator de Análise

O fator de análise foi determinado com base nas sucessivas diluições realizadas na extração múltipla contínua que permitiu quantificar o teor do marcador quercetina presente no extrato fluido em microgramas por mililitros ($\mu\text{g/mL}$).

A equação 11 mostra como determinar da concentração do marcador no extrato fluido.

$$Ca = Cp \times FA \times Aa \div Ap \quad (11)$$

Onde:

Ca é concentração do marcador quercetina na amostra de extrato fluido expresso em microgramas por mililitros ($\mu\text{g/mL}$),

Aa é área do pico cromatográfico do marcador no extrato fluido,

Ap é área do pico cromatográfico do padrão quercetina,

Cp é a concentração da substancia química de referência quercetina,

FA é o fator de análise, calculado conforme equação 12.

$$FA = Ta \div \{[(Ta \div Fec) \times Fevap] \div Vrec\} \quad (12)$$

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.

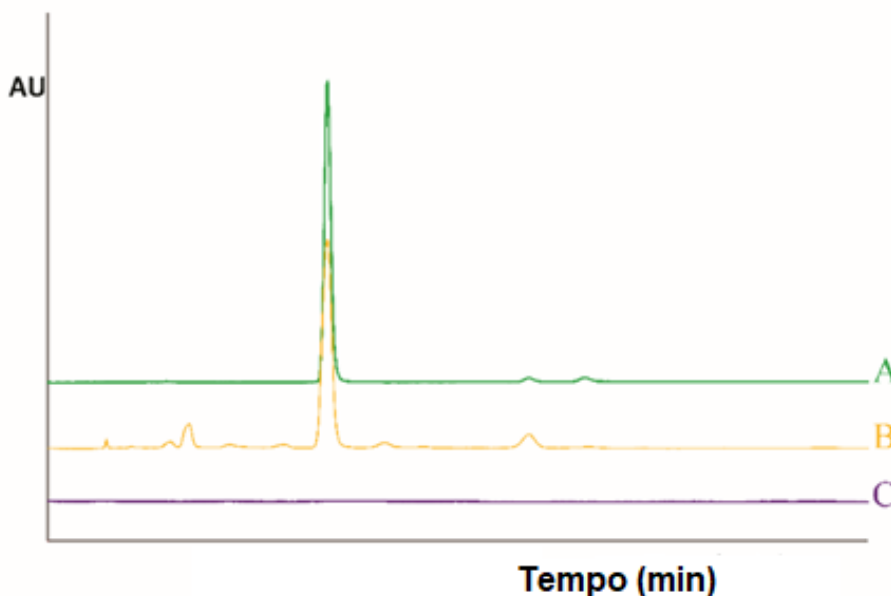
5.1.3. Parâmetros de validação do método analítico para matriz extrato fluido por CLAE-DAD.

5.1.3.1. Avaliação da seletividade do método

A seletividade do método foi demonstrada através de teste de identificação do marcador quercetina em presença de componentes da matriz complexa e comparação dos perfis cromatográficos de solução da fase móvel, substancia padrão quercetina e marcador quercetina presente no extrato fluido.

Conforme mostrado na figura 8, a ausência de sinais ou picos cromatográficos próximos do tempo de retenção do marcador quercetina, foi satisfatória considerando a alta complexidade do extrato de *A. colubrina*. A seletividade do método paralelamente foi confirmada pelos dados obtidos de parâmetro de eficiência de separação cromatográfica plotados na tabela 8 (ver item 5.5).

Figura 8 - Perfil cromatográfico do padrão quercetina, amostra de extrato fluido e solução da fase móvel.

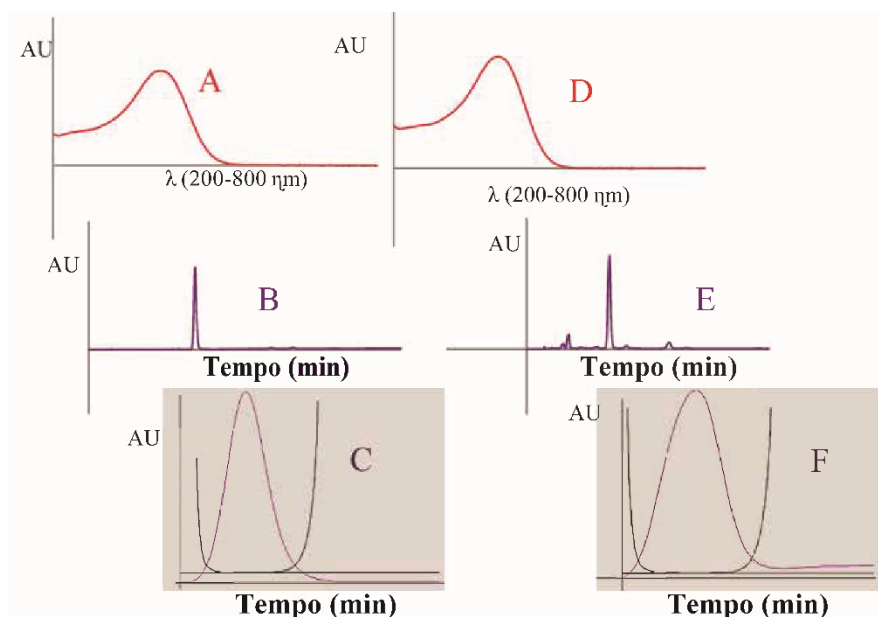


Perfis cromatográficos de fase móvel (C), amostra de extrato fluido (B), solução padrão de quercetina (A).

A análise simultânea dos espectros da amostra do extrato fluido e padrão quercetina, mostrado na figura 9, demonstram a especificidade do método através da semelhança de perfil espectral e identificação do máximo de absorbância em 370nm.

Os perfis espectrais indicados por A e D referem-se ao espectro no ultravioleta do padrão quercetina e marcador monitorado; apresentando perfil semelhante para ambas às amostras com máximo de absorbância de 370nm. Já os perfis C e F demonstram pureza espectral para ambos os picos cromatográficos mostrados nos perfis B e E que representam corrida cromatográfica da substancia padrão e amostra de extrato fluido.

Figura 9 - Perfil espectral da quercetina (referencia) e do marcador monitorado no extrato fluido das folhas de *A. colubrina*



O espectro UV, cromatograma e perfil de pureza espectral estão respectivamente indicados pelas letras A, B e C (padrão de quercetina) e D, E e F (marcador quercetina).

5.1.3.2. Determinação da linearidade do método

A linearidade do método foi avaliada pela análise de regressão linear das três curvas de calibração experimental, na faixa de 1,4 µg/mL a 26,6 µg/mL, composta por 8 níveis de concentração da substância padrão quercetina e verificada a relação entre concentração e sinal analítico do sistema CLAE-DAD.

Na tabela 6 estão plotados os dados das três curvas de calibração com valores de concentração do padrão com suas respectivas áreas individuais e médias, bem como seus respectivos coeficientes de variação.

Tabela 6 - Valores dos níveis de concentração *versus* áreas de picos

Concentração (µg/mL)	Área do padrão quercetina				
	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Área média	*Cv (%)
1,4	72024	75037	78594	75218	4,37
2,1	112323	119313	117001	116212	3,06
5,6	299486	318192	307185	308288	3,05
9,8	545149	559621	551288	552019	1,32
14,0	791774	811995	786344	796704	1,70
18,2	1036741	1039369	1037576	1037895	0,13
22,4	1271801	1266402	1268040	1268748	0,22
26,6	1525510	1493069	1494899	1504493	1,21

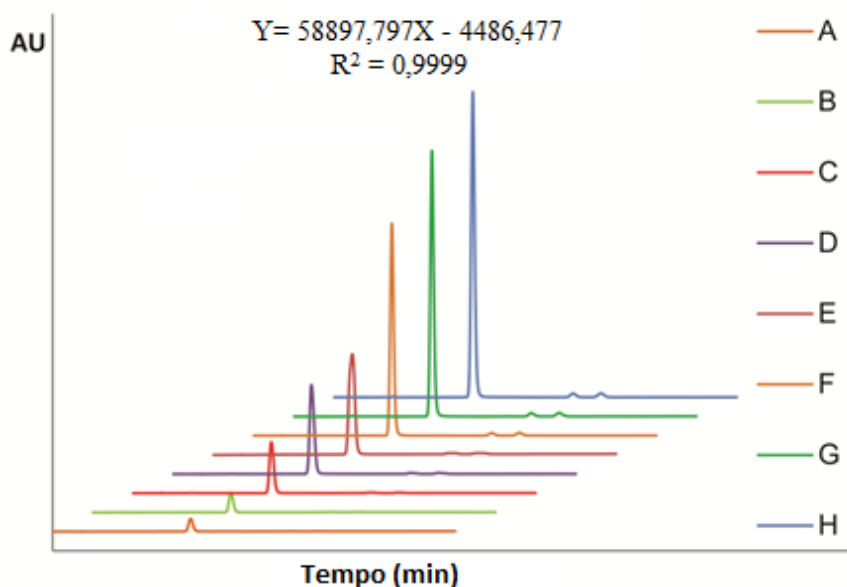
Nota: *Cv (%) coeficiente de variação.

O coeficiente de correlação R^2 permite estimar a qualidade da relação linear da curva de calibração obtida, pois quanto mais próximo de 1, menor a dispersão do conjunto de dados experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados (SILVA et al., 2015; DE SOUSA NUNES et al., 2005).

A partir das curvas em triplicatas foi obtida a linearidade média, descrita pela equação “ $Y = 56.897,80x - 4.486,48$ ” e produzida pelo método dos mínimos quadrados cujo coeficiente de correlação linear (R^2) foi de 0,9999, demonstrando fortíssima correlação de relação linear entre concentração de quercetina e área do analito.

A linearidade do método foi avaliada pela análise de variância, através da qual foi demonstrado que o F tabelado é maior que o valor de F calculado, para um intervalo de confiança de 95% ($\alpha > 0,05$), portanto não apresentando diferença significativa dentro do conjunto de dados avaliados. Na tabela 7 estão plotados os parâmetros de regressão linear das 3 curvas de calibração de quercetina e na tabela 8 estão plotados dados da análise de variância (A NOVA) com parâmetros estatísticos para a linearidade.

Na figura 10 é mostrado o perfil cromatográfico de cada um dos 8 níveis de concentração de quercetina em ordem crescente de linearidade.

Figura 10 - Perfis cromatográficos dos 8 níveis da linearidade.

A (1,4 µg/mL), B (2,1 µg/mL), C (5,6 µg/mL), D (9,8 µg/mL), E (14,0 µg/mL), F (18,2 µg/mL), G (22,4 µg/mL) e H (26,6 µg/mL).

Tabela 7 - Parâmetros de regressão linear das curvas de calibração.

Variáveis	Curva 1	Curva 2	Curva 3
Slope	57655	56457	56581
Intercepto Y	14558	3956	2858
Intercepto X	57655	56457	56581
1/Slope	1,73E-05	1,77E-05	1,77E-05
Intervalo de confiança*		95%	
R²	0,999	0,999	0,999

* ($\alpha > 0,05$)

Tabela 8 - Análise de variância da linearidade do padrão

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	114888637,6	2	57444318,79	0,0002	0,9998	3,4668
Dentro dos grupos	6,0020E+12	21	2,85812E+11			
Total	6,0021E+12	23				

Nota: * $P < 0,05$ *efeito significativo

5.1.3.3. Determinação do limite de detecção e quantificação do método

Os limites de detecção e quantificação foram determinados com base nos parâmetros da equação da regressão linear a partir da curva de linearidade e por meio de

tratamento estatístico, empregando as formulas descritas na metodologia.

Os valores determinados para os limites de quantificação e detecção da quercetina foram respectivamente, 0,81 µg/mL e 0,27 µg/mL, demonstrando que o método é sensível para detectar e quantificar o marcador quercetina nas amostras de extrato fluido de *A. colubrina*.

5.1.3.4. Avaliação da precisão do método (Repetibilidade e precisão intermediária)

A precisão intra corrida (repetibilidade) do método foi avaliada por um analista em um único dia e cromatógrafo perfazendo um total de seis corridas da amostra do extrato fluido de *A. colubrina*. A precisão intercorrida (intermediária) foi avaliada por três analistas, em três dias perfazendo um total de dezoito corridas de amostras do extrato fluido *A. colubrina*.

As determinações de concentração das amostras foram baseadas na análise da adequabilidade do sistema realizada dia a dia com solução padrão de quercetina na concentração equivalente ao ponto médio da curva de calibração. Os resultados da precisão estão plotados na tabela 9 com as médias e coeficientes de variação para as análises realizadas.

Tabela 9 - Repetibilidade e precisão intermediaria do método

Repetibilidade			
		Concentração de quercetina (µg/mL)	CV (%)
Média ^a ± DP		114.96 ± 2.23	1.9
Dia	Precisão intermediária (intra dia)		
1	Média ^b ± DP	127,01 ± 4,06	3,2
2	Média ^b ± DP	125,05 ± 1,10	0,88
3	Média ^b ± DP	125,67 ± 2,92	2,32
Precisão intermediária (inter dia)			
Média ^c ± DP		125,92 ± 2,90	2,30

Nota: ^a, ^b n = 6; ^c n = 18, DP (desvio padrão)

Os dados demonstram que o método possui precisão analítica tanto na repetibilidade quanto na precisão inter-dia, o que pode ser demonstrado pela reprodutibilidade das análises com baixos valores de coeficientes de variação de 1,9% na repetibilidade e 2,3% na precisão intermediaria, satisfazendo assim exigências dos guias

de validação de métodos analíticos (GUIDELINE ICH, 2005; BRASIL, 2003).

A avaliação estatística dos dados da precisão, não se baseou apenas nos valores de coeficiente de variação, mas na análise de variância (ANOVA) do conjunto de dados intermediária que demonstrou que não haver diferenças significativa entre os dados ($p > 0,05$), com valor de F crítico maior que valor de F calculado (tabelado) considerando um intervalo de confiança de 95% ($\alpha > 0,05$).

5.1.3.5. Avaliação da exatidão do método

A exatidão de um método é a medida da proximidade dos resultados obtidos durante uma sequência de análises em dado estudo, em relação ao valor verdadeiro do analito previamente estabelecido. Em se tratando de matrizes complexas, como o extrato de *A. colubrina* onde o marcador quercetina é um analito intrínseco a matriz, a avaliação da exatidão do método é realizada através da recuperação da adição de quantidades conhecidas de quercetina às amostras de extratos em 3 níveis de concentração (baixo, médio e alto).

De modo geral, o método de adição padrão é trabalhoso, mas indispensável principalmente quando há dificuldade de encontrar um padrão interno adequado ou quando não há matriz livre ou isenta do marcador analisado, quando as interações com a matriz são significativas, demonstrando a complexidade da amostra (RIBANI et al., 2004).

A determinação de concentração de adição padrão para os níveis: baixo (20%), médio (100%) e alto (180%) foram calculados com base nos dados de concentração média da precisão intermediária. As amostras foram preparadas em triplicata e as análises foram realizadas em duplicatas para cada nível de concentração, onde foram monitorados os coeficientes de variação e capacidade de recuperação.

Mattila e colaboradores (2000) determinaram a quantidade de quercetina na maçã, vinho tinto e chá verde obtendo recuperação médias de 79%, 104% e 82% respectivamente, comparada à amostra de referência de 93%, o que demonstra haver variabilidade na extração em diferentes matrizes e a importância de estabelecer estratégias de remoção de interferentes.

De acordo com os resultados, plotados na tabela 10, as amostras com os níveis de exatidão: baixo, médio e alto apresentaram capacidades de recuperação de quercetina com valores de coeficiente de variação abaixo de 5%, demonstrando a precisão dos dados da exatidão, satisfazendo assim os critérios de aceitação dos guias oficiais de validação de métodos analíticos.

Tabela 10 - Avaliação da exatidão do método através da recuperação

Nível (%)	A* (µg/ml)	B* (µg/ml)	C* (µg/ml)	Recuperação (%)	CV (%)
20 % ^a	125,9	25,2	24,6	97,5	2,9
100 % ^b		125,9	118,09	93,8	1,8
180 % ^c		226,6	209,6	92,5	3,7

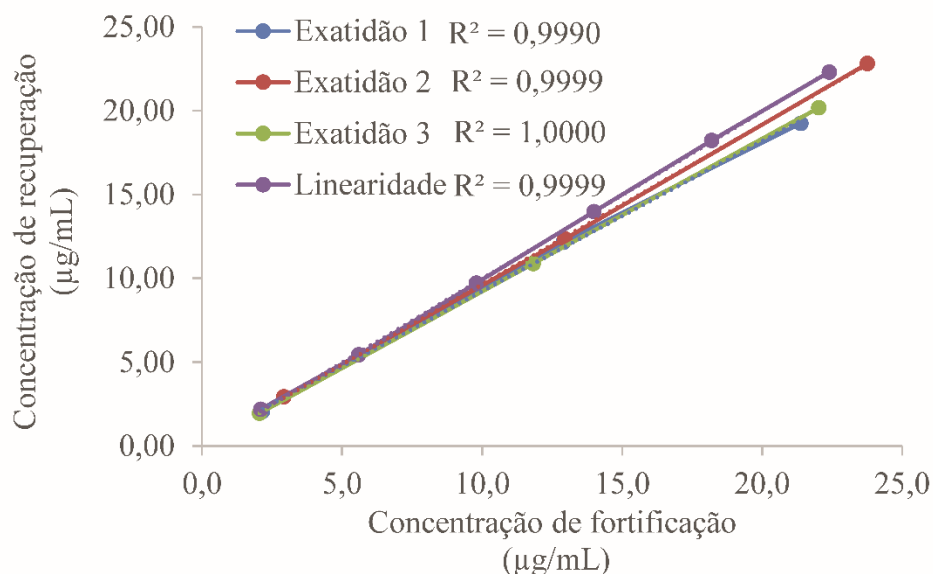
Nota: A (Concentração inicial de quercetina no extrato); B (concentração do padrão de quercetina adicionado); C (quantidade recuperada), * n =18, CV (coeficiente de variação)

Tang e colaboradores (2010), avaliando a recuperação do marcador de quercetina em amostras de extrato de *Ginkgo biloba*, obtiveram valores de recuperação entre 97,2 e 101,4% com 2% de coeficiente de variação. Outro estudo, avaliando diferentes técnicas de extração dos flavonoides quercetina e canferol em matrizes de plantas, apresentou valores de recuperação destes analitos após adição padrão entre 96,8 e 98,2% (SKALICKA-WOŹNIAK; SZYPOWSKI; GŁOWNIAK, 2011). Esses trabalhos demonstram que dados de exatidão com baixos desvios e valores de recuperação acima de 90% podem ser alcançados em matrizes complexas, como obtido nas amostras de *A. Colubrina*.

A exatidão do método também foi avaliada pela análise da regressão linear, observando se a recuperação do marcador da matriz complexa apresenta relação linear com os níveis de fortificação estabelecidos para adição padrão nas amostras. Nessa abordagem de exatidão, os parâmetros mais importantes são: coeficiente angular e linear da reta, que em condições ideais, o coeficiente linear se aproxima o mais próximo de zero e angular o mais próximo de 1 (BRITO et al., 2003).

De acordo com a figura 11, verificamos que há forte correlação entre concentração adicionada e recuperada nos três níveis avaliados, indicando que a matriz não exerce efeito significativo na recuperação do analito quercetina e que o método nas condições avaliadas produz resultados com exatidão.

Figura 11 - Linearidade da relação entre a concentração recuperada e concentração de fortificação de quercetina.



Na tabela 11, são apresentadas as equações das retas da regressão linear para quercetina padrão e para os níveis de exatidão avaliados, onde é possível ver que os coeficientes angulares estão próximos a 1 e os coeficientes lineares próximo a zero.

Tabela 11 – Avaliação da exatidão pelo método da regressão linear

Regressão linear	Equação ($y = ax + b$)	Coeficiente de correlação (R^2)
Linearidade	$y = 1,0000x + 0,0000$	0,9999
Exatidão 1	$y = 0,8953x + 0,2757$	0,9990
Exatidão 2	$y = 0,954x + 0,0916$	0,9999
Exatidão 3	$y = 0,9122x + 0,0869$	1,0000

Nota: (a) coeficiente angular, (b) coeficiente linear

5.1.3.6. Avaliação da Robustez

As amostras foram preparadas em triplicata e as análises foram realizadas em duplicatas, avaliando condições cromatográficas que requerem atenção quanto a possíveis mudanças nos parâmetros de análise. As variações típicas monitoradas na robustez de um método analítico são: temperatura do forno da coluna, a composição, pH e fluxo da fase móvel (LEITE et al., 2017).

Na validação do método para análise de extratos de *A. colubrina*, a robustez do método avaliou a temperatura, fluxo e pH da fase móvel, como condição crítica em cromatografia líquida e passível de pequenas e deliberadas mudanças. Foram realizadas corridas com base nas condições normais de corrida e em seguida corridas para cada

condição alterada tanto para amostra, quanto para solução padrão de quercetina. A tabela 12 mostra os resultados obtidos em média e coeficientes de variação para cada condição avaliada, onde foram monitoradas variações na área do pico cromatográfico do marcador quercetina.

Tabela 12 - Parâmetros avaliados na robustez do método

Condição normal	Temperatura (°C)		Fluxo (ml min ⁻¹)		pH	
	40		1.2		1.6	
Concentração ^a (µg/ml)			125.1			
CV (%)			1.2			
Condição teste	38	42	1.1	1.3	1.5	1.7
Concentração ^a (µg/ml)	124.2	125.6	124.3	126.1	114.8	115.9
CV (%)	1.4	1.0	3.5	4.0	2.0	0.5

Nota: ^a Concentração média de análise em triplicatas

Na avaliação da influência do fluxo da fase móvel na variação sobre área do pico do marcador quercetina, foi observado que este parâmetro na condição avaliada de $\pm 0,1$ mL não influenciou nos resultados de área e, por conseguinte no teor de quercetina. Na avaliação da influência da temperatura do forno de coluna na variação da área do pico do marcador quercetina, observou-se que este parâmetro nas condições avaliadas $\pm 2^\circ \text{C}$ não influenciou os resultados.

Na avaliação da influência do pH da fase móvel sobre área do pico do marcador, foi observado que este parâmetro na condição avaliada $\pm 0,1$ influenciou nos resultados de área e, por conseguinte de teor de marcador. A análise de variância ANOVA, com intervalo de confiança de 95%, mostrou valor F calculado maior que o valor de F crítico, confirmando assim a significância do efeito que o parâmetro pH, exerceu no conjunto de dados avaliados. Essa variação pode ser atribuída a problemas de ionização da molécula do marcador, sendo, portanto, o pH um parâmetro crítico a ser monitorado no método proposto.

A robustez do método também foi avaliada com base nos parâmetros da separação cromatográfica, avaliando como a temperatura, fluxo e pH nas condições limite poderiam interferir na análise de extratos de *A. colubrina*. A análise dos parâmetros de separação cromatográfica, como: resolução do pico (R_s), o índice de retenção (k'), o fator de cauda (T), a eficiência de separação (α) e números de pratos teóricos (N) foram realizados em

relação ao pico principal de quercetina.

Os resultados mostram (tabela 13) que o parâmetro robustez está validado nas condições avaliadas, para análise do marcador quercetina, onde os valores de parâmetros de eficiência de separação estão dentro dos limites recomendados para uma separação cromatográfica eficiente.

Tabela 13 - Avaliação dos parâmetros de eficiência de separação na robustez

Parâmetro*	Temperatura °C		Fluxo mL/ min ¹		pH		Valor de Referência
	38	42	1.1	1.3	1.5	1.7	
Rs	2,29	2,75	2,25	2,16	2,09	2,10	Rs > 1,5
K'	4,13	4,30	3,75	3,78	3,89	3,70	1 ≤ K' ≤ 10
T	1,04	0,965	1,01	1,01	1,01	1,00	0.5 ≤ T ≤ 2
α	1,26	1,25	1,25	1,25	1,23	1,25	α > 1
N	4076	3956	4199	3825	4008	3913	N > 2000

*(Rs) resolução, (K') fator de retenção, (T) fator de cauda, (α) eficiência de separação, (N) número de pratos teóricos. Pico da quercetina em condição normal de análise: temperatura = 40 °C; fluxo = 1,2 ml/ min; pH = 2,5; Rs = 2,07; K' = 3,76; T = 1,02; α = 1,23, N = 7878.

5.1.3.7. Avaliação da estabilidade das soluções amostra

A estabilidade das amostras de extrato fluido de *A. colubrina* foram analisadas no tempo zero e 24 horas após o tempo zero. Analisou-se o coeficiente de variação dos dados e variação do teor do marcador. Os dados de estabilidade estão plotados na tabela 14.

Estes resultados estão de acordo com os requisitos mínimos de guias oficiais para validação de métodos analíticos e demonstram que o método desenvolvido pode ser adequadamente aplicado para análise de quercetina em amostras de extrato de *A. colubrina* (BRASIL, 2003).

Métodos que analisam flavonoides sem necessidade de hidrólise ácida e aquecimento de amostra apresentam vantagens na análise direta destes compostos, podendo ser aplicado no estudo de estabilidade acelerada sem risco de degradação, associado a processo de aquecimento, gerando assim dados mais confiáveis com melhor correlação com os dados de longa duração do estudo de estabilidade confirmatória (MONAGO-MARAÑA; DE LA PEÑA; GALEANO-DÍAZ, 2016).

Tabela 14 - Avaliação da estabilidade de amostras de *A. colubrina*.

	Concentração de quercetina (µg/mL)	
	Tempo zero	24 horas
Media* ± DP; CV (%)	114,96 ± 2,23; 1,9	113,78 ± 1,92; 1,7

Nota:*Concentração média de análise em sextuplicaras.

5.2. Padronização do extrato fluido de *A. colubrina*

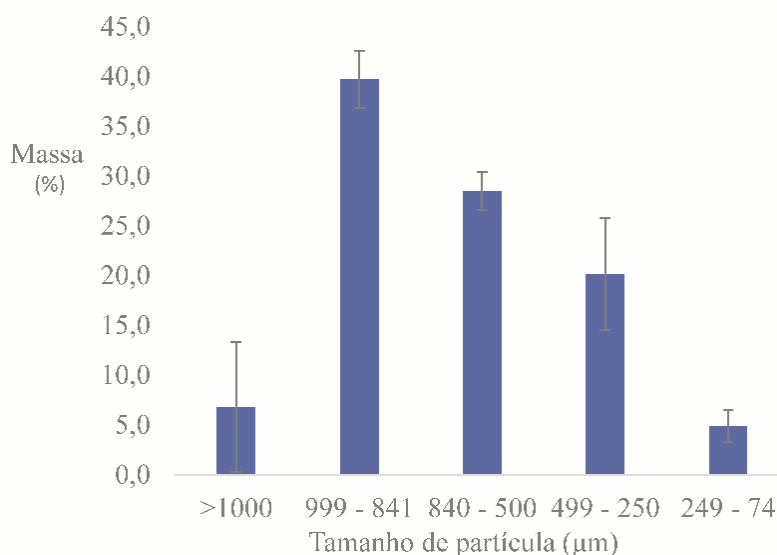
5.2.1. Determinação da granulometria dos pós das folhas da droga vegetal

A granulometria dos pós de uma droga vegetal pulverizada é uma determinação importante, pois permitir caracterizar a distribuição do tamanho de partícula dos pós e correlacionar essa granulometria com a eficiência extrativa dos sistemas de solventes (PÉRTILE et al., 2007; LIST; SCHMIDT, 1989).

Pós com tamanho de partícula muito pequeno, podem promover compactação do material, resultando em baixa interação com o sistema de solvente e consequente baixa eficiência extrativa. Já o material com tamanho de partícula muito grande pode resultar em um pó com menor área superficial exposta ao solvente extrator e também apresentar baixa eficiência extrativa (GUIZZO et al., 2015; MIGLIATO et al., 2007).

Na determinação da granulometria dos pós de *A. colubrina* foi realizado procedimentos em triplicata para cada tomada de amostra equivalente a 250 gramas e realizado o experimento com tamises entre 16 mesh (1190 µm) e 200 mesh (74 µm) dispostos em plataforma auto vibratória para processo de separação granulométrica. Os resultados foram expressos em massa percentual média para ensaios, em triplicata realizados e calculados conforme descrito na metodologia.

Como mostrado no histograma (figura 12), os pós da droga vegetal de *A. colubrina* tem comportamento de distribuição normal, com 39,7 % da massa retida no tamis de mesh 20, correspondendo a faixa de tamanho de partículas entre 999 µm e 841µm.

Figura 12 - Distribuição do tamanho de partícula da *A. colubrina*

Na tabela 15, encontram-se os valores de percentual de massa obtido para cada tamis com seus respectivos desvios.

Tabela 15 - Granulometria dos pós da droga vegetal

	Tamanho de partícula (µm)				
	>1000	999 a 841	840 a 500	499 a 250	249 a 74
Massa*%	6,8	39,7	28,5	20,1	4,9
Dp (±)	± 6,51	±2,9	±1,9	±5,6	±1,6

Nota: *Massa percentual média de experimentos em triplicata.

A farmacopeia brasileira em sua 5ª edição, possui um sistema de classificação para pós, onde os pós são classificados em pó grosso, moderadamente grosso, pó semi-fino, pó fino e pó finíssimo (BRASIL, 2010).

Convém ressaltar que o grau de divisão do pó vegetal, depende de vários aspectos, como: parte da planta utilizada (folha, frutos, flores, caule, raízes), tipo de moinho empregado no processo (martelo, facas), número de etapas de moagem ou reprocessamento do material e que esses aspectos precisam ser levados em conta na caracterização de pós de drogas vegetais (KARAM et al., 2016).

Análise granulométrica dos pós de partes aéreas de *Phyllanthus tenellus* (quebra pedra), apresentou massa percentual de 74,42% com tamanho de partícula menor que 300,0 µm. Já a análise granulométrica dos pós de folhas de *Eugenia uniflora* L. (pitangueira) apresentou 57,63% de massa percentual abaixo da dimensão de 300,0 µm. Distribuição granulométrica de pós da casca do fruto de *Myrciaria cauliflora* (jabuticaba),

apresentaram 57,66 % de massa percentual retido na faixa entre 355,0 μm e 710,0 μm , sendo classificado como pó moderadamente grosso (SANDINI et al., 2016; RODRIGUES; SANDINI; PEREZ; 2016; SOUSA et al., 2014).

No presente trabalho, o pó obtido das folhas de *A. colubrina* apresentou mais 68,2 % de massa distribuída na faixa entre 500,0 μm e 999,0 μm . De acordo com a farmacopeia brasileira, em sua 5ª edição, o pó da droga vegetal em estudo de *A. colubrina* é descrito como pó grosso, pois caracteriza-se por passar 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 .

5.2.2. Avaliação do processo de maceração

5.2.3. Avaliação do sistema de solvente no processo de maceração

A obtenção de um extrato vegetal padronizado que apresente alto teor de ativos de constituintes de interesse e reprodutibilidade lote a lote, requer avaliação de parâmetros que influenciam no processo extrativo (FOLASHADE et al., 2012). Portanto, avaliar técnicas extrativas eficientes, bem como conhecer todos os fatores que influenciam no processo é de fundamental importância na padronização de extratos vegetais (PIVOTTO; CARDOSO 2015).

Dentre as principais técnicas extrativas utilizadas para drogas vegetais podemos destacar: maceração, percolação, infusão, decocção, extração contínua a quente (soxlet), extração assistida por ultrassom, leiteo fluidizado, fluido supercrítico e turbólise. natureza química dos constituintes que se pretende obter, polaridade dos solventes e proporção ou mistura de solventes (BAMPOULI et al., 2014).

Um trabalho avaliando diferentes técnicas extrativas (ultrassom, turbólise, maceração, decocção, infusão e soxlet) e proporções de teor alcoólico a 92,8 % e 70 % (v/v), através da quantificação de constituintes ativos de *Dicksonia sellowiana* (xaxim), demonstrou que as técnicas decocção e turbólise com teor alcoólico 70 % (v/v) eram mais eficientes que as demais técnicas avaliadas (OLIVEIRA et al., 2016).

Na padronização de tecnologia de obtenção de extratos hidro alcoólicos da casca de frutos de *Myrciaria cauliflora* (jabuticaba), foi investigado a extração a quente por refluxo, extração assistida por ultrassom e extração por percolação através da quantificação de fenóis totais. De acordo com o citado trabalho a percolação apresentou melhor eficiência extrativa (8,75 mg/mL), seguido de extração a quente por refluxo

(0,16mg/mL) e extração assistida por ultrassom (0,07mg/mL) de fenóis totais (BORGES, 2015).

Neste trabalho optou-se pelo processo de maceração a frio devido a escalabilidade do processo e a infraestrutura disponível. O sistema de solvente empregado na maceração da *A. colubrina*, foi constituído por mistura etanol e água com 20 % (m/v) e avaliou-se qual proporção de teor alcoólico no sistema extrativo apresenta melhor eficiência extrativa. Os macerados foram preparados nas proporções 30:70 (v/v), 50:50 (v/v) e 70:30 (v/v) com procedimentos em triplicata e a eficiência extrativa foi determinada em função do marcador quercetina, quantificado por CLAE-DAD.

Um trabalho avaliando os parâmetros de extração de flavonoides em *Verbena minutiflora* (gervão), investigou a influência do teor alcoólico 20%, 50% e 80% no processo extrativo através da atividade antioxidante do extrato, demonstrando que a proporção 50% de álcool apresenta melhor eficiência extrativa de flavonoides e consequente melhor atividade antioxidante (PELOI et al., 2016).

Como mostrado na tabela 16, as proporções do sistema de solvente que apresentaram maior capacidade extrativa para o marcador quercetina, foram as proporções de álcool a 50 e 70 %, não havendo diferença estatística significativa entre os dois sistemas. A proporção 50% foi definida como condição de trabalho, devido aos critérios técnicos de secagem pela tecnologia de *spray drying*, além de apresentar menor custo. O sistema de solvente contendo 50% de etanol, apresentou concentração de quercetina equivalente a 122,2 µg/mL com variação de 3,9 % (CV) para procedimentos em triplicatas.

Tabela 16 - Eficiência do sistema de solvente no processo extrativo

Proporção Solventes Etanol:Água	Conc. do Marcador Quercetina (µg mL ⁻¹) ± DP	DPR (%)
70%	124,2 ± 5,2	4,2
50%	122,5 ± 4,8	3,9
30%	73,7 ± 1,7	2,3

N (3); massa da droga Vegetal: sistema de solvente: Etanol: Água (200g/1000mL).

5.2.4. Influência do tamanho de partícula da droga vegetal no processo extrativo

De acordo com a literatura, a distribuição do tamanho de partícula influencia diretamente no processo extrativo, e que uma droga vegetal com tamanho de partícula

muito alto ou baixo pode influenciar negativamente na eficiência extrativa do sistema de solvente utilizado (PÉRTILE et al., 2007; SONAGLIO et al., 2003).

Nesse sentido, com a definição das condições de proporção de sistema de solvente estabelecida, foram preparados três macerados a partir do pó da droga vegetal moída que passou pela avaliação granulométrica. Os extratos fluidos obtidos com a droga vegetal sem separação granulométrica, foram analisados por CLAE-DAD que quantificou o flavonoide quercetina, apresentando concentrações média de 125,5 µg/ mL.

A avaliação da influência do tamanho de partícula na eficiência do processo extrativo foi investigada na faixa de tamanho de partícula entre 355 e 74µm (malha de 42 a 200 mesh), através da quantificação do marcador quercetina analisado por CLAE-DAD.

De acordo com os dados plotados na tabela 17, podemos observar que, à medida que se reduz o tamanho de partícula, há aumento na eficiência extrativa do flavonoide quercetina para faixa de tamanho de partícula avaliada.

Análises cromatográfica de quercetina de macerado produzido a 50% etanol e 20% m/v, com a mistura dos pós de diferentes granulometrias apresentou teor médio de quercetina de 125,0 µg/ mL.

Os mesmos dados indicam que pós com tamanho de partícula na faixa de 1000 µm e 250 µm (88,3%), apresentam concentração de quercetina menor que a concentração obtida para o pó sem separação granulométrica e que menos de 5% (figura 12) do pó com tamanho de partícula abaixo de 250 µm, contribui para alta eficiência extrativa.

Tabela 17 - Influência da granulometria no processo extrativo.

Tamanho de partícula		Concentração quercetina	CV
Mesh	(µm)	(µg/ mL) ± DP	(%)
42	355	61,4 ± 1,9	3,1
60	250	83,0 ± 1,9	2,3
100	149	164,7 ± 6,5	3,9
200	<74	305,1 ± 10,0	3,2

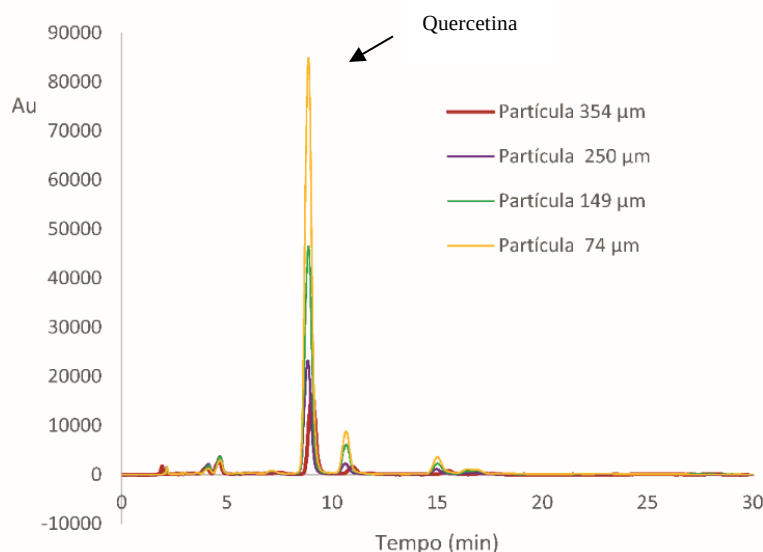
Média e desvios obtidos para dados com n=6.

ZAITER e colaboradores (2016) ao avaliarem a influência do tamanho de partículas na faixa entre 20 e 500 µm do pó de *Camellia sinensis* sobre o teor de polifenóis e atividade antioxidante, constataram que a atividade e o teor de constituintes eram influenciados pelo tamanho de partícula, sendo que os melhores resultados foram encontrados com tamanhos de partícula de 100 e 180 µm.

As análises cromatográficas dos extratos de *A. colubrina* de diferentes granulometrias, mostrada na figura 13 demonstra que os macerados produzidos com

menor tamanho de partícula resultaram em aumento da eficiência extrativa e conservação da natureza química dos constituintes dos extratos. Essa conservação da natureza química dos constituintes pode ser evidenciada na semelhança dos perfis cromatográficos dos diferentes tamanhos de partícula e o aumento da eficiência extrativa que pode ser visualizada com aumento na intensidade do pico cromatográfico do flavonoide quercetina.

Figura 13 - Perfis cromatográficos dos extratos produzidos de diferentes tamanhos de partícula.



5.2.5. Determinação de resíduo seco

Após definir o melhor sistema de extração, foram preparados três macerados com proporção de droga vegetal 20% (m/v) e sistema de solvente hidroalcoólico de 50:50% (v/v). O resíduo seco médio obtido para os três macerados foi de 6%.

5.3. Covalidação do método analítico para matriz extrato seco nebulizado

O extrato fluido obtido por processo de maceração foi submetido a processo de secagem por aspersão (*spray drying*) com emprego de adjuvantes tecnológicos de secagem, constituindo um extrato em pó com 20% de dióxido de silício coloidal (Aerosil® 200).

Devido à mudança na composição da matriz, no presente estudo, os guias oficiais de validação de métodos analíticos recomendam realizar a validação parcial do método validado (co-validação), avaliando os parâmetros seletividade, precisão e exatidão.

(BRASIL, 2003). Como a faixa de análise na covalidação foi a mesma estabelecida para o extrato seco nebulizado e como a avaliação da linearidade não envolveu a matriz extrato fluido, a linearidade não foi avaliada novamente.

5.3.1. Avaliação da seletividade do método de covalidação

A especificidade do método de covalidação foi demonstrada através da comparação dos perfis cromatográficos (figura 14) e espectrais (figura 15) entre branco da fase móvel, solução padrão de quercetina, amostra de extrato fluido e extrato seco nebulizado, monitorando o tempo retenção do marcador quercetina bem como seu máximo de absorbância.

Figura 14 - Avaliação da seletividade através de comparação de perfis cromatográficos

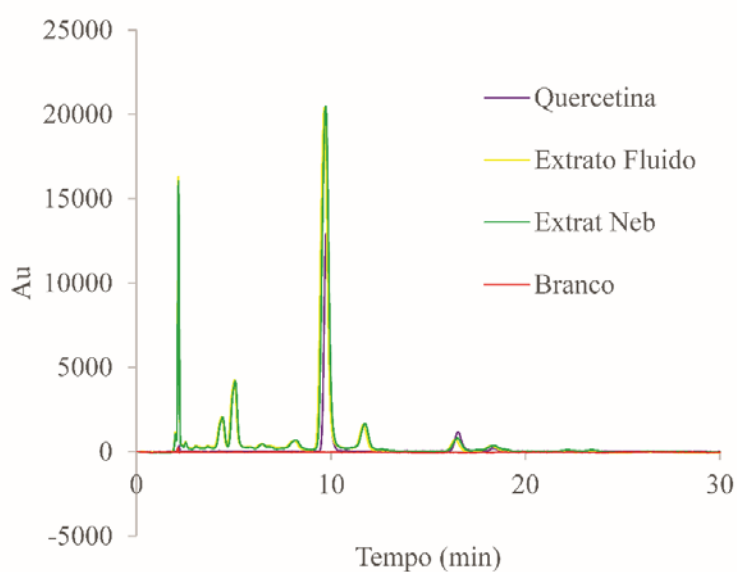
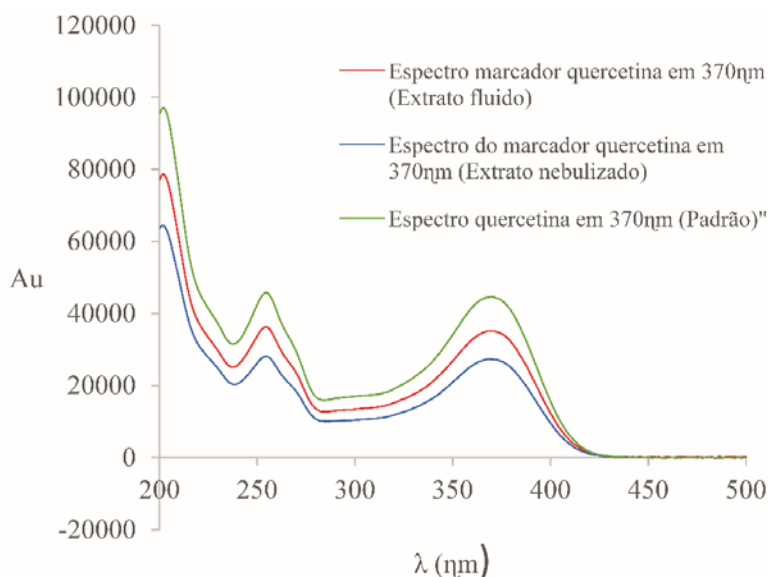


Figura 15 - Avaliação da seletividade através de comparação de perfis espectrais da quercetina com λ_{max} (370nm) entre padrão, extrato fluido e extrato nebulizador.



Análise cromatográfica dos perfis entre padrão quercetina e amostras de extrato fluido e extrato seco nebulizado, confirmou a eluição do marcador quercetina no tempo de retenção característico do padrão analítico, bem como demonstrou não haver eluição de substâncias interferentes próximo ao tempo de retenção monitorado.

A análise dos espectros de absorção molecular UV-vis na faixa de 200-500 nm das amostras padrão, extrato fluido e extrato seco nebulizado (figura 15), demonstrou não haver bandas de absorção interferentes e a pureza espectral foi maior que 0,999, demonstrando assim a seletividade para o método proposto.

De acordo com os dados cromatográficos e espectrais obtidos, verificamos que o processo de nebulização por *spray drying* não alterou o perfil cromatográfico do extrato seco em relação ao extrato fluido, indicando que o processo não interferiu na análise do marcador quercetina por CLAE-DAD. Abordagem similar com dados cromatográficos foi realizada para demonstrar a estabilidade que o processo de secagem por *spray drying* conferia aos flavonoides presente no extrato seco *Amburana cearenses*(ARARUNA et al., 2013).

5.3.2. Avaliação da precisão do método de covalidação

A repetibilidade do método na co-validação para análise de extratos secos nebulizados, foi avaliada a partir de seis corridas de amostras obtidas a partir do extrato

seco de *A. colubrina*.

A precisão intercorrida foi avaliada com três analistas em três dias, perfazendo um total de dezoito corridas do extrato seco nebulizado de *A. colubrina*. Análise de variância (ANOVA), demonstrou que há diferença significativa no conjunto de dados da precisão intermediária, mas que essa diferença é decorrente de variabilidade dentro da precisão no dia 1, com concentração média de 83,60 µg/ mL. Conforme demonstrado na tabela 18, o método demonstrou reprodutibilidade dos dados, baixo coeficiente de variação, satisfazendo assim os critérios de aceitação por guias oficiais de validação de métodos analíticos.

Tabela 18 - Repetibilidade e precisão intermediária da covalidação do método

Repetibilidade			
		Concentração de quercetina (µg/ mL)	CV (%)
Média ^a ± DP		88,18 ± 1,40	1,59
DIA	Precisão Intermediária (intra dia)		
1	Média ^b ± DP	83,60 ± 1,75	2,09
2	Média ^b ± DP	88,18 ± 1,40	1,59
3	Média ^b ± DP	88,57 ± 1,33	1,51
Precisão Intermediária (inter dia)			
Média ^c ± DP		87,69 ± 2,49	2,84

Nota: ^a, ^b n = 6; ^c n = 18, DP (desvio padrão)

5.3.3. Avaliação da Exatidão do método de convalidação

A exatidão do método analítico para análise de extratos secos nebulizados, foi avaliada através da adição de quantidades conhecidas do marcador quercetina em três concentrações: baixa, média e alta. O valor de referência do extrato seco nebulizado foi determinado pela concentração média obtida na precisão intermediária, cujo valor encontrado foi de 87,9 µg mL⁻¹ com coeficiente de variação de 2,8%. A partir dessa precisão estabeleceu-se valores para os níveis: baixo, médio e alto para avaliar a capacidade de recuperação do marcador quercetina do extrato seco nebulizado.

As amostras foram preparadas em triplicata e as análises foram realizadas em duplicatas para cada nível de concentração. Foram avaliados os desvios padrão relativo e capacidade de recuperação. Como mostrado na tabela 19, os dados apresentaram valores de recuperação satisfatórios dentro do limite de variação estabelecido de 15% para matrizes complexa.

Tabela 19 - Avaliação da exatidão para extrato seco através da recuperação

Nível (%)	A* (µg/ml)	B* (µg/ml)	C* (µg/ml)	Recuperação (%)	CV (%)
20 % ^a	87,7	17,6	18,74	106,5	2,1
100 % ^b		87,0	83,43	95,9	3,3
180 % ^c		158,0	154,99	98,1	2,2

Nota: A (Concentração inicial de quercetina no extrato); B (concentração do padrão de quercetina adicionado); C (quantidade recuperada), * n =18, CV (coeficiente de variação)

A exatidão do método para o extrato seco nebulizado de *A. colubrina*, também se baseou na análise dos coeficientes angulares e lineares da regressão linear entre concentração de fortificação de quercetina e concentração recuperada do marcador. Na tabela 20 estão plotados os coeficientes da regressão linear para quercetina padrão e para os níveis de exatidão avaliados na co-validação, onde é possível ver que os coeficientes angulares estão próximos a 1 e os coeficientes lineares próximo a zero.

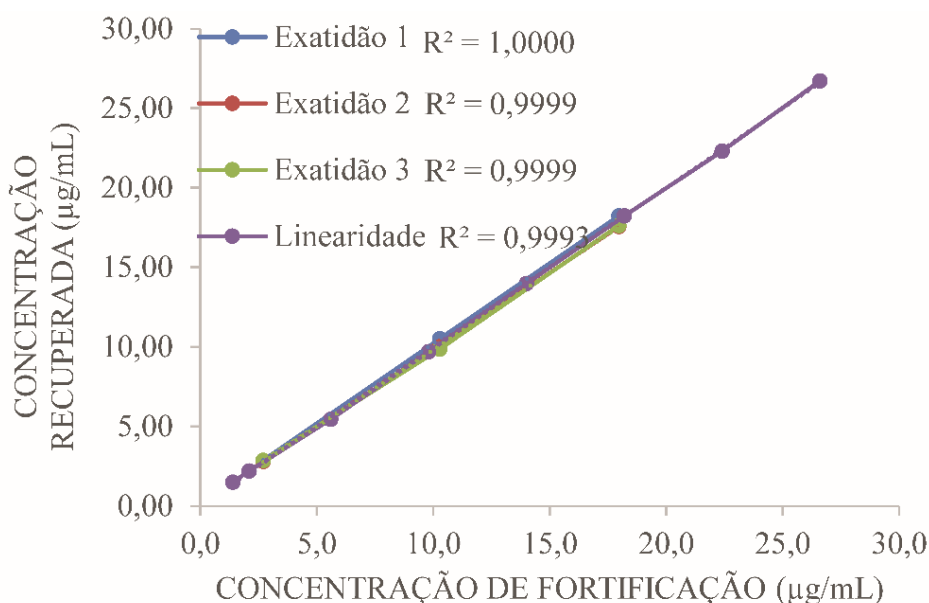
Tabela 20 - Avaliação da exatidão para extrato seco através método da regressão linear

Regressão linear	Equação ($y = ax + b$)	Coeficiente de correlação (R^2)
Linearidade	$y = 1,0000x + 0,0000$	0,9999
Exatidão 1	$y = 1,0063x + 0,1595$	1,0000
Exatidão 2	$y = 0,9664x + 0,1565$	0,9999
Exatidão 3	$y = 0,9664x + 0,1502$	0,9993

Nota: (a) coeficiente angular, (b) coeficiente linear

Na figura 16, temos o gráfico da linearidade da concentração fortificada versus concentração recuperada de quercetina, onde foi possível confirmar a correlação entre concentração de fortificação e concentração recuperada, bem como a demonstração de que a matriz extrato seco nebulizado não exerce efeito na extração do marcador quercetina nas condições aqui padronizadas.

Figura 16 - Linearidade da relação entre a concentração recuperada e concentração de fortificação de quercetina no extrato seco nebulizado.



5.4. Obtenção e padronização do extrato seco de *A. colubrina*

5.4.1. Avaliação dos parâmetros tecnológicos de secagem sobre concentração do marcador quercetina

O planejamento fatorial aplicado permitiu avaliar os parâmetros que influenciaram na concentração do marcador quercetina e indicou qual a condição ótima de produção do extrato seco de *A. colubrina*.

De acordo com os resultados obtidos (tabela 21), a condição de secagem que produz extrato seco com maior teor de quercetina é a observada no experimento 4 (160°C, 8 mL/min, 10 %) com concentração de 76,6 µg/mL ($\pm 0,5\%$), e o menor teor é encontrado no experimento 2 (160°C, 4 mL/min, 20 %), com concentração de 64,9 µg/mL ($\pm 2,3\%$).

A condição de secagem a 10%, apresenta concentração média de quercetina 10,4% maior que a média encontrada nos experimentos a 20%; o que corresponde a diferença teórica da ordem de 10% entre as duas condições experimentais. Essa exatidão na diferença entre as condições avaliadas indica a adequabilidade do sistema *spray dryer* durante a secagem e que o mesmo não exerceu alterações nos resultados.

Tabela 21 - Avaliação dos parâmetros tecnológicos *versus* teor de quercetina

Experimento	Variáveis Independentes			Resposta
	T _e ^a (°C)	F _b ^b (mL/min)	P _{dsc} ^c (%)	Concentração quercetina* (µg/mL) ± CV %
1	160	4,0	10	72,08 ± 1,4
2	160	4,0	20	64,9 ± 2,3
3	160	8,0	20	67,9 ± 1,8
4	160	8,0	10	76,6 ± 0,5
5	170	6,0	15	66,6 ± 1,7
6	180	4,0	20	65,0 ± 3,6
7	180	4,0	10	71,5 ± 3,4
8	180	8,0	10	73,7 ± 1,3
9	180	8,0	20	68,4 ± 2,0

Nota: *Valores médios ± desvio padrão (n = 9). T_e^a (temperatura de entrada), F_b^b (razão do fluxo da bomba de alimentação), P_{dsc}^c (porcentagem do dióxido de silício coloidal).

Os resultados do planejamento experimental indicam uma condição de secagem excelente, uma vez que, foi produzido um extrato seco com menor quantidade de excipiente (10%), maior rapidez no processo (8mL/min) e melhor teor do marcador quercetina (76,6 µg/mL).

A análise de variância (ANOVA) da influência dos parâmetros tecnológicos de secagem está sumarizada na tabela 22, onde é mostrado os efeitos das variáveis independentes (efeito primário, secundário e terciário) com as suas respectivas significâncias sobre a resposta monitorada no planejamento fatorial (concentração do marcador quercetina).

Os dados demonstram que os parâmetros fluxos da bomba de alimentação (F_b) e concentração de adjuvante (P_{dsc}) exercem individualmente efeito significativo sobre a concentração de quercetina no extrato seco, não havendo significância nos efeitos secundários e terciários, considerando valor de $p < 0,05$ como efeito significativo.

Tabela 22 – Análise de variância das condições de secagem sobre o teor de quercetina.

Variáveis Independentes	Valor p
	Teor de quercetina
T _e (x ₁)	0.069
F _b (x ₂)	0.000*
P _{dsc} (x ₃)	0.000*
T _e (x ₁) versus F _b (x ₂)	0,627
T _e (x ₁) versus P _{dsc} (x ₃)	0,107
F _b (x ₂) versus P _{dsc} (x ₃)	0,845
T _e (x ₁) versus F _b (x ₂) versus P _{dsc} (x ₃)	0,181

p<0,05*efeito significativo

Trabalho semelhante, avaliando a influência dos mesmos parâmetros aqui estudados (T_e , F_b , P_{dsc}) sobre a concentração de canferol e quercetina na produção do extrato seco de *Poincianella pyramidalis*, demonstrou que as três variáveis de processo exerceram efeitos primários negativos sobre as variáveis respostas monitoradas (DE OLIVEIRA et al., 2017).

Leite e colaboradores (2017), ao avaliarem a influência da temperatura de ar de entrada (T_e) e fluxo da bomba de alimentação (F_b) sobre a concentração de quercetina em extrato seco de *Myracrodruon urundeuva*, com valores das variáveis independentes iguais aos considerados neste trabalho, demonstraram que esses dois parâmetros (T_e e F_b) exerceram efeito secundário positivo sobre a concentração de quercetina no extrato produzido.

Segundo Araruna e colaboradores (2013), ao avaliarem condições otimizadas de secagem do extrato seco de *A. cearenses*, verificaram que a temperatura de ar de entrada e o fluxo de alimentação da bomba exerciam efeito positivo na variável resposta (teor de marcadores) na produção do extrato seco.

A avaliação da influência das condições de secagem na produção do extrato seco de açaí demonstrou que os parâmetros: fluxo da bomba de alimentação e concentração de adjuvante, não exerceram efeitos estatisticamente significantes no teor de antocianinas e que apenas a temperatura exerceu efeito estatisticamente significativo sobre a variável resposta (TONON; BRABET; HUBINGER, 2008).

5.4.2. Análise da influência dos parâmetros de secagem sobre o teor de quercetina através da metodologia de superfície resposta.

O emprego da metodologia de superfície resposta, confirmou as análises anteriores, onde é demonstrado o efeito negativo da concentração de adjuvante (P_{dsc}) e efeito positivo do fluxo de alimentação da bomba (F_b) sobre o teor de quercetina.

Os gráficos de superfície resposta plotados nas figuras, 17, 18 e 19, demonstram que a concentração de quercetina no extrato seco, aumenta à medida que a concentração do dióxido de silício coloidal (P_{dsc}) diminui e nível do fator fluxo de alimentação da bomba (F_b) aumenta.

Figura 17 - Gráfico de Superfície Resposta, mostrando os efeitos dos parâmetros temperatura e fluxo do processo sobre o teor de quercetina.

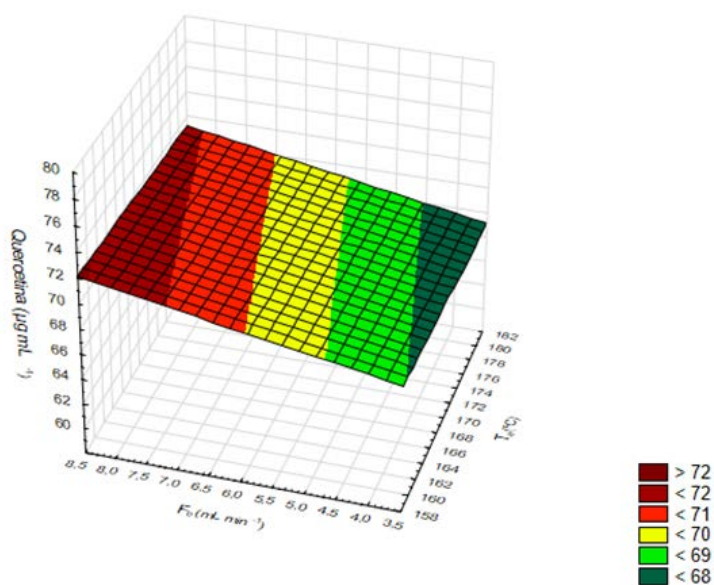


Figura 18 - Gráfico de superfície resposta, mostrando o efeito da temperatura e proporção do dióxido de silício coloidal sobre o teor de quercetina.

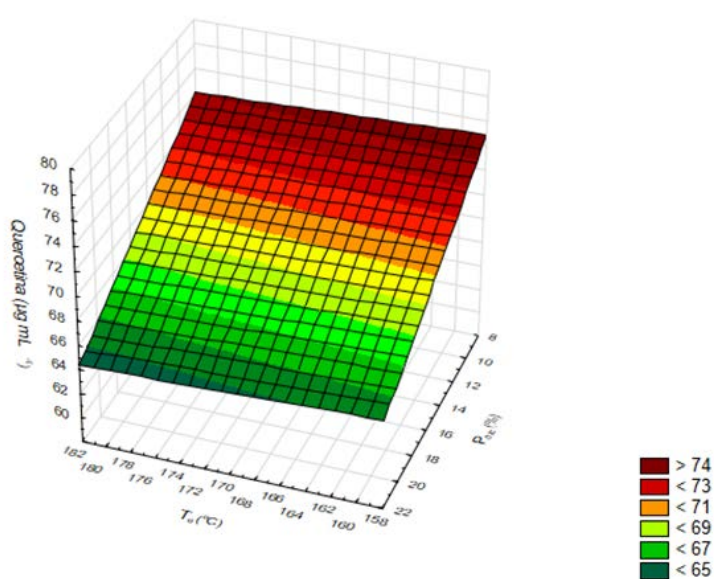
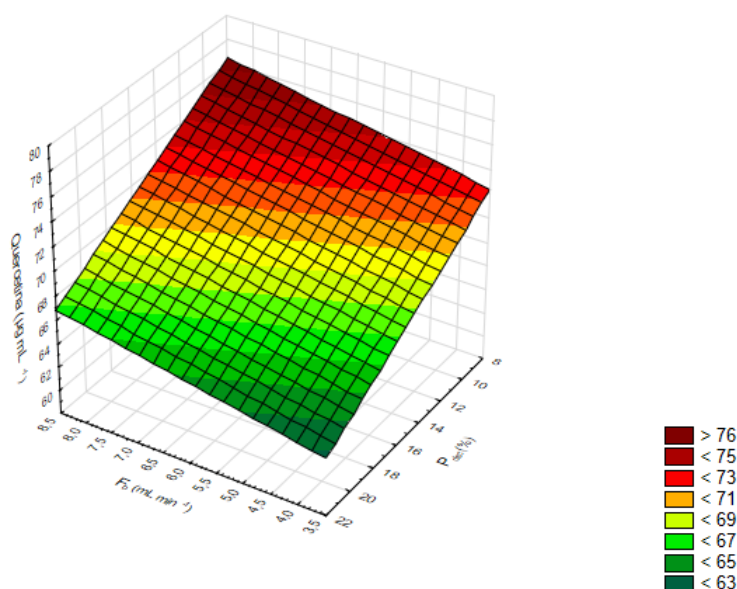


Figura 19 - Gráfico de superfície resposta, mostrando os efeitos dos parâmetros proporção do dióxido de silício coloidal e fluxo da bomba sobre o teor de quercetina.



5.4.3. Rendimento do processo de secagem por *spray dryer*

Os resultados plotados na tabela 23, demonstram que os parâmetros avaliados influenciam no rendimento do processo, onde foi verificado que o experimento 1 (20%, 160°C, 8mL/min), foi o que apresentou menor rendimento de processo e o experimento 6 (10%, 180°C, 4mL/min), foi o que apresentou maior rendimento.

Tabela 23 - Avaliação dos parâmetros tecnológicos *versus* rendimento

Experimento	Condições do Processo	Massa (g)*	Rendimento (%)**
1	20% 160°C 8mL/min	5,2	34,3%
2	20% 160°C 4mL/min	6,5	43,1%
3	20% 180°C 8mL/min	6,0	39,8%
4	20% 180°C 4mL/min	6,2	40,9%
5	15% 170°C 6mL/min	5,5	38,8%
6	10% 180°C 4mL/min	6,5	48,5%
7	10% 180°C 8mL/min	6,2	46,0%
8	10% 160°C 4mL/min	6,3	47,3%
9	10% 160°C 8mL/min	5,8	43,5%

*Média da massa do extrato nebulizado recuperado ** Rendimento do processo (n=3)

A análise de variância (tabela 24) foi aplicada para avaliar a influência dos

parâmetros de secagem sobre o rendimento de processo, bem como analisar os efeitos individuais e interações das variáveis independentes. Os dados plotados na tabela 24, demonstram que o parâmetro concentração de adjuvante (P_{dsc}) foi o único a exercer efeito de significância estatísticas sobre o rendimento do processo de secagem, não havendo significância estatística nos efeitos secundários e terciários para parâmetros avaliados, considerando valor de $p < 0,05$ como efeito significativo.

Tabela 24 - Análise de variância das condições de secagem sobre o rendimento

Variáveis Independentes	Valor p
	Rendimento (%)
$T_e (x_1)$	0,3716
$F_b (x_2)$	0,1119
$P_{dsc} (x_3)$	0,0022*
$T_e (x_1)$ versus $F_b (x_2)$	0,3340
$T_e (x_1)$ versus $P_{dsc} (x_3)$	0,9305
$F_b (x_2)$ versus $P_{dsc} (x_3)$	0,6305
$T_e (x_1)$ versus $F_b (x_2)$ versus $P_{dsc} (x_3)$	0,4071

$p < 0,05$ *efeito significativo

5.4.4. Análise da influência dos parâmetros de secagem sobre o rendimento de processo através da metodologia de superfície resposta

Os gráficos de superfície resposta plotados nas figuras, 20, 21 e 22, demonstram que o rendimento da secagem do extrato seco, aumenta à medida que a concentração do adjuvante (P_{dsc}) e fluxo de alimentação da bomba (F_b) diminuem. A temperatura não exerceu influência sobre o rendimento do processo.

O emprego da metodologia de superfície resposta, confirmou os resultados plotados nas tabelas 23 e 24, evidenciando a significância estatísticas do efeito negativo da concentração do adjuvante sobre o rendimento da secagem. Apesar do fluxo da bomba ter exercido influencia no rendimento, o mesmo não estatisticamente significativo considerando valor de $p < 0,05$ como efeito significativo.

Figura 20 - Gráficos de superfície resposta, mostrando os efeitos dos parâmetros temperatura e fluxo do processo sobre o rendimento de processo.

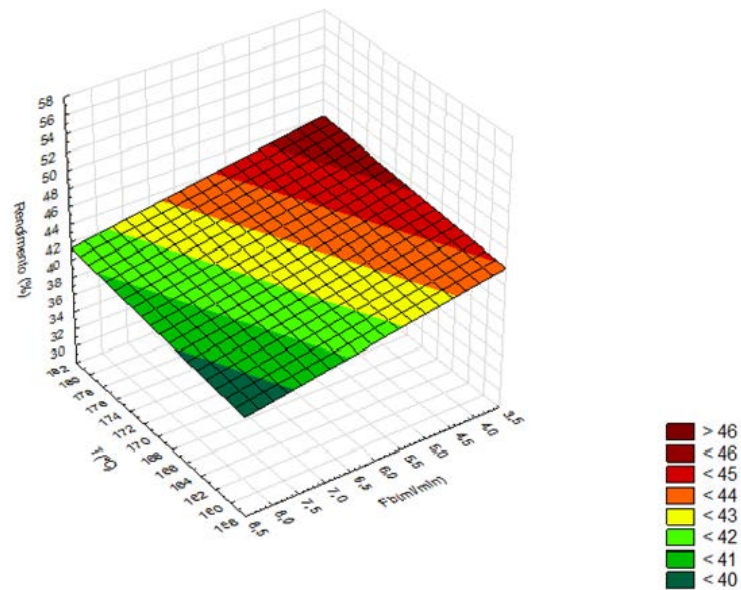


Figura 21 - Gráficos de superfície resposta, mostrando o efeito da temperatura e proporção do dióxido de silício coloidal sobre o rendimento de processo.

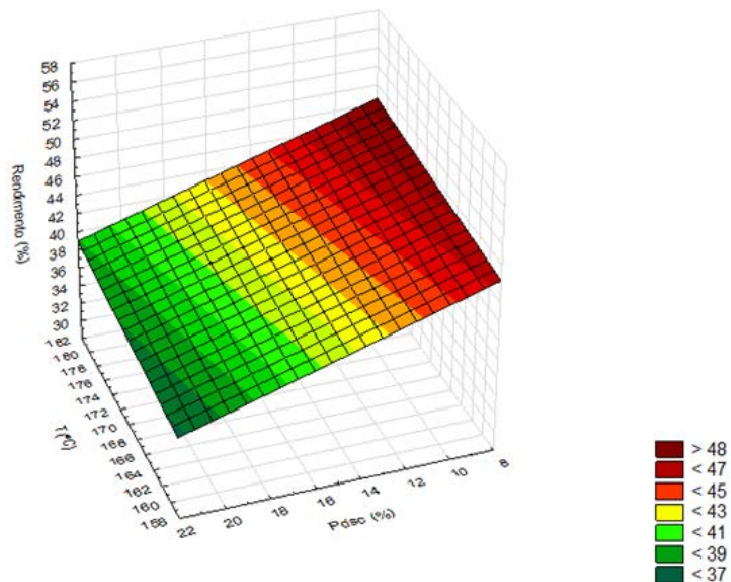
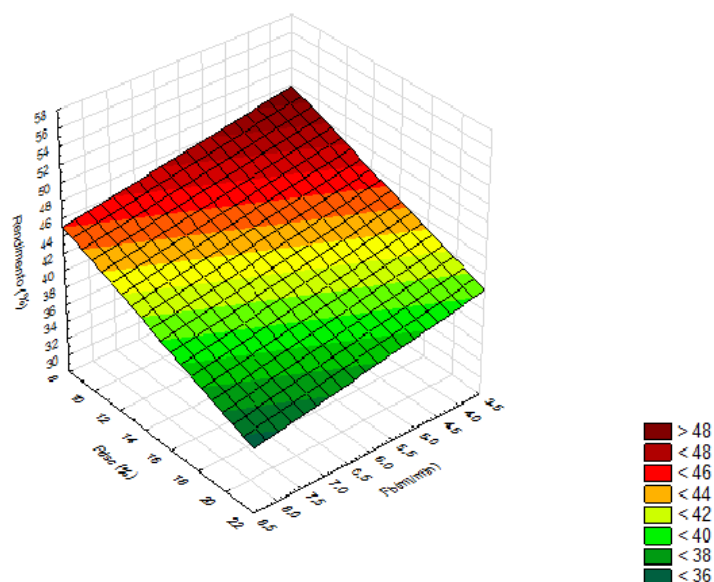


Figura 22 - Gráficos de superfície resposta, mostrando os efeitos dos parâmetros proporção do dióxido de silício coloidal e fluxo da bomba sobre o rendimento de processo.



No presente estudo, as condições de secagem com 20% de adjuvante Aerosil^{200®}, foram as condições que apresentaram menores rendimentos de processo, indicando que a concentração do adjuvante pode estar relacionada com aumento de viscosidade do extrato fluido e consequente influência no rendimento da secagem.

O experimento 1 (20%, 160°C, 8 mL/min) foi a condição que apresentou menor rendimento de processo de secagem por *spray drying*, o que pode estar relacionado com maior registro de obstruções do bico atomizador e aderência do extrato nas paredes da câmara de secagem.

Um ajuste adequado da velocidade de alimentação permite que as microgotículas evaporem antes de entrar em contato com as paredes da câmara de secagem, evitando assim a aderência ou depósito de material nas paredes da câmara (MASTERS et al., 1985; LIST; SCHIMIDT, 1989; RANKELL; LIEBERMAN; SCHIFFMAN, 2001).

A escolha da condição otimizada de produção do lote piloto de extrato seco de *A. colubrina*, para obtenção de pré-formulado contendo o extrato seco e excipientes farmacêuticos, foi baseado nas análises estatísticas dos resultados de concentração de quercetina e rendimento de secagem do extrato seco nebulizado de *A. colubrina*.

A condição que apresentou melhor teor de quercetina foi a proporção de adjuvante de 10%, temperatura de entrada de 160°C, e fluxo da bomba de alimentação de 8mL/min e a que apresentou melhor rendimento de processo foi a proporção de adjuvante de 10%,

temperatura de entrada de 180°C, e fluxo da bomba de alimentação de 4mL/min. Neste estudo a medida que se reduz a concentração de adjuvante, há melhor resultado de concentração de quercetina e rendimento de processo. O parâmetro fluxo da bomba só apresenta efeito de significância estatística sobre a concentração de quercetina, não sendo estatisticamente significativa sua influência no rendimento da secagem.

Como o parâmetro temperatura de entrada de ar não exerceu influência significativa nas respostas analisadas, a condição definida como ótima foi aquela que em os parâmetros exercem efeito de significância e que sejam comuns as duas respostas monitoradas. Essa condição otimizada (10%, 160°C, 8mL/min) foi utilizada para produzir o lote piloto de extrato seco de *A. colubrina* para o estudo de estabilidade acelerada dos pré-formulados.

Com base nos resultados obtidos neste trabalho e publicações envolvendo processo de otimização de experimentos de extratos vegetais por *spray drying*, é constatado que não é possível transpor todos os parâmetros visando obter uma condição otimizada de um extrato com características diferentes. Daí a importância de realizar um planejamento fatorial que considere as variáveis que mais influência sobre o processo resultando em respostas que efetivamente irão direcionar para um produto de alto valor tecnológico e terapeuticamente eficaz (GALLO et al., 2011; COUTO et al., 2013).

5.5. Estudo de estabilidade acelerada de pré-formulados e determinação dos parâmetros cinéticos.

O estudo de estabilidade foi realizado de acordo com os parâmetros exigidos pela ANVISA com análise inicial (tempo zero) do teor de quercetina nos pré-formulados e nos tempos 3 e 6 meses em condições aceleradas (40°C e 75% UR), sendo analisada em cada tempo o teor do marcador quercetina por CLAE-DAD.

Os cálculos dos parâmetros de cinéticos de degradação do marcador quercetina, como indicador de estabilidade dos pré-formulados, foram determinados por meio da equação clássica de *Arrhenius*.

De acordo com a análise dos coeficientes de correlação da regressão linear R_0^2 , R_1^2 , R_2^2 , mostrado na tabela 25, foi possível definir o modelo cinético de ordem zero de degradação do teor de quercetina para todos os pré-formulados, inclusive para o extrato seco. Portanto, com base na ordem de reação é possível afirmar que a velocidade de eventos de degradação independe da concentração dos excipientes e do marcador quercetina no extrato seco.

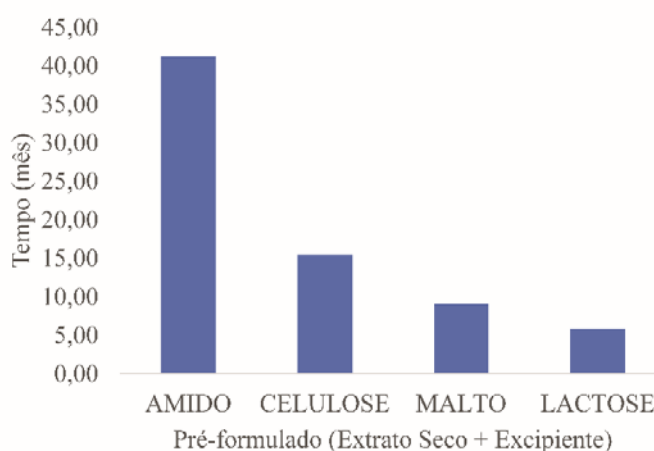
Tabela 25 - Parâmetros cinéticos do extrato seco e pré-formulados durante 180 dias.

Amostr a	k(dias ⁻¹)			R ²			Fração decompost a $\alpha_{0,9}$ (meses)
	K_0	K_1	K_2	R_0^2	R_1^2	R_2^2	
1	0,0192	0,0003	-5,00E-06	0,0627	0,0518	0,0424	10,29
2	0,0041	8,00E-05	-2,00E-06	0,120	0,120	0,130	41,17
3	-0,0103	2,80E-04	5,00E-06	0,490	0,490	0,500	15,47
4	0,0184	4,30E-04	-7,00E-06	0,978	0,975	0,973	9,07
5	0,0332	-6,10E-04	-1,00E-05	0,969	0,964	0,959	5,86

1 [ES (extrato seco)], 2 [(ES-AM (extrato seco-amido)], 3 [ES-CM102 (extrato seco-celulose microcristalina 102)], 4 [ES-MD (extrato seco-maltodextrina)], 5 [ES-LAC (extrato seco-lactose)], temperatura de armazenamento de 40°C e 75% de umidade

Os tempos correspondentes à fração decomposta ($\alpha_{0,9}$) do marcador quercetina apresentaram predição de tempo de estabilidade (figura 23) decrescente entre os pré-formulados. Os maiores tempos de estabilidade preditos foram observados nos pré-formulados contendo os excipientes amido (41 meses) e celulose (15 meses), já o menor tempo predito foi observado no pré-formulado contendo a lactose (5 meses).

Os dados apontam possíveis e diferenciadas interações entre a molécula de quercetina e os excipientes nos pré-formulados, que possuem tempos de predição de estabilidade diferentes entre si e em relação ao extrato seco de *A. colubrina*, com 10,29 meses.

Figura 23 - Tempo predito de estabilidade dos pré-formulados obtidos por mistura física

Os resultados do estudo de estabilidade acelerada dos pré-formulados, indicaram que os excipientes, exercem influência na estabilidade do extrato seco de *A. colubrina*,

sendo que o excipiente amido foi o que conferiu melhor estabilidade (pré-formulado 2), estimando um tempo predito acima de 41 meses. Já o excipiente lactose exerceu influência no teor do marcador quercetina, reduzindo o tempo predito de estabilidade em relação ao extrato seco com a diminuição de 10, 29 meses para 5,86 meses.

Macedo e colaboradores (2001), demonstraram através do emprego da termogravimetria e calorimetria exploratória diferencial que a lactose interage física e quimicamente com a hidroclorotiazida, reduzindo a temperatura de início de decomposição e aumentando o grau de compactação da mistura física. No mesmo trabalho, foi demonstrado que a celulose microcristalina não apresentava nenhuma incompatibilidade e que aumentava a estabilidade do fármaco estudado.

Estudo de estabilidade com extratos secos de *Passiflora alata*, monitorou a cinética de degradação do flavonoide vitexina, estimando um tempo de predito de até 6,3 meses de validade no limite de 10% do marcador em relação ao teor inicial (BOTT; LABUZA; OLIVEIRA, 2010).

Um trabalho com extrato seco de *Maytenus ilicifolia*, avaliou a estabilidade do extrato em função do flavonol catequina, demonstrando ao fim do estudo uma ordem zero de reação para cinética de degradação do marcador no extrato, que apresentou um tempo de estabilidade predito de 9,2 meses (SOUZA et al., 2013).

Lauro e colaboradores (2015), em estudo de estabilidade de longa duração, demonstraram que a tecnologia de *spray drying* agregou qualidade ao extrato seco de *Citrus sinensis*, ao produzir um produto nebulizado com melhor atividade antioxidante e estabilidade de polifenóis. Os autores concluíram que essa maior estabilidade físico-química pode estar associada ao efeito de microencapsulação que a técnica de *spray drying* propicia (BORGES et al., 2017, CANO-HIGUITA; VÉLEZ; TELIS, 2015).

Cortés-rojas e Oliveira (2012), realizaram estudo de estabilidade acelerada (40°C e 75% umidade relativa) com extrato seco nebulizado de *B. pilosa*, monitorando o teor de rutina e hiperosídeo, obtendo ao fim do estudo um tempo predito de 6,0 meses de estabilidade.

Um estudo avaliou a estabilidade de longa duração microencapsulados de quercetina e naringenina obtidos por *spray drying* com diferentes excipientes farmacêuticos, apresentando ao longo de 12 meses em condições normais de armazenamento estabilidade dos fenólicos (SANSONE et al., 2011).

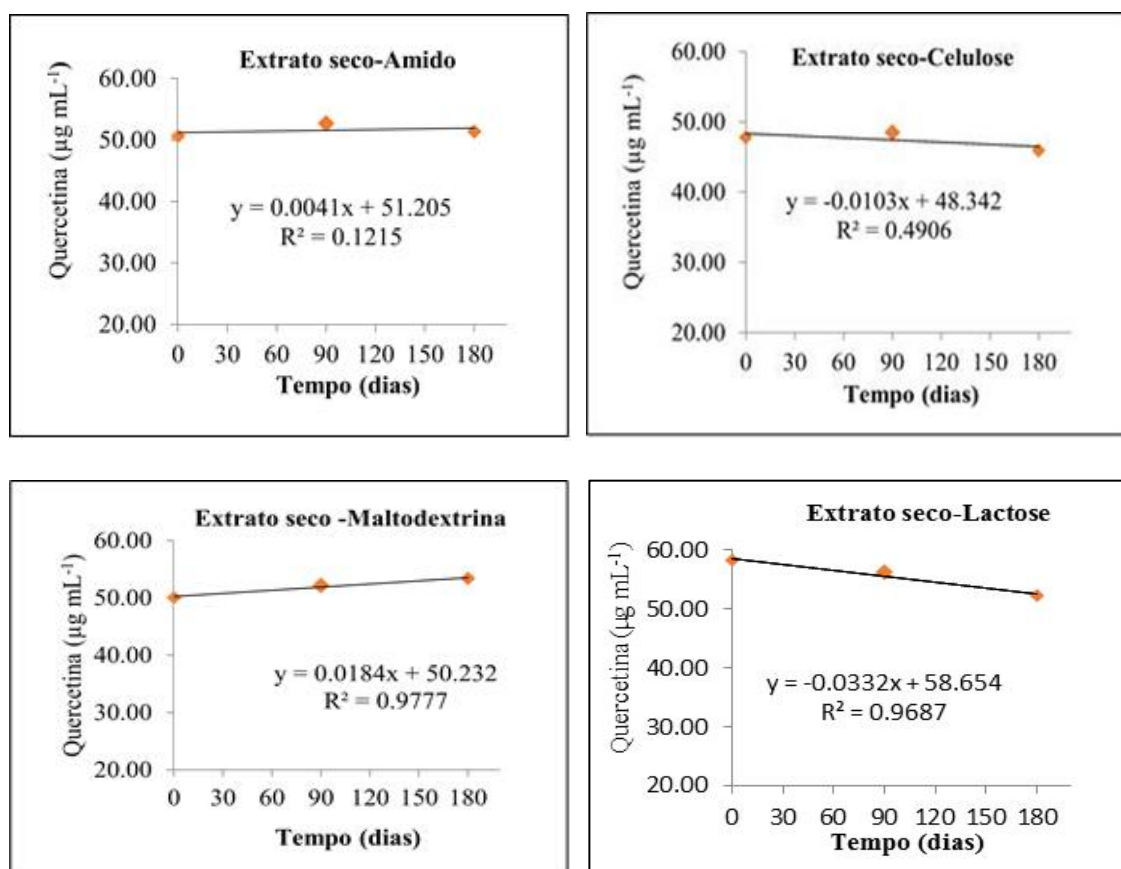
O estudo de estabilidade dos pré-formulados permite apontar etapas críticas no processo de produção e ajuda a definir estratégias para solucionar os problemas

encontrados. Estudo de estabilidade acelerada de extratos secos obtidos por *spray drying* de *Myrica rubra*, demonstrou a necessidade de condições específicas de armazenamento dos extratos secos, devido a variações de estabilidade de flavonoides e antocianinas nas condições avaliadas (FANG; BHANDARI, 2011).

Os envelopes (impermeáveis e opacos) empregados nesse estudo, desempenharam papel fundamental na estabilidade dos pré-formulados, pois muitas reações de degradação são decorrentes da ação da umidade e luz sobre moléculas bioativas. Por outro lado, os extratos secos amorfos têm grande afinidade por água, principalmente os obtidos com o Aerosil^{200®}, como adjuvante que possui alta higroscopicidade (SOUZA et al., 2013; KIM, 2004; HEIGL; FRANZ, 2003).

Conforme mostrado na figura 24, todos os pré-formulados analisados no estudo de estabilidade acelerada, ao longo dos 180 dias, apresentaram baixos valores de constante de degradação, indicando que o marcador quercetina é estável ao longo do estudo.

Figura 24 - Teor de quercetina dos pré- formulados durante o tempo de estudo.



Um trabalho avaliou interações entre moléculas de flavonoides e o excipiente polivinilpirrolidona, demonstrando que quanto maior o número de hidroxilas presente no

anel aromático dos flavonoides mais eficiente eram as ligações com a molécula do excipiente (DONER; BECARD; IRWIN, 1993).

Esse incremento na estabilidade que o amido oferece ao pré-formulado, pode ser atribuída a característica de pré-gelatinização, que confere ao excipiente baixa higroscopicidade e por sua vez, menor risco de degradação dos componentes do extrato seco (ASCHERI et al., 2006).

Mcmanus e colaboradores (1985), demonstraram que moléculas polifenólicas formavam complexo com proteínas e polissacarídeos através de pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas, levando a níveis reduzidos de polifenóis livres.

Não bastasse os excelentes resultados com a estabilidade dos pré-formulados contendo amido e a celulose microcristalina, esses excipientes possuem a vantagem da viabilidade econômica em razão do baixo custo que os adjuvantes apresentam no mercado frente aos demais avaliados.

CONCLUSÃO



5. Conclusão

A padronização do processo de produção dos extratos de *A. colubrina* e dos produtos obtidos em cada etapa foram realizados em função do monitoramento da qualidade dos extratos através do teor do marcador e de parâmetros de processo. Os extratos foram caracterizados física e quimicamente por métodos clássicos e modernos que permitiram obter dados de identidade para a planta medicinal em estudo e confirmar a reprodutibilidade dos processos de produção.

Este trabalho permitiu o desenvolvimento e validação de método analítico por CLAE-DAD, para análise do marcador quercetina, demonstrando ser: específico, linear, preciso, exato e robusto, sendo uma ferramenta de controle de qualidade para derivados de *A. colubrina*. O método analítico permitiu o monitoramento do processo de otimização das condições de secagem do extrato seco de *A. colubrina* por *spray-drying* e avaliação do estudo de estabilidade dos pré-formulados.

Este estudo viabilizou a produção de extratos secos e padronizados por *spray drying*, o que representa uma etapa tecnológica imprescindível no desenvolvimento de um candidato a fitoterápico, cuja qualidade foi alcançada na otimização experimental e estudo de estabilidade dos pré-formulados.

O estudo de estabilidade acelerada dos pré-formulados, mostrou excelentes resultados de estabilidade para os pré-formulados contendo amido e celulose microcristalina, o que também representa uma contribuição importante no desenvolvimento tecnológico de formulados.

Este trabalho vem suprir a carência de acervo técnico científico na área de tecnologia de plantas medicinais e fitoterápicos, em especial com a *A. colubrina*, com a prospecção do ponto de vista do desenvolvimento e inovação tecnológica na área de produção e controle de qualidade farmacêutico de produtos. Trata-se, portanto de um trabalho aplicado na perspectiva de um produto da *A. colubrina*, que pode elevar a planta medicinal nativa para o patamar de medicamento fitoterápico.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

6. Referências

- ABRAHAM DE NOIR, F.; BRAVO, S.; ABDALA, R. Mecanismos de dispersión de algunas especies de leñosas nativas del Chaco Occidental y Serrano. **Quebracho-Revista de Ciencias Forestales**, n. 9, 2002.
- AGRA, M. F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 114-140, 2007
- AHLNECK, C.; ZOGRAFI, G. The molecular basis of moisture effects on the physical and chemical stability of drugs in the solid state. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 62, n. 2-3, p. 87-95, 1990.
- ALMEIDA, C. F. C. B. R. et al. Medicinal plants popularly used in the Xingó region a semi-arid location in northeastern Brazil. **Journal Ethnobiol Ethnomed**. v.2, n.1, p.15. 2006.
- ÁLVARES, J. et al. Acesso aos medicamentos pelos usuários da atenção primária no Sistema Único de Saúde. **Rev. Saúde Pública**, v. 51, n. suppl 2, p. -, 2017.
- ALVES, F. N. R. Desafio para a Inovação em Fitomedicamentos no Contexto da Indústria Farmacêutica Nacional. **Revista Fitos Eletrônica**, v. 1, n. 01, p. 18-29, 2005.
- ALVES, L. F. Produção de fitoterápicos no Brasil: história, problemas e perspectivas. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 3, p. 450-513, 2013.
- AMADO, N. G. et al. Flavonoids: potential Wnt/beta-catenin signaling modulators in cancer. **Life sciences**, v. 89, n. 15-16, p. 545-554, 2011.
- AMORIM, S. L de; MEDEIROS, RMT de; RIET-CORREA, F. Intoxicações por plantas cianogênicas no Brasil. **Ciência Animal**, v. 16, n. 1, p. 17-26, 2006.
- ANVISA- AGENCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITARIA. **Guia de estabilidade de produtos cosméticos**. Editora Anvisa, 2005.
- ARARUNA, S. M. et al. Influence of process conditions on the physicochemical characteristics of cumaru (*Amburana cearensis*) powder produced by spray drying. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 1, p. 132-137, 2013.

ARAÚJO, A. V. et al. Atividade cicatrizante e estudo toxicológico pré-clínico do fitoterápico sanativo®. **acta farmacéutica bonaerense**, v. 25, n. 4, p. 544-9, 2006.

ARAÚJO, E. R. D. et al. Avaliação do potencial antimicrobiano de extrato hidroalcoólico e aquoso da espécie *Anadenanthera colubrina* frente a bactérias gram negativa e gram positiva. **Biota Amazônia (Biote Amazonie, Biota Amazonia, Amazonian Biota)**, v. 5, n. 3, p. 66-71, 2015.

ARAÚJO, T. A. S. et al. A new approach to study medicinal plants with tannins and flavonoids contents from the local knowledge. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, n. 1, p. 72-80, 2008.

ASCHERI, D. P. R. et al. Efeito da extrusão sobre a adsorção de água de farinhas mistas pré-gelatinizadas de arroz e bagaço de jabuticaba. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 325-335, 2006.

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

BAJAJ, S.; SINGLA, D.; SAKHUJA, N. Stability Testing of Pharmaceutical Products. 2012.

BAMPOULI, A. et al. Comparison of different extraction methods of *Pistacia lentiscus* var. chia leaves: Yield, antioxidant activity and essential oil chemical composition. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 1, n. 3, p. 81-91, 2014.

BANSAL, G. et al. Stability testing of herbal drugs: Challenges, regulatory compliance and perspectives. **Phytotherapy Research**, v. 30, n. 7, p. 1046-1058, 2016.

BARRANDEGUY, M. E. et al. Development of microsatellite markers for *Anadenanthera colubrina* var. cebil (Fabaceae), a native tree from South America. **American journal of botany**, v. 99, n. 9, 2012.

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.

BHOPE, S. G. et al. Design and development of a stable polyherbal formulation based on the results of compatibility studies. **Pharmacognosy research**, v. 3, n. 2, p. 122, 2011.

BONOMINI, T. J. et al. Padronização de metodologia para extração do fitoconstituente majoritário das flores de *Allamanda cathartica* L.(apocynaceae). 2013.

BORGES, L. L. Bioprodutos padronizados em compostos fenólicos obtidos de resíduos agroindustriais das cascas dos frutos de *Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg. 2015.

BORGES, L. L. et al. Optimization of the Spray-Drying Process for Developing Jabuticaba Waste Powder Employing Response Surface Methodology. **Journal of Food Process Engineering**, v. 40, n. 1, 2017.

BOTT, R. F.; LABUZA, T. P.; OLIVEIRA, W. P. Stability testing of spray-and spouted bed–dried extracts of *Passiflora alata*. **Drying Technology**, v. 28, n. 11, p. 1255-1265, 2010.

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, Resolução-RE. nº 1, de 29 de julho de 2005. Guia para a realização de estudos de estabilidade, Diário Oficial União, ANVISA-Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia do Brasil**, 5ª edição, Brasília DF, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Política e Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos** Editora MS, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. 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 junho 2003.

BRITO, L. C. et al. Inovação na Fiocruz: projeto Profito, um estudo de caso. 2017.

BRITO, N. M. et al. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, 2003.

BRUNETON, J. **Elementos de fitoquímica y farmacognosia**. Acribia, 1991.

CANO-HIGUITA, D. M.; VÉLEZ, H. A. Villa; TELIS, V. R. N. Microencapsulation of turmeric oleoresin in binary and ternary blends of gum arabic, Maltodextrin and Modified starch. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 39, n. 2, p. 173-182, 2015.

CARDOSO, C. R. P. Controle de qualidade e avaliação da atividade farmacológica do extrato de *Byrsonima intermedia* e da Amentoflavona. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, v. 10, n. 3, p. 35-42, 2015.

CHABARIBERI, R. A. O. et al. Spectrometric determination of flavonoids from *Maytenus* (Celastraceae) and *Passiflora* (Passifloraceae) leaves and comparison with an HPLC-UV method. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 4, p. 860-864, 2009.

CHANDRAKUMAR, A. et al. Implications of traditional medicine in the treatment of Hepatitis A in Kerala. **Journal of traditional and complementary medicine**, v. 6, n. 3, p. 316-320, 2016.

COLACITE, J. Triagem Fitoquímica, Análise Antimicrobiana e Citotóxica e dos Extratos das Plantas: *Schinus terebinthifolia*, *Maytenus ilicifolia* Reissek, *Tabebuia avellaneda*, *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. **Saúde e Pesquisa**, v. 8, n. 3, p. 509-516, 2015.

COLMAN, T. A. D. et al. Avaliação termoanalítica e estrutural de misturas binárias aceclofenaco: amido de pinhão. **Brazilian Journal of Thermal**

CORDELL, G. A.; COLVARD, M. D. Natural products and traditional medicine: turning on a paradigm. **Journal of natural products**, v. 75, n. 3, p. 514-525, 2012.

CORTÉS-ROJAS, D. F.; OLIVEIRA, W. P. Physicochemical properties of phytopharmaceutical preparations as affected by drying methods and carriers. **Drying Technology**, v. 30, n. 9, p. 921-934, 2012.

COSTA, R. C. et al. Mercado de bioprodutos fitoterápicos e fitocosméticos: gestão, tecnologias e inovação. 2017.

COUTO, R. O. et al. Spray drying of *Eugenia dysenterica* extract: effects of in-process parameters on product quality. **Revista brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 1, p. 115-123, 2013.

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

DAI, J.; MUMPER, R. J. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. **Molecules**, v. 15, n. 10, p. 7313-7352, 2010.

DAJAS, F. Life or death: neuroprotective and anticancer effects of quercetin. **Journal of ethnopharmacology**, v. 143, n. 2, p. 383-396, 2012.

DAVID, B.; WOLFENDER, J. L.; DIAS, D. A. The pharmaceutical industry and natural products: historical status and new trends. **Phytochemistry Reviews**, v. 14, n. 2, p. 299-315, 2015.

DE ALBUQUERQUE, U. P. et al. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. **Journal of ethnopharmacology**, v. 114, n. 3, p. 325-354, 2007.

DE ARAÚJO, D. R. C. et al. Effects of Rainfall on the Antimicrobial Activity and Secondary Metabolites Contents of Leaves and Fruits of *Anadenanthera colubrina* from Caatinga Area. **Pharmacognosy Journal**, v. 9, n. 4, 2017.

DE ARAÚJO, E. R. D. et al. Avaliação do potencial antimicrobiano de extrato hidroalcoólico e aquoso da espécie *Anadenanthera colubrina* frente as bactérias Gram negativa e Gram positiva. **Biota Amazônia**, v. 5, n. 3, p. 66-71, 2015.

DE CASTRO, R. A.; ALBIERO, A. L. M. O mercado de matérias primas para indústria de fitoterápicos. **Revista Fitos Eletrônica**, v. 10, n. 1, p. 59-72, 2016.

, D. R.; DE OLIVEIRA, A. C. D.; MARQUES, L. C. O estado regulatório dos fitoterápicos no Brasil: Um paralelo entre a legislação e o mercado farmacêutico (1995–2015). **Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia**, v. 4, n. 4, p. 139-148, 2016.

DE OLIVEIRA, M. A.; YOSHIDA, M. I.; DE LIMA-GOMES, E. C. Análise térmica aplicada a fármacos e formulações farmacêuticas na indústria farmacêutica. **Química nova**, v.34, n.7 p.1224-1230, 2011.

DE OLIVEIRAa, A. H. et al. Development and validation of high-performance liquid chromatography with diode array detector method to analysis of kaempferol marker from extracts of *Poincianella pyramidalis* (tul) lp queiroz. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 10, n. 12, p. 252-259, 2017.

De OLIVEIRA, A. H. et al. Thermal degradation kinetics of kaempferol and quercetin in the preformulated of the standardized extracts of *Poincianella pyramidalis* (TUL.) L. P. queiroz obtained by spray dryer. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciencies**, v. 9, n. 6, p. 123-128, 2017.

DE SOUSA NUNES, R. et al. Validação de metodologia analítica para doseamento do timol em extratos vegetais de *Lippia sidoides* Cham por CLAE. **Rev. Bras. Farm**, v. 86, n. 3, p. 87-91, 2005.

DE SOUSA OLIVEIRA, I. et al. Efeito do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* (erva mate): estudo em ratos wistar. **Revista Interdisciplinar**, v. 7, n. 3, p. 77-82, 2014.

DE SOUZA, M. A. et al. Hepatotoxicidade de plantas medicinais. L. Ação da infusão de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan no camundongo. **Investigação**, v. 7, n. 1-3, 2007.

DE VIANA, M. L. et al. Morphology and genetics of *Anadenanthera colubrina* var. cebil (Fabaceae) tree from Salta (Northwestern Argentina). **Revista de biologia tropical**, v. 62, n. 2, p. 757-767, 2014.

DELGOBO, C. L. et al. Gum heteropolysaccharide and free reducing mono-and oligosaccharides of *Anadenanthera colubrina*. **Phytochemistry**, v. 47, n. 7, p. 1207-1214, 1998.

DIAS, A. L. S.; SOUZA, J. N. S. de; ROGEZ, H. Purification of phenolic compounds from *Inga edulis* leaves using solid-phase extraction: major compounds quantification and antioxidant capacity evaluation. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 38-42, 2010.

DIAS, F. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Determination of phenolic acids and quercetin in Brazilian red wines from vale do São francisco region using liquid-liquid ultrasound-assisted extraction and HPLC-DAD-MS. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, n. 6, p. 1055-1059, 2016.

DONER, L. W.; BECARD, G.; IRWIN, P. L. Binding of flavonoids by polyvinylpyrrolidone. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 41, n. 5, p. 753-757, 1993.

DONNO, D. et al. Biomolecules and natural medicine preparations: analysis of new sources of bioactive compounds from Ribes and Rubus spp. buds. **Pharmaceuticals**, v. 9, n. 1, p. 7, 2016.

EHLERT, P. A. D. et al. Influência do horário de colheita sobre o rendimento e composição

do óleo essencial de erva-cidreira brasileira [*Lippia alba* (Mill.) NE Br.]. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, p. 72-77, 2013.

FANG, Z.; BHANDARI, B. Effect of spray drying and storage on the stability of bayberry polyphenols. **Food Chemistry**, v. 129, n. 3, p. 1139-1147, 2011.

FANSWORTH, N. Screening of plants for new medicines. In “Biodiversity,” Ed. EO Wilson. 1988.

FERREIRA NEPOMUCENO, C. et al. Respostas morfofisiológicas in vitro de plântulas de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. cebil (Griseb) Altschul. **Revista Árvore**, v. 33, n. 3, 2009.

FLORA DO BRASIL

Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB18072>>.

FOLASHADE, O. et al. Standardization of herbal medicines-A review. **International Journal of Biodiversity and Conservation**, v. 4, n. 3, p. 101-112, 2012.

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.

GARCÍA, M. V. et al. A unifying study of phenotypic and molecular genetic variability in natural populations of *Anadenanthera colubrina* var. cebil from Yungas and Paranaense biogeographic provinces in Argentina. **Journal of genetics**, v. 93, n. 1, p. 123-132, 2014.

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

GU, R. et al. Prospecting for bioactive constituents from traditional medicinal plants through ethnobotanical approaches. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 37, n. 6, p. 903-915, 2014.

GUIZZO, P. L. et al. Controle de Qualidade e triagem fitoquímica da droga vegetal das folhas de *Morus nigra* L.(MORACEAE). **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v. 36, n. 2, 2015.

GUTIERREZ-LUGO, M. T. et al. Lipoxygenase inhibition by ananthoflavone, a new flavonoid from the aerial parts of *Anadenanthera colubrina*. **Planta medica**, v. 70, n. 03, p. 263-265, 2004.

HAJDU, Z.; HOHMANN, J. An ethnopharmacological survey of the traditional medicine utilized in the community of Porvenir, Bajo Paraguá Indian Reservation, Bolivia. **Journal of ethnopharmacology**, v. 139, n. 3, p. 838-857, 2012.

HASENCLEVER, L. et al. A indústria de fitoterápicos brasileira: desafios e oportunidades. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 22, p. 2559-2569, 2017.

HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. **Journal of natural products**, v. 59, n. 2, p. 205-215, 1996.

HEIGL, D.; FRANZ, G. Stability testing on typical flavonoid containing herbal drugs. **Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 58, n. 12, p. 881-885, 2003.

HSU, B. Y. et al. Simultaneous determination of phenolic acids and flavonoids in *Chenopodium formosanum* Koidz (djulis) by HPLC-DAD-ESI-MS/MS. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 132, p. 109-116, 2017.

GUIDELINE, ICH- Q1 A (R2) Harmonised Tripartite et al. Stability testing of new drug substances and products. **Q1A (R2), current step**, v. 4, 2003.

ICH Q2 B (R1). Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation Research. Guidance for industry: ICH Q2 (R1). Validation of analytical procedures: methodology. Rockville; 1995.

ISAAC, V. L. B. et al. Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. **Revista de Ciências Farmacêuticas básica e aplicada**, v. 29, n. 1, p. 81-96, 2009.

JAIN, H. K, Deore D. D. Bioanalytical method development and validation for estimation of clopidogrel bisulfate in human plasma by RP-HPLC. **Int J Appl Pharm** 2016; 8:18-21.

JESUS, W. M. M.; CUNHA, Tarcísio Neves da. Estudo das propriedades farmacológicas da espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek) e de duas espécies adulterantes. **Revista Saúde e Desenvolvimento**, v. 2, n. 1, p. 20-46, 2012.

JIANG, W. et al. Nanoparticle-mediated cellular response is size-dependent. **Nature nanotechnology**, v. 3, n. 3, p. 145, 2008.

JÚNIOR, W. S. F.; LADIO, A. H.; DE ALBUQUERQUE, U. P. Resilience and adaptation in the use of medicinal plants with suspected anti-inflammatory activity in the Brazilian Northeast. **Journal of ethnopharmacology**, v. 138, n. 1, p. 238-252, 2011.

KARAM, M. C. et al. Effects of drying and grinding in production of fruit and vegetable powders: A review. **Journal of Food Engineering**, v. 188, p. 32-49, 2016.

KAUR, I. et al. Accelerated stability studies on dried extracts of *Centella asiatica* through chemical, HPLC, HPTLC, and biological activity analyses. **Journal of evidence-based complementary & alternative medicine**, v. 21, n. 4, p. NP127-NP137, 2016.

KIM, Chong-ju. **Advanced pharmaceuticals: physicochemical principles**. CRC Press, 2004.

KLEIN, T. et al. Fitoterápicos: um mercado promissor. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 3, p. 241-248, 2010.

LANDIM, L. P.; FEITOZA, G. S.; DA COSTA, J. 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.

LARGO-AVILA, E. et al. Influence of maltodextrin and spray drying process conditions on sugarcane juice powder quality. **Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín**, v. 68, n. 1, p. 7509-7520, 2015.

LAURO, M. R. et al. Encapsulation of a citrus by-product extract: Development, characterization and stability studies of a nutraceutical with antioxidant and metalloproteinases inhibitory activity. **LWT-Food Science and Technology**, v. 62, n. 1, p. 169-176, 2015.

LEDOUX, M. Analytical methods applied to the determination of pesticide residues in foods of animal origin. A review of the past two decades. **Journal of chromatography A**, v. 1218, n. 8, p. 1021-1036, 2011.

LEITE, J. P. V. **Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas**. Atheneu, 2009.

LEITE, R. S. et al. Evaluation of thermal stability and parameters of dissolution of nifedipine crystals. **Journal of thermal analysis and calorimetry**, v. 111, n. 3, p. 2117-2123, 2013.

LEITE, R. S. et al. Standardisation and stability evaluation of dry extracts of *Myracrodruon urundeuva* allemão obtained by a spray drier. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 9, n. 2, p. 154-159, 2017.

LIST, P. H.; SCHMIDT, P. C. **Phytopharmaceutical technology**. CRC Press, 1989.

MACEDO, R. O.; DO NASCIMENTO, T. G.; VERAS, J. W. E. Comparison of generic hydrochlorothiazide formulations by means of TG and DSC coupled to a photovisual system. **Journal of thermal analysis and calorimetry**, v. 64, n. 2, p. 757-763, 2001.

MANZANO, H.; DE SOUZA, A. B.; GÓRNIK, S. L. Exposição cianídrica em suínos: uma abordagem dos parâmetros toxicocinéticos utilizando o tiocianato como biomarcador. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, n. supl., p. 93-101, 2006.

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

MARTINS, R. M. et al. Curcuminoid content and antioxidant activity in spray dried microparticles containing turmeric extract. **Food research international**, v. 50, n. 2, p. 657-663, 2013.

MASTERS, K. et al. Spray drying handbook. **Spray drying handbook**, 198

MATAMOROS, V. et al. Analytical procedures for the determination of emerging organic contaminants in plant material: A review. **Analytica chimica acta**, v. 722, p. 8-20, 2012.

MATTILA, P.; ASTOLA, J.; KUMPULAINEN, J. Determination of flavonoids in plant material by HPLC with diode-array and electro-array detections. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 12, p. 5834-5841, 2000.

MCMANUS, J. P. et al. Polyphenol interactions. Part 1. Introduction; some observations on the reversible complexation of polyphenols with proteins and polysaccharides. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2**, n. 9, p. 1429-1438, 1985.

MEIRELLES, L. M. A. Estabilidade de medicamentos: estado da arte. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 11, n. 4, p. 06-26, 2014.

MIGLIATO, K. F. et al. Quality control of *Syzygium cumini* (L.) Skeels fruits. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 94-101, 2007.

MIYAUCHI, Y.; YOSHIMOTO, T.; MINAMI, K. Extractives from the heartwood of *Piptadenia* sp. **Journal of the Japan Wood Research Society**, 1976.

MONAGO-MARAÑA, O.; DE LA PEÑA, A. M.; GALEANO-DÍAZ, T. Isocratic LC–DAD–FLD method for the determination of flavonoids in paprika samples by using a rapid resolution column and post-column pH change. **Talanta**, v. 152, p. 15-22, 2016.

MONTEIRO, J. M. et al. Does total tannin content explain the use value of spontaneous medicinal plants from the Brazilian semi-arid region?. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, n. 2, p. 116-123, 2014.

MORETÃO, M. P. et al. Induction of secretory and tumoricidal activities in peritoneal macrophages activated by an acidic heteropolysaccharide (ARAGAL) from the gum of *Anadenanthera colubrina* (Angico branco). **Immunology Letters**, v. 93, n. 2-3, p. 189-197, 2004.

MORIM, M.P. 2015. *Anadenanthera* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro.

MORIM, M.P. *Anadenanthera* in **Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em:
<<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB18072>>. Acesso em: 20 Nov. 2017.

MORIM, M.P. *Anadenanthera* in Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em:
<<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB18072>>. Acesso em: 14 Dez. 2017.

MORSELLI, L. N. S. Estudos de pré-formulação e desenvolvimento de cosméticos Dimora Del Sole. 2014.

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

NASCIMENTO, O.; MALDONADO, J.; ARNÓBIO, A. Estudo do desempenho comercial dos insumos farmacêuticos vegetais sob a ótica do Comércio Exterior. **Revista Fitos Eletrônica**, v. 9, n. 3, p. 233-246, 2015.

NEPOMUCENO, C. F. *et al.* Control of leaf abscission and in vitro morphogenesis in cultures of *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. *cebil* Altschul. **Revista Árvore**, v. 31, n. 5, p. 967-975, 2007.

NETO, B. B. Planejamento e Otimização de Experimentos. 1996.

OLIVEIRA, O. W.; PETROVICK, P. R.. Secagem por aspersão (spray drying) de extratos vegetais: bases e aplicações. **Revista brasileira de farmacognosia**, v. 20, n. 4, p. 641-650, 2010.

OLIVEIRA, V. B. *et al.* Effect of different extraction techniques on the yield, antioxidant activity, total dosages, and profile by hplc-dad of *Dicksonia sellowiana* (Presl.). Hook, *dicksoniaceae*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n. 1, p. 230-239, 2016.

ORTOLANI, F. A. *et al.* Cytogenetic characterization in *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan (*Mimosoideae*) and *Guazuma ulmifolia* Lam. (*Sterculiaceae*). **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, n. 2, p. 299-303, 2010.

PANDEY, A.; TRIPATHI, S. Concept of standardization, extraction and pre-phytochemical screening strategies for herbal drug. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 2, n. 5, 2014.

PARAMITA, V. *et al.* Effect of additives on the morphology of spray-dried powder. **Drying Technology**, v. 28, n. 3, p. 323-329, 2010.

PELOI, K. *et al.* Utilização de planejamento fatorial para a determinação da capacidade antioxidante e doseamento de flavonoides totais em *Verbena minutiflora* Briq. ex Moldenke (gervai). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n. 1, p. 1-8, 2016.

PÉRTILE, R. *et al.* Isolamento e elucidação estrutural de compostos polares de *Lippia alba* (Miller) NE Brown Ex Britt. & Wils. 2007.

PESSOA, W. S. *et al.* Effects of angico extract (*Anadenanthera colubrina* var. *cebil*) in cutaneous wound healing in rats. **Acta cirurgica brasileira**, v. 27, n. 10, p. 655-670, 2012.

PIACENTE, Sonia et al. Anadanthoside: a flavanol-3-O- β -D-xylopyranoside from *Anadenanthera macrocarpa*. **Phytochemistry**, v. 51, n. 5, p. 709-711, 1999.

PIVOTTO, L. J.; CARDOSO, C. R. P. FM 25. Qualidade e obtenção do extrato de *Astronium fraxinifolium* Schott, espécie do cerrado com potencial antibacteriano. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciencies**, v. 36, n. 2, 2015.

PROCHÁZKOVÁ, D.; BOUŠOVÁ, I.; WILHELMOVÁ, N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. **Fitoterapia**, v. 82, n. 4, p. 513-523, 2011.

RANKELL, A. S.; LIEBERMAN, H. A.; SCHIFFMAN, R. F. Secagem. **Lachman L, Lieberman HA, Kanig JL. Teoria e prática na indústria farmacêutica**, v. 1, p. 83-112, 2001.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química nova**, 2004.

RODRIGUES, A. C da C.; OSUNA, J. T. A. Mudanças morfológicas em sementes na espécie Angico (*Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. cebil [Griseb.] Altschul) em diferentes condições ambientais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, p. 35-36, 2004.

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.

RODRIGUES, N. M.; SANDINI, T. M.; PEREZ, E. Avaliação farmacognóstica de folhas de *Eugenia uniflora* L., *Myrtaceae* (Pitangueira), advindas da cidade de Guarapuava, PR. **Biosaúde**, v. 12, n. 1/2, p. 1-13, 2016.

ROSSI FORIM, M. et al. Concerns and Considerations about the Quality Control of Natural Products Using Chromatographic Methods. **Current Chromatography**, v. 2, n. 1, p. 20-31, 2015.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; OWEN, S. C. Handbook of pharmaceutical excipients. vol. 6. London: Pharmaceutical press, 2006.

SANDINI, T. M. et al. Avaliação farmacognóstica de *Phyllanthus tenellus* Roxb., Euphorbiaceae (Quebra-Pedra) coletadas em Rancho Alegre D'Oeste, Paraná. **Biosaúde**, v. 13, n. 1/2, p. 1-11, 2016.

SANSONE, F. et al. Flavonoid microparticles by spray-drying: Influence of enhancers of the dissolution rate on properties and stability. **Journal of Food Engineering**, v. 103, n. 2, p. 188-196, 2011.

SANTANA, A. L. B. D. et al. Antitermitic activity of extractives from three Brazilian hardwoods against *Nasutitermes corniger*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 64, n. 1, p. 7-12, 2010.

SANTOS, J. S. et al. Beneficial effects of *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan extract on the inflammatory and nociceptive responses in rodent models. **Journal of ethnopharmacology**, v. 148, n. 1, p. 218-222, 2013.

SARALA, M. et al. Spray drying of *Tinospora cordifolia* leaf and stem extract and evaluation of antioxidant activity. **Journal of food science and technology**, v. 49, n. 1, p. 119-122, 2012.

SEEFF, L. B. et al. Herbal products and the liver: a review of adverse effects and mechanisms. **Gastroenterology**, v. 148, n. 3, p. 517-532. e3, 2015.

SHI, Zi-Qi et al. Identification of effective combinatorial markers for quality standardization of herbal medicines. **Journal of Chromatography A**, v. 1345, p. 78-85, 2014.

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, J. A. et al. Desenvolvimento e validação de metodologias analíticas para quantificação de um derivado tiofênico em sistemas microemulsionados. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 35, n. 4, 2015.

SILVA, P. I. et al. Parameter optimization for spray-drying microencapsulation of jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) peel extracts using simultaneous analysis of responses. **Journal of Food Engineering**, v. 117, n. 4, p. 538-544, 2013.

SKALICKA-WOŹNIAK, K.; SZYPOWSKI, J.; GŁOWNIAK, K. HPLC analysis of kaempferol and quercetin derivatives isolated by different extraction techniques from plant matrix. **Journal of AOAC International**, v. 94, n. 1, p. 17-21, 2011.

SOLÍS, V. C.; BARRANDEGUY, M. E.; GARCIA, V. Divergencia histórica en *Anadenanthera colubrina* var. cebil (*Leguminosae*) analizando una región intrónica del ADN cloroplástico. **Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica**, v. 49, p. 547-557, 2014.

SONAGLIO, D. et al. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. **SIMÕES, CMO; SCHENKEL, EP; GOSMANN, G.; MELLO, JCP**, p. 289-326, 2003.

SOTERO, D. E. G. **Caracterização química e avaliação da atividade antioxidante de frutos da Amazônia: chope (*Gustavia augusta* L.), sacha mangua (*Grias neuberthii* Macbr.) e macambo (*Theobroma bicolor*)**. 2002. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

SOUSA, J. N. et al. Optimization of Ultrasound-assisted extraction of polyphenols, tannins and epigallocatechin gallate from barks of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville bark extracts. **Pharmacognosy Magazine**, v. 10, n. Suppl 2, p. S318, 2014.

Souza V. G.; Andrade F. H. D.; Souza F. S.; Macedo R. O. Analytical method by HPLC-DAD allows quantification of quercetin marker in standardized extract of *Anadenanthera colubrina* var. *cebil*. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**; v. 9, n. 8, p. 47-55, 2017.

SOUZA, C. R. F et al. Stability testing and shelf live prediction of a spouted bed dried phytopharmaceutical preparation from *Maytenus ilicifolia*. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 91, n. 11, p. 1847-1855, 2013.

SOUZA-MOREIRA, T. M.; SALGADO, H. R. N.; PIETRO, R. C. L. R. O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, p. 435-440, 2010.

SPÍNOLA, V.; LLORENT-MARTÍNEZ, E. J.; CASTILHO, P. C. Determination of vitamin C in foods: Current state of method validation. **Journal of Chromatography A**, v. 1369, p. 2-17, 2014.

STEINMANN, D.; GANZERA, M. Recent advances on HPLC/MS in medicinal plant analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 55, n. 4, p. 744-757, 2011.

TANG, D. et al. Simultaneous chemical fingerprint and quantitative analysis of Ginkgo biloba extract by HPLC–DAD. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 396, n. 8, p. 3087-3095, 2010.

THAKUR, L. et al. Novel approaches for stability improvement in natural medicines. **Pharmacognosy reviews**, v. 5, n. 9, p. 48, 2011.

TIMÓTEO, P. et al. A validated HPLC method for the analysis of herbal teas from three chemotypes of Brazilian *Lippia alba*. **Food chemistry**, v. 175, p. 366-373, 2015.

TONON, R. V.; GROSSO, C. R. F; HUBINGER, M. D. Influence of emulsion composition and inlet air temperature on the microencapsulation of flaxseed oil by spray drying. **Food Research International**, v. 44, n. 1, p. 282-289, 2011.

TÔRRES, A. R. et al. Estudo sobre o uso de plantas medicinais em crianças hospitalizadas da cidade de João Pessoa: riscos e benefícios. **Rev bras farmacogn**, v. 15, n. 4, p. 373-80, 2005.

TSHIBANGU, P. Tshisekedi et al. Fingerprinting and validation of a LC-DAD method for the analysis of biflavanones in *Garcinia kola*-based antimalarial improved traditional medicines. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 128, p. 382-390, 2016.

TUYEN, C. K.; NGUYEN, M. H.; ROACH, P. D. Effects of spray drying conditions on the physicochemical and antioxidant properties of the Gac (*Momordica cochinchinensis*) fruit aril powder. **Journal of Food Engineering**, v. 98, n. 3, p. 385-392, 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). **Rev Bras Farmacogn**, v. 15, n. 3, p. 243-249, 2005.

VELASCO, M. V. R. et al. Desenvolvimento e Teste Preliminar da Estabilidade de formulações cosméticas acrescidas de extrato comercial de *Trichilia catigua* Adr. Juss (e) *Ptychopetalum olacoides* Benth. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 29, n. 2, p. 181-196, 2009.

WEBER, C. R. et al. *Anadenanthera colubrina*: um estudo do potencial terapêutico. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 92, n. 4, p. 235-244, 2011.

ZAITER, A. et al. Effect of particle size on antioxidant activity and catechin content of green tea powders. **Journal of Food Science and Technology**, v. 53, n. 4, p. 2025-2032, 2016.

APÊNDICE

7. Apêndice

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

Apêndice B - Artigo Científico Submetido no Periódico Planta Médica

Apêndice A - Artigo científico publicado no periodico International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences.



International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences

ISSN- 0975-1491

Vol 9, Issue 8, 2017

Original Article

ANALYTICAL METHOD BY HPLC-DAD ALLOWS QUANTIFICATION OF QUERCETIN MARKER IN STANDARDIZED EXTRACT OF *ANADENANTHERA COLUBRINA* VAR. CEBIL

VALMIR GOMES DE SOUZA^{a*}, FABRÍCIO HAVY DANTAS DE ANDRADE^b, FABIO SANTOS DE SOUZA^{a,b}, RUI OLIVEIRA MACEDO^{a,b}

^aDepartment of Pharmaceutical Sciences, Medicine Development and Assays Unified Laboratories, Federal University of Paraíba, João Pessoa, PB, Brazil, ^bDepartment of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pernambuco, Recife-PE, Brazil
Email: valmirfarmaceutico@gmail.com

Received: 05 Dec 2016 Revised and Accepted: 19 Jun 2017

ABSTRACT

Objective: The *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brennan var. cebil is a medicinal plant that has been used for the treatment of many diseases in the northeastern region of Brazil. This plant contains secondary metabolites such as quercetin, a flavonoid that is known by its antioxidant and anti-inflammatory effects. The aim of this work is to propose the validation of an analytical method using high-performance liquid chromatography with diode array detector (HPLC-DAD) for the quantification of quercetin and standardization of the hydroalcoholic extract (HAE) of *A. colubrina*.

Methods: The *A. colubrina* extracts were prepared by the maceration process with powdered leaves at 20% weight: volume (w/v) and a hydroalcoholic solution at 50% volume: volume (v/v) for 120 h at room temperature. After pretreatment of the hydroalcoholic extract, the quercetin marker was used for quantification and proceeded to the evaluation of validation parameters for the method using HPLC-DAD.

Results: The analytical method proved to be specific. Linear over the range 1.4–26.6 µg/ml, regression analysis showed a good correlation coefficient ($R^2 = 0.999$); the limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ) were 0.27 and 0.81 µg/ml respectively. The relative standard deviation (RSD) did not exceed 2.5% for precision. The proposed method was validated with an average recovery of 92.5–97.5%.

Conclusion: The method was validated using HPLC-DAD, allowing the quantification of quercetin in the standardisation process of extracts and quality control of the herbal drug containing *A. colubrina* Phyto complex.

Keywords: Validation, Analytical, Method, Quercetin, Flavonoid, *Anadenanthera colubrina*

© 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.2017v9i8.16468>

INTRODUCTION

Anadenanthera colubrina (Vell.) Brennan var. cebil (Griseb) Altschul (Fabaceae/leguminosae) is a native plant detected in the South American continent and distributed throughout Paraguay, Argentina, Bolivia, and Brazil [1-2]. Popularly known by the names yopo, cohoba, vilca, and angico, this plant has economic, cultural, and medicinal importance [3-4]. Hydroalcoholic extracts and decoctions of the leaves and bark of *A. colubrina* are used in the treatment of gastric and respiratory tract infections and others inflammatory diseases. It is classified among one of ten medicinal plants most frequently used by the communities living in the bioma named Caatinga located in northeastern Brazil [5-6].

Preclinical studies of the healing and antimicrobial activities of *A. colubrina* extracts endorse their popular usage [7-9]. These assays also demonstrated anti-inflammatory mechanisms, such as the decrease of the production of pro-inflammatory cytokines, inflammatory mediators, increased tyrosine kinase production, and healing action by reducing the synthesis of polymeric collagen and acidic glycoproteins that make healing difficult, and thus contributing to the development of a phytotherapeutic medicinal products with safety and therapeutic efficacy [10-13]. Research on the quality of a herbal drug is not based solely on clinical effects but also on the standardization of plant extracts through quantitative analyses using active ingredients and secondary metabolites called biomarkers [14-16].

The development of analytical methods must be based on fundamental conditions such as sampling, pretreatment sampling, and the evaluation of validation parameters in order to guarantee the quality, consistency, and reliability of the analytical results [17-18]. The pretreatment of samples is a decisive step in the development of the analytical methods of constituents in biological matrices and must guarantee the release of the analytes of the

complex matrix, to be monitored by analytical signals with appropriate instrumentation [19-21]. Some matrices of plant's components may behave as interferers, which impair the identification and quantification of biomarkers, in addition, these interferers may compromise the performance of chromatographic systems [18, 21-23].

A sample clean-up procedure improves analytical sensitivity, enables more robust reproducible results, and preserves the life of chromatographic columns [24-26]. Chromatographic techniques such as HPLC (High-Performance Liquid Chromatography) present advantages for efficiency separation and the identification of compounds when associated with detection systems appropriate to the chemical nature of the analytes, providing qualitative and quantitative information about Phyto-complex components [27-28]. *A. colubrina* has a large amount and class of secondary metabolites: tannins; alkaloids; flavonoids such as quercitrine; isoquercitrine; apigenin; quercetin; and other phenolic compounds [29-33].

Several analytical methods have been reported for the analysis of flavonoids in the extracts of medicinal plants [34-35]; however, they cannot be used as general methods for analysis due to the complexity of each vegetable plant species and the variability of factors that could influence their chemical composition [36-37]. Until now, no method validated by HPLC-DAD for quercetin quantification of HAE of *A. colubrina* has been reported in the literature. Properly validated analytical methods allow reproducible qualitative and quantitative analyses and ensure consistency of the analytical quality of a medicinal product [29, 38]. In this research, a methodology will be developed for extracting the biomarker quercetin in the phytocomplex of *A. colubrina* and an analytical method for the quantification of quercetin in that plant's extract will be validated, according to the ICH (International Conference on Harmonisation) Q2 (R1) guidelines for HPLC-DAD [39-40].

MATERIALS AND METHODS

Reagents and materials

The quercetin standard (Cas 117-39-5) was purchased from Sigma Aldrich®, Brazil, methanol HPLC grade was purchased from Tedia®, USA, orthophosphoric acid was purchased from Merck®, Germany, ethanol 96% was purchased from Toscano®, Brazil, dichloromethane hplc grade and hexane were purchased from Vetec®, Brazil.

Drug identification plant

The *Anadenanthera colubrina* var. cebil leaves were collected from cacimbas farm, Caraiúbas county located in the micro region of cariri in the state of Paraíba (Lat. 7°30'48.1"S; Long. 36°41'81.0"O) in May 2015. The research project with *A. colubrina* received authorization from the Ministry of Environment of Brazil (ICMBio/SISBio/MMA-Brazil) for activities with scientific purpose n° 41277-2. The exsiccatae of the plant species was deposited in the herbarium Lauro Pires Xavier, UFPPB Joao Pessoa, Brazil, under the number NC262.

Plant drug drying

The *Anadenanthera colubrina* var. cebil leaves were dried in a greenhouse with circulating air (Tecnal®, model TE 394-4), under a temperature of 40±2 degrees celsius (°C) by 3 d.

Obtaining the sprayed plant drug

The dry plant drug was submitted to a vertical rotor mechanical mill (Tecnal® Modelo TE-631-3). The powdered vegetable drug was packed in a hermetically sealed plastic bag protected from light and moisture.

Obtaining hydroalcoholic extract (HAE)

The extraction was established from the ratio of 20% weight: volume (w/v) from the mass of the sprayed vegetable drug and the extractive solvent system. The extraction system was defined using a proportion of hydroalcoholic solution at 50:50 volume: volume (v/v), and the extraction method utilised was maceration.

Chromatographic conditions

We used HPLC-DAD system prominence series by SHIMADZU®, Japan, control system was performed by software LC Solutions®, octodecilsilano C-18 stationary phase Gemini nx 5 micrometers (µm) 150 x 4.6 millimeters x 0.5 µm; pre-column gemini C-18 4 x 3.0 mm; membrane-filtered mobile phase PTFE 0.45 µm and degassed: methanol: phosphoric acid 1% (47: 53%). mobile phase flow: 1.2 ml/min; Oven temperature at 40 °C; monitored wave number at 370 nm; injection volume 20 microliters (µL); chromatographic run time 30 min.

Development of the analytical method

An analytical method was validated by HPLC-DAD for the quantification of quercetin marker in extract samples of *A. colubrina*. The ICH Q2-R1 guidelines [34] were observed in the evaluation and validation parameters for analytical procedures: specificity, selectivity, linearity, limit of quantification and detection, precision, accuracy, robustness, and stability. Deviations of up to 5% were considered in the statistical evaluation of the data.

The choice of quercetin marker was based on bibliographical researches of phytochemical compositions [31-32] and preliminary tests of characterization of the variant *A. colubrina* extract, which indicated the same as the majority. An analytical extractive procedure was developed to guarantee clean-up, pre-concentration, exhaustive extraction of the marker, and elimination of possible interferences of the fraction to be injected into the chromatographic system.

In the development of the marker recovery method, continuous multiple extraction was employed and liquid-liquid extraction (ELL) was used by the agitation system (Vortex model AP-56 Phoenix®) of threatened tubes with caps of 10 milliliter (ml) n° 9825 (Pirex®, Mexico) and the use of centrifugation (Centrifuge 80-2B, Macro®) with rotation of 4000 revolutions per minute (RPM) during 10 min to separate the phases.

Determination of the analysis factor

The analysis factor was determined due to successive dilutions made in multiple extraction continued and allowed to quantify the content of the chemical marker present in the extract in micrograms per milliliter (µg/ml).

The Equation 1 below shows how to determine the concentration of the marker in the HAE.

$$Ca = Cp \times FA \times Aa \div Ap \quad (1)$$

Hence:

Ca is the concentration of the quercetin biomarker in the HAE sample, expressed in micrograms per milliliters (µg/ml),

Aa is the area of the chromatographic peak marker on HAE,

Ap is the quercetin standard chromatographic peak,

Cp is the concentration of the chemical reference substance quercetin,

FA is the analysis factor and is calculated by equation 2:

$$FA = Ta \div \{[(Ta \div Fec) \times Fevap] \div Vrec\} \quad (2)$$

Hence:

Ta = HAE Sample Taking

Fevap = Organic Fraction Aliquot

Fec = Fraction Continuous extraction in 3 batches

Vrec = Volume of Reconstitution in the mobile phase.

Specific assessment

In order to demonstrate specificity and selectivity of the method, it was performed in triplicate runs of *A. colubrina* extract samples subjected to analytical screening, standard marker solution, and mobile phase.

Determination of linearity

A quercetin stock solution of 200 µg/ml prepared with methanol 70% was obtained and diluted solutions with concentrations corresponding to 1.4 µg/ml, 2.1 µg/ml, 5.6 µg/ml, 9.8 µg/ml, 14µg/ml, 18.2 µg/ml, 22.4 µg/ml, 26.6 µg/ml to aim linearity. This procedure was performed in triplicate for each concentration level.

Quantification and detection limits

The lowest amount of the analyte detected in a sample that but not necessarily measured as an exact value is known as the limit of detection (LOD). The lowest amount of analyte in a sample that can be quantitatively determined with suitable precision and accuracy is the limit of quantification (LOQ).

The determination of the limits of quantification and detection was based on the treatment of linearity data by statistical methods. The limit of quantification calculation was obtained from the ratio of the deviation of the linear regression by the inclination of the line, multiplied by 10. The limit of detection calculation was based on the ratio of the deviation of the linear regression by the slope of line, multiplied by 3.3.

Precision assessment

Repeatability

Repeatability was demonstrated by the injection of 06 quercetin-content samples close to the mean value (100%) of the standard linearity curve. The acceptance criterion for this parameter was a relative standard deviation (RSD) with a maximum of 5%.

Intermediate precision

Intermediate precision was determined from the analysis of 6 samples of the extract, from different analysts and days, with quercetin content close to the mean value (100%) of the standard linearity curve. A total of 18 chromatographic runs were performed,

and the acceptance criterion was at the maximum of 5% and evaluated the RSD.

Accuracy assessment

The accuracy of the analytical method was assessed by the post-addition recovery of the quercetin marker standard in extract samples. Three concentration levels (low, medium, and high) were monitored with values corresponding to 20%, 100%, and 180%

opposite the accurate concentration obtained. Samples were prepared in triplicate, and injections were performed in duplicate for each concentration level; relative standard deviations (RSD) and recoverability were assessed.

The recovery capacity was calculated from the average concentration of the marker on the standardized extract. Table 1 shows how to calculate standard addition values and percentages of value recovery of the biomarker for all levels.

Table 1: Process of evaluating accuracy of the method

Recovery of standard added				
Level	A (µg/ml)	B (µg/ml)	C (µg/ml)	% recovery
20%	[W ₁]	[0.2 W ₁]		$\text{Rec } 20\% = \frac{[C]}{[A + B]} \times 100$
100%	[W ₁]	[W ₁]	[W ₂]	$\text{Rec } 100\% = \frac{[C]}{[A + B]} \times 100$
180%	[W ₁]	[1.8 W ₁]		$\text{Rec } 180\% = \frac{[C]}{[A + B]} \times 100$

Note: A (initial concentration of quercetin in HAE); B (concentration of standard substance chemistry added); C (Recovered concentration of quercetin in HAE); [W₁] equivalent to the average of the intermediate precision; [W₂] equivalent to the average of the experimental recovery.

Robustness assessment

In the robustness assessment, variations of oven temperatures in the range ± 2 °C were evaluated, as well as variations in the pH of the mobile phase varying ± 0.1 and changes in the mobile phase flow ± 0.1 . Furthermore, variations in the chromatographic profiles such as retention time, peak area of chromatograms, and ultraviolet spectrum profile of the monitored samples were evaluated. The quantification of the marker in the extract of *A. colubrina* samples was determined with a standard quercetin substance in the same analysis condition of parameter robustness. The RSD was calculated and evaluated.

Stability assessment

To evaluate the chemical storage stability of solutions of the marker and the extract samples, these were analyzed at zero to 24 h at room temperature. The chromatographic profile, the analysis of the areas of the chromatographic peaks, the retention time, and the spectral profile of the marker were verified to demonstrate stability.

Statistical analysis

The statistical analysis of the data was determined through analysis of variance (ANOVA) in software Prism® 6.01, considering a level of significance $\alpha = 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

Development of the analytical method

Evaluation of analyte separation parameters

The main pharmacopoeias contains few monographs related to medicinal plants obtained in tropical regions. The standard methods in pharmacopoeias are the most indicated for the evaluation quality control of herbal drugs but not exists any reference related to *Anadenanthera colubrina* [41-42]. Although there are several analytical methods for the analysis of quercetin in extracts, these methodologies cannot be directly applied for any medicinal plant due to the complexity effect of the plant matrix [43-45]. Moreover, not exists any validated method reported to quantify quercetin in *A. colubrina* by HPLC.

Chabariberi and cols. when validated a spectrophotometric methodology for flavonoid analysis in extracts of *Maytenus (Celastraceae)* and *Passiflora (Passifloraceae)* have found differences between the absorbances maximum levels with those recorded in the official pharmacopoeias method which quantified total flavonoids expressed in rutin. This variation can be attributed to modifications in the sample pretreatment, as well as to the complexity of the chemical matrix of the analyzed fraction [46].

The evaluation of the validation parameters in this work was preceded by the developing of samples preparation method and extraction of quercetin marker, then the separation conditions by HPLC of the extract fraction of *A. colubrina* was obtained. The chromatographic analysis of the marker was performed initially with a mobile phase system composed by methanol and phosphoric acid, with pH 2.5 varying the ratio of the organic component. Three proportions methanol with 0.01% phosphoric acid were tested in the order of 30:70, 50:50, and 70:30.

In the analytic method development, the HAE sample and the quercetin standard was evaluated under the same separation conditions. Under the conditions of 30:70 and 70:30 were generated overlapping peaks, already under the 50:50 condition it was showed co-elution with the marker peak when compared to the quercetin standard peak, this interference in the co-elution can be characterized by the absence spectral similarity of the main peak under the evaluated conditions. The fig. 1 shows the chromatographic profiles of each investigated condition.

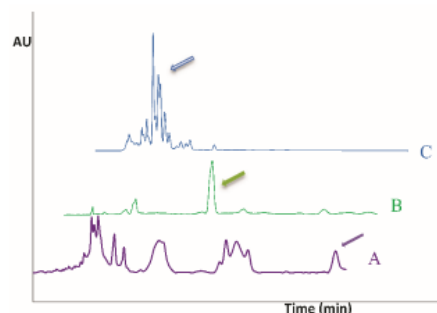


Fig. 1: The chromatographic profile obtained from mobile phase system conditions in the development of the method

According to a review about recent advances in analytical technology applied to quality control of medicinal plants, the complex matrix, the compounds interferences and co-elutions in the chromatographic separations do not allow a reproducible characterization of the extracts [47-48]. In another work with polyphenols, evaluating the chromatographic profiles of natural product, it was demonstrated that there was a great variability in the

content of the secondary metabolites in real matrices of these products [49].

According to Paiva and cols., in a study evaluating the chromatographic profile of two species of the *Plumbaginaceae* taxonomic family, the data showed that these species presented common chemical markers, however the chromatographic profiles were different among of the analyzed species, the data, also demonstrated which there are chemical variability on the constituents of the extracts which can differentiate so close species [50].

Xie and cols. validated a method for the simultaneous quantification of three flavonoids and evaluated the chromatographic fingerprints of *Flos sophorae immaturus* which were collected from different areas from China. The data showed that although the samples shared similar chromatographic patterns, the similarity analysis demonstrated that difference in the constituent's ratios and integrated areas resulted in low similarity values, even if all samples show similar chromatographic fingerprint profiles [51].

The matrix effect is not usually evaluated in validation guidelines, and has been omitted in most of the methods here consider. However, this parameter is a very important parameter to obtain a properly validated and accurate analytical method [52].

The chromatographic analysis of the HAE sample presented interferences that precludes a direct analysis, thus, it was necessary to perform a series of pretreatments in order to remove the interferences such as, fats and pigments which are very common in complex matrices of plants [53-55]. These interfering substances may influence the parameters of selectivity and specificity of analytical validation and can be confirmed when it is seen no clean chromatograms by co-elution of other substances with the main peak and when apolar compounds are retained in the column and chromatographic runtimes are extensive [56-58].

The selection of the best separation condition was based on peak resolution parameters (R_s), retention index (k'), tailing factor (T), separation efficiency (α), and number of theoretical plates (N) in relation to the main peak monitored, showing the need to optimize the elution condition 50:50 to at 47%:53% methanol: phosphoric acid 0.01%, pH 2.5. The pH value is justified and consistent with the literature through the employs low pH and suppression of ionization, assuring complete elution of analyte [59-61].

All evaluated parameters shown in table 2 demonstrate the efficiency of the separation. The peak of the quercetin chemical marker with retention time of 10.14 min was considered as the main peak to calculate the values obtained.

Table 2: Parameters of chromatographic separation efficiency

Standard peak (RT = 10.1 min)	Mobile phase 47:53	Recommendation
Resolution (R_s)	2.07	$R_s > 1.5$
Retention factor (k')	3.76	$1 \leq k' \leq 10$
Tailing factor (T)	1.020	$0.5 \leq T \leq 2$
Separation efficiency (α)	1.23	$\alpha > 1$
Theoretical plates (N)	3878	$N > 2000$

Note: Mobile phase system consisting of methanol 47% and 53% Phosphoric acid 0.01%. RT (real time).

As shown in table 2, the optimized conditions generate chromatograms with an ideal range for retention factors ($1.0 < k' < 10$), separation efficiency values greater than 1.0, and resolution above 2.0, confirming the quality of separation. The efficiency of the column was optimum, and the peaks of the rejection factor between 0.5 and 2.0 demonstrate the run. Analytical methods confirm good results in the efficiency parameters, as obtained in the value of 3878 theoretical plates higher than 2000.

Timóteo and cols. In validating a method for analysis of herbal teas found that a single chromatographic peak corresponded to three constituents. The accurate separation of the constituents was only possible after varying the separation conditions using stationary phase with different characteristics and dimensions and monitoring of the spectral purity, as realized in the present [62].

Evaluation of analyte recovery

The recovery of the marker investigated the extractive potential of solvents with different polarities: dichloromethane, ethyl acetate, and chloroform on the fluid extract matrix. Extraction with ethyl acetate showed a single-phase system with difficult separation, extraction not being possible. In contrast, the chloroform solvent was able to extract with limitation and variation in the recovery and reproducibility of the analyte, even with the use of continuous multiple extractions. Otherwise, dichloromethane was suitable for extracting the analyte efficiently after three extractions using a continuous multiple-extraction system.

The recovery of the method was also evaluated through different aqueous fractions of 0.5 to 2 ml of HAE, in which the recovery and the selectivity of the marker in the extraction were determined. The best recovery was obtained in 0.5 ml fraction with three consecutive extraction steps, obtaining a separation of the marker with selectivity and adequate recovery. The final step of the sample preparation was the evaporation at 50 °C of 4.0 ml dichloromethane fraction followed by reconstitution of the same in the mobile phase.

The reconstituted solution was filtered and transferred to vials to be injected into the chromatographic system.

A study that evaluated extraction of quercetin and kaempferol in plant matrix concluded that ethyl acetate solvent was insufficient to extract the flavonoids by liquid-liquid extraction, which is consistent with the data obtained in this work [63]. Several papers present the methanol solvent as optimum in the extraction of flavonoids [51, 62], but due to the aqueous nature of the extract preference was given to a solvent that produced a heterogeneous system with the fluid extract. In this work, the choice by chloroform and dichloromethane was based on the principle of miscibility between the fluid extract and these solvents and still on the chemical affinity these solvents have for flavonoid compounds [64-65].

Evaluation of the method validation parameters

Assessment of specificity

The specificity of the method was based on comparing its retention times and UV-spectra in the 200-400 nm range with the quercetin standard. Also compared were the spectral and chromatographic profiles of blank from the mobile phase, quercetin standard, and sample extract.

The choice of an appropriate detection wavelength was of great importance to ensure accurate detection of the quercetin and to achieve specificity. The UV spectrum of the compound was detected at 370 nm by diode array detector under the chromatographic conditions as described in methodology. The specificity analysis was demonstrated as shown in fig. 2 and the results are consistent with those reported in the literature [52].

The analysis of chromatographic profiles of the standard and sample showed that the method was specific in separation and identification marker quercetin by overlapping chromatographic profiles. The spectral analysis of the sample and standard quercetin, shown in fig. 2 and 3 demonstrates the specificity by the similarity of the spectral

profile and identification of the wave number with maximum absorbance at 370 nm.

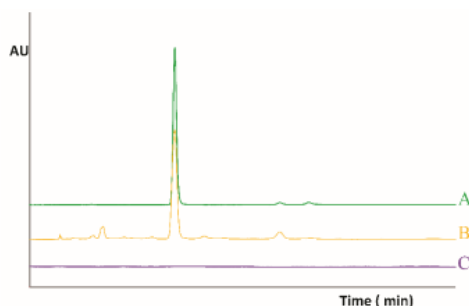


Fig. 2: Chromatographic profiles of the quercetin solution standard (A), solution sample (B) and blank (C)

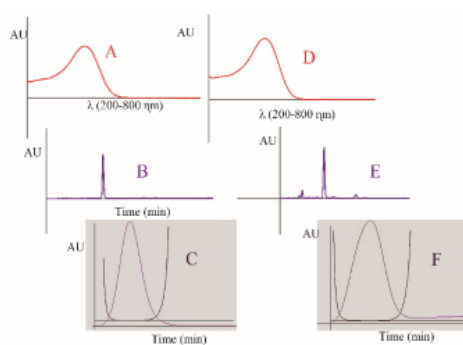


Fig. 3: Spectral profile of the quercetin standard (A, B, C) and the marker monitored in the extract of the leaves of *A. colubrina* (D, E, F)

Table 3: The Mean linearity obtained from triplicate injections of solutions containing quercetin as reference standard

Level (%)	Concentrations ($\mu\text{g/ml}$)	Mean $\text{area} \pm \text{RSD}$
10	1.4	75218 $\pm$ 4.4
15	2.1	116212 $\pm$ 3.1
40	5.6	308288 $\pm$ 3.1
70	9.8	552019 $\pm$ 1.3
100	14	796704 $\pm$ 1.7
130	18.2	1037895 $\pm$ 0.1
160	22.4	1268748 $\pm$ 0.2
190	26.6	1504493 $\pm$ 1.2

Note: * n = 3 injections, RSD (Relative standard deviation).

The mean linearity curve and linear regression equation are shown in fig. 4. The linearity met the requirement of R^2 greater than 0.99 as recommended in the validation guides of analytical methods. The data that generated average linearity are available in the complementary information. The analysis of variance as a single factor showed a value of F (critical) that was higher than the value of F calculated, indicating that the variations among the data for the three curves were not significant. The statistical data of linearity were in agreement with ICH guidelines for analytical methods. Similar results were reported by Blainski and cols. when validating a method by HPLC-DAD for gallicocatechin and epigallocatechin quantification in rhizomes from *Limonium brasiliense* obtained linearity results similar to this work. The regression coefficient (R^2) for two markers were above 0.99, calculated F-value is lower than critical F-value, the analysis of variance showed p-value below 0.001[68].

The ultraviolet spectrum indicated on graphics A and D were evidence of similar spectral profiles with a maximum absorbance of 370 nm. The graphics C and F demonstrate spectral purity for both chromatographic peaks, shown in profiles B and E, which represent the chromatographic run of the sample and standard. In addition, specificity was confirmed by detector photodiode arrangement, which demonstrated that quercetin peaks have no co-elution of any additional peak, with values of peak purity greater than 0.999. The confirmation of the identification of the monitored peak in the chromatographic profiles is visualized in fig 3.

Based on the chromatographic and spectral profiles observing peak retention time, spectral profiles similarity, and spectral purity, it was possible to demonstrate the specificity of the same proposed method.

Determination of sensitivity

Both the limit of detection (LOD) and the limit of quantitation (LOQ) were also determined with linearity and statistical tool applications; the limits of quantification and detection were respectively calculated to obtain values of 0.81 $\mu\text{g/ml}$ and 0.27 $\mu\text{g/ml}$. similar results were reported in the development of the analytical method for quercetin determination in the *Platycladus orientalis* (L.). At cited work obtaining LOD values of 0.005 $\mu\text{g/ml}$ and LOQ values equivalent to 0.01 $\mu\text{g/ml}$ [66]. The values difference in relation to the proposed method can be associated with several factors such as extractive matrix complexity, the method of determination of LOD parameters and LOQ up to detector sensitivity. Mattonai and cols. validated a method by HPLC-DAD and HPLC-MS for determination of polyphenols in monofloral honey, obtaining LOD and LOQ for quercetin equivalent to 0.2 and 0.7 $\mu\text{g/ml}$ respectively. These results of cited article are in agreement with data of the analytical method validation proposed in this work [67].

Determination of linearity

Table 3 shows the plotted reference values of linearity with average areas obtained for each concentration level. The linearity of the method was demonstrated by evaluating the linear correlation R^2 coefficient obtained by linear regression and analysis of single factor variance, where it was shown that the F Tabulated (Critical) is greater than the calculated F value, for a level of significance of $\alpha > 0.05$. Based on ANOVA, the variations between values obtained from the three curves were not significant.

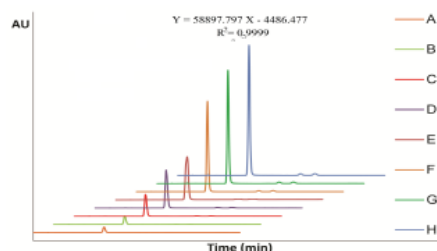


Fig. 4: Chromatographic profiles of linearity obtained with 8 points at increasing concentrations and linear regression equation with R^2 value

Precision assessment

Repeatability and intermediate precision

Repeatability was evaluated with the same analyst, day, and chromatograph with six runs from the extract sample, allowing the proposed method to exhibit adequate precision for quercetin, with the percentage of RSD overall better than 5%.

The intermediate precision was evaluated in three days with a total of 18 runs of the extract obtained from the extract sample. The results obtained from the precision are plotted in table 4. These data demonstrated intermediate precision and met the requirements for

the analytical method validation guidelines. According to the statistical analysis, there were no significant variations among the data, where p value between rows and columns is above 0.05, and critical F values are smaller than the values of the tabled F , proving that the method developed is accurate under the established conditions. The overall composition of the extract was the same in all the samples analyzed, assure reproducibility and highlighted the repeatability and intermediate precision as an important parameter for quantitative analysis of *A. Colubrina*. These results are according to the official literature for methods of validating [69] and demonstrate that the developed method can be satisfactorily used for determination of quercetin in the *A. colubrina* samples extracts.

Table 4: Precision assessment

Repeatability	Concentration of quercetin ($\mu\text{g/ml}$)	RSD (%)
Mean $\pm$ SD	114.96 $\pm$ 2.23	1.9
Day	Intermediate precision (intra day)	
1	Mean $\pm$ SD	127.01 $\pm$ 4.06
2	Mean $\pm$ SD	125.05 $\pm$ 1.10
3	Mean $\pm$ SD	125.67 $\pm$ 2.92
Intermediate precision (inter day)		
Average $\pm$ SD	125.92 $\pm$ 2.90	2.30

Note: ^{a} n = 6; ^{b} n = 18, SD (Standard deviation) and RSD (Relative standard deviation).

Accuracy assessment

The accuracy of the analytical method was evaluated by adding known amounts of the marker quercetin in three concentrations: low, medium, and high. The standard addition had values of 20%, 100%, and 180% compared with mean values of the concentration obtained in the matrix. In table 5, the data are plotted for the

accuracy assessment of the proposed method. It contains the values of average areas (duplicate) obtained for each level of accuracy with their respective values, information about the true value concentration of samples with standard addition, and experimental values obtained after recovery of the marker expressed in percentages. Statistical analysis confirmed that the data were within the acceptance criteria.

Table 5: Evaluate of recovery and accuracy

Level of addition (%)	A ($\mu\text{g/ml}$) $\pm$ SD	B ($\mu\text{g/ml}$) $\pm$ SD	C ($\mu\text{g/ml}$) $\pm$ SD	Recovery (%) $\pm$ SD
20 % ^a	125.9 $\pm$ 2.90	25.2	147.3 $\pm$ 4.3	97.5 $\pm$ 2.7
RSD (%)	2.3		2.9	2.7
100 % ^b		125.9	238.15 $\pm$ 4.3	93.8 $\pm$ 4.1
RSD (%)			1.8	4.4
180 % ^c		226.6	327.5 $\pm$ 11.5	92.5 $\pm$ 3.4
RSD (%)			3.4	3.7

Note: A (concentration of quercetin in matrix of the extract); B (concentration of standard quercetin added); C (amount recovered). ^{a} ^{b} ^{c} n = 18, SD (Standard deviation) and RSD (Relative standard deviation).

The quercetin marker was recovered by partitioning fluid extract and dichloromethane solvent using liquid liquid extraction. The pretreatment of the sample was based on the principle of chemical similarity, where the solvent removed interfering compounds and recovered the quercetin from the phytocomplex of *A. colubrina* [50].

The assessment of recovery is a determining parameter in the safety of analytical measures and critical step in the validation [39]. Mattila and colleagues determined the amount of quercetin in apple, red wine and green tea obtaining recovery of 79%, 104% and 82% respectively, compared to 93% reference sample, which demonstrates the variability of extraction in different matrices and the importance of establishing strategies for the removal of interferences and total extraction of the analytes of interest [70]. The recovery of analytes in complex matrices by methodology similar to the one performed in the present research presented recovery range between 92 and 94% with RSD<5% [71]. Tang and cols. evaluating the recovery of the quercetin marker in *Ginkgo biloba* extract samples, obtained recovery values between 97.2 and 101.4% with RSD = 2% [72]. Another study, evaluating different techniques of extracting the flavonoids quercetin and kaempferol in plant matrices, presented values of recovery of these analytes after standard addition between 96.8 and 98.2% [63]. These researches confirm the recovery values of quercetin obtained for samples of *A. colubrina* extract.

Robustness assessment

The robustness was determined using the overall mean, standard deviations, relative standard deviations (RSD %) for each parameter. Samples were prepared in triplicate and the analyses were performed in duplicate for each condition evaluated.

The most typical variations on robustness considered in analytical methods validation are the column oven temperature, the composition, the pH and the flow of the mobile phase [52].

In the evaluation of the influence of variations in the column oven temperature, on the areas of the peaks, it was observed that this parameter in the evaluated conditions $\pm$ 2 °C did not influence the results and therefore, of marker content.

In the influence of variations in the flow of the mobile phase on the peak areas, it was observed that the parameter evaluated under the conditions of 0.1 ml into more or less did not influence the results area of the analyte.

In the evaluation of the influence of variations in the pH of the mobile phase on areas of the peaks, it was observed that this parameter in the evaluated conditions $\pm$ 0.1 influenced the results of area of the peak analyte. This variation can be attributed to

ionization problems of the marker molecule, and therefore pH is a parameter to be strictly monitored for the proposed method.

In the statistical analysis, ANOVA was chosen with a 95% of confidence interval due to the biological matrix studied being

complex. Therefore, at a level α of 0.05, there is a significant difference in the robustness dataset, considering that F value is calculated higher than F (Critical) should be necessary evaluated possible variations in the robustness parameter. The results of the robustness evaluation are presented in table 6.

Table 6: 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	
Average concentration ^a (µg/ml)±SD;	125.1±1.4;					
RSD (%)	1.2					
Tested condition	38		1.1		1.5	
Average concentration ^a (µg/ml) ±SD	124.2 ±1.8	125.6±1.3	124.3±4.4	126.1±5.0	114.8±2.3	115.9±0.6
RSD (%)	1.4	1.0	3.5	4.0	2.0	0.5

Note: ^an = 6. SD (Standard deviation) and RSD (Relative standard deviation).

Table 7: Stability assessment of sample extracts solutions

	Concentration of quercetin (µg/ml)	
	T ₀	T ₂₄
Average concentration ^a	115.0±2.23;	114.0±1.92;
(µg/ml)±SD; RSD (%)	1.9	1.7

Note: ^an = 6. SD (Standard deviation) and RSD (Relative standard deviation). T₀ (Sample solution in time zero), T₂₄ (Sample solution after 24 h the time zero).

Evaluation stability

The stability of the sample extract was analyzed at 0 and 24 h after sample preparation. The data showed that the samples in these conditions were stable for at least 24 h. The stability data are plotted in table 7. The sample solution analyzed exhibited values of concentrations of quercetin at 115.0 and 114.0 µg/ml, respectively for the test time. The coefficient of variation of the stability data of the analyte did not exceed 2.0%.

These results are according to the minimal official guides requirements for methods of validating [39] and demonstrate that the developed method can be suitably used for analysis of quercetin in the *A. colubrina* extract samples.

CONCLUSION

In this paper, the analytical method of HPLC-DAD was validated for quantitative determination of quercetin on an extract of *A. colubrina* allowing selective analysis free of interferences. The analytical method proved to be specific, selective, linear, precise, accurate, robust, fast, and reliable. The data obtained suggest that the method can be applied as an appropriate analytical tool in the quality control of herbal medicines obtained from extracts of *A. colubrina*.

ACKNOWLEDGMENT

The authors thanks the National Council of Scientific and Technological Development (CNPq) for project financing, Development Institute in Pharmaceutical Studies (IDEF) for financial support and the Federal University of Paraíba for supporting the infrastructure of laboratories. The authors also thanks to the Prof. Alessandra Vieira Lacerda for her important contribution in the botanical identification of the species studied.

CONFLICT OF INTERESTS

The authors declare no conflict of interest

REFERENCES

- Albuquerque UP, Medeiros PM, Almeida ALS, Monteiro JM, Neto EMFL, Melo JG, et al. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. J Ethnopharmacol 2007;114:325-54.
- Ortolani FA, Melloni MN, Mariotto GCFG, Moro JR. Caracterização citogenética em *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan (Mimosoideae) e *Guazuma ulmifolia* Lam. (Sterculiaceae). Acta Botanica Brasílica 2010;24:299-303.
- Viana ML, Giamminola E, Russo R, Ciaccio M. Morphology and genetics of *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Fabaceae) tree from Salta (Northwestern Argentina). Rev Biol Trop 2014;62:757-63.
- Iacomini M, Jones C, Gorin PAJ, Delgado C. Gum heteropolysaccharide and free reducing mono and oligosaccharides of *Anadenanthera colubrina*. Phytochemistry 1998;47:1207-14.
- Hajdu Z, Hohmann J. An ethnopharmacological survey of the traditional medicine utilized in the community of porvenir, Bajo Paragua Indian Reservation, Bolivia. J Ethnopharmacol 2012;139:838-57.
- Júnior WSF, Ladio AH, Albuquerque UP. Resilience and adaptation in the use of medicinal plants with suspected anti-inflammatory activity in the Brazilian Northeast. J Ethnopharmacol 2011;138:238-52.
- Pessoa WS, Estevão LRM, Simões RS, Barros MEG, Mendonça FS, Evêncio LB, et al. Effects of angico extract (*Anadenanthera colubrina* var. *cebil*) in cutaneous wound healing in rats. Acta Cirúrgica Brasileira 2012;27:655-70.
- Araújo TAS, Alencar NL, Amorim ELC, Albuquerque UP. A new approach to study medicinal plants with tannins and flavonoids contents from the local knowledge. J Ethnopharmacol 2008;120:72-80.
- Moretão MP, Zampronio AR, Gorin PA, Iacomini M, Oliveira MBM. Induction of secretory and tumoricidal activities in peritoneal macrophages activated by an acidic heteropolysaccharide (ARAGAL) from the gum of *Anadenanthera colubrina* (Angico branco). Immunol Lett 2004;93:189-97.
- Moretão MP, Buchi DF, Gorin PA, Iacomini M, Oliveira MBM. Effect of an acidic heteropolysaccharide (ARAGAL) from the gum of *Anadenanthera colubrina* (Angico branco) on peritoneal macrophage functions. Immunol Lett 2003;89:175-85.
- Nogueira C, Dieamant GC, Stasi LCD, Polezel MA, Pereda MCV, Eberlin S. Uso de extrato de angico branco (*Piptadenia colubrina*) em formulações cosméticas e farmacêuticas como agente anti-inflamatório e hidratante para a pele. BR PI0702480-0 A-2; 2009.
- Singh A, Puri D, Kumar B, Singh SK. Heat shock proteins: knowledge so far and its future prospects. Asian J Pharm Clin Res 2016;9:17-24.

13. Oliveira TT, Nagem EQL. Cicatrizante (Biofarmaco) Universidade federal de viçosa, Universidade federal de ouro Preto. BR PI0605952-0A; 2008.
14. Donno D, Mellano MG, Cerutti AK, Beccaro GL. Biomolecules and natural medicine preparations: analysis of new sources of bioactive compounds from *Ribes* and *Rubus* spp. Buds. Pharmaceuticals 2016;9:7.
15. Forim RM, Perlati B, Costa ES, Magnani RF, Souza GD. Concerns and considerations about the quality control of natural products using chromatographic methods. Curr Chromatogr 2015;2:20-31.
16. Migliato KF, Corrêa MA, Salgado HRN, Tognolli JO, Sacramento LVS, Mello JCPD, et al. Planejamento experimental na otimização da extração dos frutos de *Syzygium cumini* (L.) skeels. Quim Nova 2011;34:695-9.
17. Jain HK, Deore 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.
18. Tshibangu PT, Kapepula PM, Kapinga MK, Lupona HK, Ngombe NK, Kalenda DT, et al. Finger printing and validation of a LC-DAD method for the analysis of biflavonones in *Garcinia kola*-based antimalarial improved traditional medicines. J Pharm Biomed Anal 2016;128:382-90.
19. Aparna CH, Madhavi LN, Supriya P, Gowrisankar D. A review on matrix assisted laser desorption/ionization mass spectroscopy. Asian J Pharm Clin Res 2015;8:28-33.
20. Júnior JOCS, Costa RMR, Teixeira FM, Barbosa WLR. Quality control of herbal medicines and related areas. Ed. Yukihiro Shoyama, Intech: Rijeka, Croatia; 2011. p. 63-81.
21. Matamoros V, Calderón-Preciado D, Domínguez C, Bayona JM. Analytical procedures for the determination of emerging organic contaminants in plant material: a review. Anal Chim Acta 2012;722:8-20.
22. Mokhtar M, Russo M, Cacciola F, Donato P, Giuffrida D, Riaz A, et al. Capsaicinoids and carotenoids in *Capsicum annuum* L.: optimization of the extraction method, analytical characterization, and evaluation of its biological properties. Food Anal Methods 2016;9:1381-90.
23. Van Beek TA. Chemical analysis of *Ginkgo biloba* leaves and extracts. J Chromatogr A 2002;967:21-55.
24. LeDoux M. Analytical methods applied to the determination of pesticide residues in foods of animal origin. A review of the past two decades. J Chromatogr A 2011;1218:1021-36.
25. Murugan S, Pravalika N, Sirisha P, Chandrakala K. A review on bioanalytical method development and validation by using LC-MS/MS. Int J Curr Pharm Clin Res 2013;3:13-7.
26. Morzycka B. Simple method for the determination of trace levels of pesticides in honey bees using matrix solid-phase dispersion and gas chromatography. J Chromatogr A 2002;982:267-73.
27. Shi ZQ, Song DF, Li RQ, Yang H, Qi LW, Xin GZ, et al. Identification of effective combinatorial markers for quality standardization of herbal. J Chromatogr A 2011;1345:78-85.
28. Barni ST, Cechinel-Filho V, Couto AG. Caracterização química e tecnológica das folhas, caules e planta inteira da *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br. *Convolvulaceae*, como matéria-prima farmacêutica. Brazilian J Pharmacogn 2009;19:865-70.
29. Dias FS, David JM, David JP. Determination of phenolic acids and quercetin in Brazilian red wines from vale do são francisco region using liquid-liquid ultrasound-assisted extraction and HPLC-DAD-MS. J Braz Chem Soc 2016;27:1055-9.
30. Afonso S, Pisano PL, Silva FB, Scaminio IS, Olivieri AC. Discrimination of *Annona muricata* and *Rollinia mucosa* extracts by using multivariate curve resolution and partial least-squares regression of liquid chromatography-diode array data. J Braz Chem Soc 2015;26:2241-8.
31. Monteiro JM, Souza JSN, Neto EMFL, Scopel K, Trindade EF. Does total tannin content explain the use value of spontaneous medicinal plants from the Brazilian semi-arid region? Rev Bras Farmacogn 2014;24:116-23.
32. Leite VI, Oliveira MCD, Figueiredo JG, Farias PAM, Relison S, Matias EFF, et al. Caracterização química e avaliação da atividade antioxidante, antifúngica e moduladora do extrato etanólico de *Anadenanthera macrocarpa* (BERTH) BRENAN. Rev Cubana Farm 2015;49:719-33.
33. Santana AL, Maranhão CA, Santos JC, Cunha FM, Conceição GM, Bieber LW, et al. Antitermitic activity of extracts from three Brazilian hardwoods against *Nasutitermes corniger*. Int Biodeterior Biodegrad 2010;64:7-12.
34. Holden JM, Bhagwat SA, Haytowitz DB, Gebhardt SE, Dwyer JT, Peterson J, et al. Development of a database of critically evaluated flavonoids data: application of USDA's data quality evaluation system. J Food Compos Anal 2005;18:829-44.
35. Landim LP, Feitoza GS, da Costa JGM. Development and validation of a HPLC method for the quantification of three flavonoids in a crude extract of *Dimorphandra gardneriana*. Rev Bras Farmacogn 2013;23:58-64.
36. Noriega P, Mafud DF, Strasser M, Kato ETM, Bacchi EM. *Passiflora alata* Curtis: a Brazilian medicinal plant. Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat 2011;10:398-413.
37. Valente P, Andrade PB, Areias F, Ferreres F, Seabra RM. Analysis of vervain flavonoids by hplc/diode array detector method. Its application to quality control. J Agric Food Chem 1999;47:4579-82.
38. Vechia CAD, Morais B, Schonnell AP, Diel KAP, Faust C, Menin C, et al. Isolamento químico e validação analítica por cromatografia líquida de alta eficiência de quercitrina em *Solidago chilensis* Meyen (*Asteraceae*). Rev Bras Plant Med 2016;18:288-96.
39. Guideline, ICH Harmonized Tripartite. "Validation of analytical procedures: text and methodology" (Q2 (R1)); 2005. p. 1-17.
40. Chaurasia S, Kulkarni GT, Shetty LN, Pawar VK. Development and validation of UV spectroscopic method for the quick estimation of piper betle leaf (pbl) extract. Int J Curr Pharm Res 2011;3:57-9.
41. Pandey A, Tripathi S. Concept of standardization, extraction and pre phytochemical screening strategies for herbal drug. J Pharmacogn Phytochem 2014;2:115-9.
42. Folashade O, Omoregie H, Ochogu P. Standardization of herbal medicines-a review. Int J Biodivers Conserv 2012;4:101-12.
43. Hasler A, Sticher O, Meier B. Identification and determination of the flavonoids from *Ginkgo biloba* by high-performance liquid chromatography. J Chromatogr A 1992;605:41-8.
44. Wolfender JL. HPLC in natural product analysis: the detection issue. Planta Med 2009;75:719-34.
45. Tsao R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. Nutrients 2010;2:1231-46.
46. Chabariberi RDA, Pozzi A, Zeraik ML, Yariwake JH. Spectrometric determination of flavonoids from *Maytenus* (*Celastraceae*) and *Passiflora* (*Passifloraceae*) leaves and comparison with an HPLC-UV method. Rev Bras Farmacogn 2009;19:860-4.
47. Steinmann D, Ganzera M. Recent advances on HPLC/MS in medicinal plant analysis. J Pharm Biomed Anal 2011;55:744-57.
48. Dai J, Mumper RJ. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. Molecules 2010;15:7313-52.
49. Pellati F, Orlandini G, Pinetti D, Benvenuti S. HPLC-DAD and HPLC-ESI-MS/MS methods for metabolite profiling of propolis extracts. J Pharm Biomed Anal 2011;55:934-48.
50. Paiva SRD, Fontoura LDA, Figueiredo MR, Mazzei JL, Kaplan MAC. Chromatographic profile of two *plumbaginaceae* species: *Plumbago scandens* L. and *Plumbago auriculata* LAM. Quim Nova 2002;25:717-21.
51. Xie Z, Lam S, Wu J, Yang D, Xu X. Chemical fingerprint and simultaneous determination of flavonoids in *Flos Sophorae Immaturus* by HPLC-DAD and HPLC-DAD-ESI-MS/MS combined with chemometrics analysis. Anal Methods 2014;6:4328-35.
52. Spínola V, Llorent-Martínez EJ, Castilho PC. Determination of vitamin C in foods: current state of method validation. J Chromatogr A 2014;1369:2-17.
53. Hsu BY, Lin SW, Inbaraj BS, Chen BH. Simultaneous determination of phenolic acids and flavonoids in *Chenopodium formosanum* Koidz. (djulis) by HPLC-DAD-ESI-MS/MS. J Pharm Biomed Anal 2017;132:109-16.
54. Saptarini NYIM, Herawati IRMAE, Permatasari ULIIY. Total flavonoids content in acidified extract of flowers and leaves of

- gardenia (*Gardenia jasminoides ellis*) Asian J Pharm Clin Res 2016;9:213-5.
55. Schieber A, Keller P, Carle R. Determination of phenolic acids and flavonoids of apple and pear by high-performance liquid chromatography. J Chromatogr A 2001;910:265-73.
 56. Pradeepa M, Kalidas V, Geetha N. Qualitative and quantitative phytochemical analysis and bactericidal activity of pelargonium graveolens l'her. Int J Appl Pharm 2016;8:7-11.
 57. Amorim MR, Rinaldo D, do Amaral FP, Vilegas W, Magenta MAG, Junior GMV, et al. HPLC-DAD based method for the quantification of flavonoids in the hydroethanolic extract of *Tonina fluviatilis* Aubl. (Eriocaulaceae) and their radical scavenging activity. Quim Nova 2014;37:1122-7.
 58. Steinmann D, Ganzera M. Recent advances on HPLC/MS in medicinal plant analysis. J Pharm Biomed Anal 2011;55:744-57.
 59. Chabariberi RDA, Pozzi A, Zeraik ML, Yariwake JH. Spectrometric determination of flavonoids from *Maytenus* (Celastraceae) and *Passiflora* (Passifloraceae) leaves and comparison with an HPLC-UV method. Rev Bras Farmacogn 2009;19:860-4.
 60. Tsao R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. Nutrients 2010;2:1231-46.
 61. Dias ALDS, Souza JNSD, Rogez H. Purification of phenolic compounds from *Inga edulis* leaves using solid-phase extraction: major compounds quantification and antioxidant capacity evaluation. Quim Nova 2010;33:38-42.
 62. Timóteo P, Karioti A, Leitão SG, Vincieri FF, Bília AR. A validated HPLC method for the analysis of herbal teas from three chemotypes of Brazilian *Lippia alba*. Food Chem 2015;175:366-73.
 63. Skalicka-Woźniak K, Szympowski J, Głowniak K. HPLC analysis of kaempferol and quercetin derivatives isolated by different extraction techniques from plant matrix. J AOAC Int 2011;94:17-21.
 64. Lee JY, Lee MS, Choi JW, Shin TS, Woo HC, Kim HR. Dichloromethane fraction of *Laminaria japonica* ethanolic extract inhibits lipopolysaccharide-induced nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression in RAW 264.7 cells via NF-κB pathway. Inflammation 2012;35:1650-8.
 65. Mutheeswaran S, Kumar PS, Yuvaraj P, Duraipandian V, Al-Dhabi NA, Balakrishna K, et al. Screening of some medicinal plants for anticarcinogenic activity: an investigation on bioactive constituents from *Jatropha gossypifolia* (L.) root. Biocatal Agric Biotechnol 2017;10:161-6.
 66. Lu YH, Liu ZY, Wang ZT, Wei DZ. Quality evaluation of *Platycladus orientalis* (L.) Franco through simultaneous determination of four bioactive flavonoids by high-performance liquid chromatography. J Pharm Biomed Anal 2006;41:1186-90.
 67. Mattonai M, Parri E, Querci D, Degano I, Ribechini E. Development and validation of an HPLC-DAD and HPLC/ESI-MS 2 method for the determination of polyphenols in monofloral honeys from Tuscany (Italy). Microchem J 2016;126:220-9.
 68. Blainski A, Antonelli-Ushirobira TM, Godoy G, Leite-Mello EV, Mello JC. Pharmacognostic evaluation, and development and validation of a HPLC-DAD technique for gallic acid and epigallocatechin in rhizomes from *Limonium brasiliense*. Rev Bras Farmacogn 2017;27:162-9.
 69. Escarpa A, González MC. Approach to the content of total extractable phenolic compounds from different food samples by comparison of chromatographic and spectrophotometric methods. Anal Chim Acta 2001;427:119-27.
 70. Mattila P, Astola J, Kumpulainen J. Determination of flavonoids in plant material by HPLC with diode-array and electro-array detections. J Agric Food Chem 2000;48:5834-41.
 71. Escarpa A, González MC. Evaluation of high-performance liquid chromatography for determination of phenolic compounds in pear horticultural cultivars. Chromatographia 2000;51:37-43.
 72. Tang D, Yang D, Tang A, Gao Y, Jiang X, Mou J, et al. Simultaneous chemical fingerprint and quantitative analysis of ginkgo biloba extract by HPLC-DAD. Anal Bioanal Chem 2010;396:3087-95.

How to cite this article

- Valmir Gomes De Souza, Fabrício Havy Dantas De Andrade, Fabio Santos De Souza, Rui Oliveira Macedo. Analytical method by HPLC-dad allows quantification of quercetin marker in standardized extract of *Anadenanthera colubrina* var. *cebil*. Int J Pharm Pharm Sci 2017;9(8):47-55.

Apêndice B - Artigo científico submetido no periódico Planta Médica

13/02/2018 ScholarOne Manuscripts

 **Planta Medica**

[Home](#)

[Author](#)

Submission Confirmation [Print](#)

Thank you for your submission

Submitted to
Planta Medica

Manuscript ID
PLAMED-2018-02-0123-OP

Title
Evaluation and characterization of extractive process parameters on standardization of extracts's
Anadenanthera colubrina (Vell) Brenan var. *cebill* (Griseb.) Aitischul

Authors
SOUZA, VALMIR
Dantas de Andrade, Fabricio
Oliveira, Agna
Lette, Renata
Salvador, Isaline
Junior, Jose
Souza, Fábio
Macedo, Rui

Date Submitted
13-Feb-2018

Author Dashboard

Manuscript submitted to editorial office



**Evaluation and characterization of extractive process
parameters on standardization of extracts's *Anadenanthera*
colubrina (Vell) Brenan var. *cebil* (Griseb.) Altschul**

Journal:	<i>Planta Medica</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Original Papers
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	SOUZA, VALMIR; Universidade Federal da Paraiba, Pharmacy Dantas de Andrade, Fabricio; University of Paraiba, Oliveira, Aqna ; Universidade Federal da Paraiba Leite, Renata Salvador, Islaine; Universidade Federal da Paraiba Junior, Jose; Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Pharmacy Souza, Fábio; University of Paraíba, Macedo, Rui; Universidade Federal da Paraiba
Keywords:	<i>Anadenanthera colubrina</i> , standardization, Fabaceae, characterization, fluid extract

SCHOLARONE™
Manuscripts

Evaluation and characterization of extractive process parameters on standardization of extracts's
Anadenanthera colubrina (Vell) Brenan var. *cebil* (Griseb.) Altschul

Valmir Gomes de Souza¹; Fabricio Havy Dantas de Andrade²; Agna Hélia de Oliveira¹, Renata da Silva leite¹,
Islaine de Souza Salvador¹, José Venâncio Chaves Júnior³, Fabio Santos de Souza^{1, 2}; Rui Oliveira Macedo^{1,2}

Affiliation

¹Department of Pharmaceutical Sciences, Laboratory of Quality Control of Pharmaceutical Products, Federal
University of Paraíba, João Pessoa, PB, Brazil

²Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pernambuco, Recife-PE, Brazil.

³Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal-RN, Brazil.

Correspondence

Dr. Valmir Gomes de Souza, Laboratório de Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos-Departamento de
Ciências Farmacêuticas- Centro de Ciências da Saúde-Universidade Federal da Paraíba (UFPB)- João Pessoa, PB, Brazil
Zip 58059-900, E-mail: valmirfarmaceutico@gmail.com Phone: +55-83-3216 7694

Introduction

The use of medicinal plants dates from 2600 years BC in the civilizations of Egypt and Mesopotamia, where they were already used as therapeutic resources, *Cedrus* sp. (cedar), *Glycyrrhiza glabra* (licorice) and *Papaver somniferum* (poppy), and even today the same plants are used in traditional medicine to treat colds, parasitic diseases and inflammation [1-3].

The *Anadenanthera colubrina* (Vell) Brenan var. *cebil* (Griseb.) Altschul is a species of the Fabaceae family, from subtropical regions, native to the caatinga, is a Brazilian flora plant, native of the caatinga, popularly known as angico, found in the northeast and southeast of Brazil. It is popularly used in the form of tincture, with properties aseptic, depurative and hemostatic [4-5].

Phytochemical analyzes of *Anadenanthera colubrina* extracts presents in their composition the following secondary metabolites: alkaloids, steroids flavonoids, triterpenoids, phenolic compounds. The stem bark is rich in tannins, that exhibit anti-inflammatory, antioxidant and antimicrobial action [6-8].

Among the main studies carried out to development of herbal drug, we can mention: bibliographical review of the species, botanical studies, agronomic studies, phytochemical studies, pharmacological studies, toxicological studies and technological development studies [9-11].

According to the resolution of ANVISA, RDC No. 26, May 13, 2014, phytotherapeutic is a manufactured product, exclusively containing plant active raw materials. The herbal medicine product demonstrates their safety and efficacy across per clinical data, following all the steps of a clinical research protocol, as well as the characterization of the constancy of its quality [5].

Despite the advances in the regulatory field in the herbal products and phytotherapy segment, the characterization of quality constancy is still the biggest challenge [12].

On the standardization of a phytotherapeutic product, one must consider since the cultivation of the medicinal plant, as well, as the several processes that the vegetal drug go through during the harvest and post-harvest, like drying, stabilization, milling and extraction. Control parameters and technical specifications must be attributed to both the processes and finished product. The reproducibility of the phytochemical profile, of concentration of the marker (s), of physicochemical characteristics and other parameters previously established among the production batches, will confirm the standardization and intended therapeutic effect [13-15].

The main variables influencing the phytochemical composition and the efficiency of the extractive process are: type of extractive technique, origin of the plant material, part of the plant used, particle size of the plant drug, extraction time, type of solvent used, solvent polarity and solvent concentration [16].

Introduction

The use of medicinal plants dates from 2600 years BC in the civilizations of Egypt and Mesopotamia, where they were already used as therapeutic resources, *Cedrus* sp. (cedar), *Glycyrrhiza glabra* (licorice) and *Papaver somniferum* (poppy), and even today the same plants are used in traditional medicine to treat colds, parasitic diseases and inflammation [1-3].

The *Anadenanthera colubrina* (Vell) Brenan var. *cebil* (Griseb.) Altschul is a species of the Fabaceae family, from subtropical regions, native to the caatinga, is a Brazilian flora plant, native of the caatinga, popularly known as angico, found in the northeast and southeast of Brazil. It is popularly used in the form of tincture, with properties aseptic, depurative and hemostatic [4-5].

Phytochemical analyzes of *Anadenanthera colubrina* extracts presents in their composition the following secondary metabolites: alkaloids, steroids flavonoids, triterpenoids, phenolic compounds. The stem bark is rich in tannins, that exhibit anti-inflammatory, antioxidant and antimicrobial action [6-8].

Among the main studies carried out to development of herbal drug, we can mention: bibliographical review of the species, botanical studies, agronomic studies, phytochemical studies, pharmacological studies, toxicological studies and technological development studies [9-11].

According to the resolution of ANVISA, RDC No. 26, May 13, 2014, phytotherapeutic is a manufactured product, exclusively containing plant active raw materials. The herbal medicine product demonstrates their safety and efficacy across per clinical data, following all the steps of a clinical research protocol, as well as the characterization of the constancy of its quality [5].

Despite the advances in the regulatory field in the herbal products and phytotherapy segment, the characterization of quality constancy is still the biggest challenge [12].

On the standardization of a phytotherapeutic product, one must consider since the cultivation of the medicinal plant, as well, as the several processes that the vegetal drug go through during the harvest and post-harvest, like drying, stabilization, milling and extraction. Control parameters and technical specifications must be attributed to both the processes and finished product. The reproducibility of the phytochemical profile, of concentration of the marker (s), of physicochemical characteristics and other parameters previously established among the production batches, will confirm the standardization and intended therapeutic effect [13-15].

The main variables influencing the phytochemical composition and the efficiency of the extractive process are: type of extractive technique, origin of the plant material, part of the plant used, particle size of the plant drug, extraction time, type of solvent used, solvent polarity and solvent concentration [16].

The reduction of the particle size of the vegetable drug can contribute to increase the extraction efficiency, due to the increase of the surface area of the drug and consequent greater mass exchange between the phases (List; Schmidt, 1984). The curtailment of the particle size of the vegetable drug followed by granulometric analysis is an important preliminary analysis for the choice of the extractive process and the appropriate solvent system, since the particle size directly influences the extraction efficiency [17].

Chromatographic techniques such as high-performance liquid chromatography (HPLC), gas chromatography (GC) and spectroscopic techniques such as infrared (IR), nuclear magnetic resonance (NMR) and ultraviolet (UV) are commonly used for separations and identification of secondary metabolites of plant extracts, as well as to obtain the fingerprints of these products [18, 12].

The aims of this work were to perform the standardization of the fluid extract through the characterization of the granulometric distribution of the powders of the vegetable drug of *Anadenanthera colubrina* and investigate the influence of solvent system and particle size on the extraction process. The extraction efficiency was determined in terms quercetin marker concentration, analyzed by HPLC-DAD.

Results and discussion

Evaluation of particle size distribution

The granulometry of the powders of a vegetable drug is an important determination, since it allows to characterize the distribution of the particle size of the powders and to correlate this granulometry with the extraction efficiency of the solvent systems [19-20].

Powders with different densities and very small particle size may promote compaction of the material, resulting in low interaction with the solvent system and therefore lower extraction efficiency, however, material with large particle size can result in a powder with lower surface area and consequently low extraction efficiency [21-22].

In the determination of the particle size of *A. colubrina*, procedures were performed with 250 g sample in the range 16 mesh (1190 μm) and 200 mesh (74 μm) sieves arranged on a self-vibrating platform for granulometric separation process. The results were expressed as mean percentage mass in triplicates procedures and then calculated according to equation 01 described in methodology.

As shown in the histogram (Fig. 1), the powders of the herbal drug have normal distribution behavior, with 39.7% of the mass retained in the mesh 20, corresponding to the range of particle size between 999 μm and 841 μm .

The Brazilian pharmacopoeia, in its 5th edition, has a classification system for powders, where powders are classified into coarse powder, moderately thick, semi-fine powder, fine powder and fine powder [23].

It should be emphasized that the degree of division of the vegetal powder depends on several aspects, such as: part of the plant used (leaf, fruits, flowers, stem, roots), type of mill used in the process (hammer, knives), number of steps grinding or reprocessing of the material and that these aspects need to be taken into account on the characterization of plant drug powders [24].

Particle size analysis of the aerial parts of *Phyllanthus tenellus* (stone breaking) presented a percentage mass of 74.42% with a particle size of less than 300.0 μm . The particle size analysis of *Eugenia uniflora* L. (pitangueira) leaf powders presented 57.63% of the mass below the 300.0 μm dimension. The granulometric distribution of the shell of the *Myrciaria cauliflora* fruit (jabuticaba) presented 57.66% of the retained percentage in the range of 355.0 μm to 710.0 μm and was classified as moderately thick powder [25-26].

In the present work, the vegetable powder produced from the leaves of *A. colubrina* presented more 68.2% of total mass distributed in the range between 500.0 μm and 999.0 μm . According to the Brazilian pharmacopoeia, in its 5th edition, the powder of the vegetable drug in *A. colubrina* study is described as coarse powder, because it is characterized by passing through its entirety by the tamis with a nominal mesh aperture of 1.70 mm and maximum of 40% by the sieve with a nominal mesh aperture of 355 μm .

Evaluation of the extractive process of maceration

To guarantee the production of a standardized extract, it is necessary to characterize this raw material through spectral and chromatographic techniques, identifying and quantifying chemical markers, evaluating the reproducibility between batch production and evaluating the parameters that influence the extraction process [18]. Therefore, evaluating the extraction efficiency and knowing all the variables influencing the process is of fundamental importance [27].

Among the main extractive techniques used for plant drugs are: maceration, percolation, infusion, decoction, continuous hot extraction (soxlet), ultrasonic assisted extraction, fluidized bed, supercritical fluid and turbolysis. chemical nature of the constituents to be obtained, polarity of the solvents and proportion or mixture of solvents [28].

In this work, the cold maceration process was chosen because of the scalability of the process and the available infrastructure. The solvent system used in the maceration of *A. colubrina* consisted of ethanol and water mixture with 20% (m/v) and it was evaluated which proportion of alcohol content in the extractive system showed a better extraction efficiency. The macerates were prepared in the proportions 30:70% (v/v), 50:50%

(v/v) and 70:30% (v/v) with triplicate procedures and the extractive efficiency was determined in terms of quercetin concentration, quantified by HPLC-DAD.

As shown in Table 1, the proportions of the solvent system that presented the highest extractive capacity for the quercetin marker were the proportions of alcohol at 50 and 70%, with no statistically significant difference between the two systems. The proportion 50% was defined as working condition, due to the lower organic solvent content besides presenting lower cost. The solvent system containing 50% ethanol had quercetin equivalent to 122.2 $\mu\text{g} / \text{mL}$ with a variation of 3.9% (CV) for triplicate procedures.

A study evaluating different extractive techniques (ultrasound, turbolysis, maceration, decoction, infusion and soxlet) and proportions of alcohol content at 92.8% and 70% (v / v), by quantification of active constituents of *Dicksonia sellowiana* (xaxim), showed that the decoction and turbolysis techniques with 70% (v / v) alcohol content were more efficient than the other techniques evaluated [14].

In the standardization of the extraction technology of hydroalcoholic extracts from *Myrciaria cauliflora* (jaboticaba) fruits bark, the hot extraction by reflux, ultrasonic assisted extraction and percolation extraction were investigated through the quantification of total phenols. According to this study, percolation showed better extraction efficiency (8.75 mg / mL), followed by hot reflux extraction (0.16 mg / mL) and ultrasonic assisted extraction (0.07 mg / mL) in terms of total phenols contents [26].

A study evaluating flavonoid extraction parameters in *Verbena minutiflora* (gervão), investigated the influence of the 20%, 50% and 80% alcohol content in the extractive process through the antioxidant activity of the extract, demonstrating that the proportion 50% of alcohol presents better extractive efficiency of flavonoids and consequent better antioxidant activity [29].

Evaluation of the influence of particle size on the extractive process

According to the literature, the particle size distribution directly influences the extractive process, and a plant drug with a very high or low particle size can negatively influence the extractive efficiency of the solvent system used [19, 30].

With this understanding, with the definition of the conditions of proportion of established solvent system, three macerated were prepared from the ground vegetable drug powder that passed through the granulometric evaluation. The fluid extracts obtained with the plant drug, without particle size separation were analyzed by HPLC-DAD, which quantified the quercetin, presenting mean concentrations of 125.5 $\mu\text{g/mL}$.

The evaluation of the influence of particle size on the efficiency of the extraction process was investigated in the particle size range between 355 and 74 μm (mesh of 42 to 200 mesh) by quantifying the quercetin marker

analyzed by HPLC-DAD. According to the data plotted in Table 2, as the particle size is reduced, there is an increase in the extraction efficiency of quercetin at the particle size range evaluated.

The data show that the grinding directly influence the extraction process, due to the variation in the distribution of the granulometric bands of the powders, being observed a low yield in obtaining powders below 250 μm , in which we observed a significant increase of the extrusion efficiency based on the marker.

Zaitter and colleagues [31], when assessing the influence of particle size in the 20 to 500 μm range of *Camellia sinensis* powder on polyphenols content and antioxidant activity, found that the activity and content of constituents were influenced by particle size, and the best results were found with particle sizes of 100 and 180 μm .

Chromatographic analyzes of *A. colubrina* extracts of different granulometries, shown in Fig. 2, show that macerates produced with smaller particle size resulted in an increase in the extractive efficiency and conservation of the chemical nature of the constituents of the extracts. This conservation of the chemical nature of the constituents can be evidenced in the similarity of the chromatographic profiles of the different particle sizes and the increase of the extractive efficiency that can be visualized with increase in the flavonoid peak of the quercetin chromatographic peak.

Determination of dry residue in fluid extracts

After to check the best extraction system, three macerates were prepared with a 20% (mass: volume) plant drug ratio and 50: 50% hydroalcoholic solvent system. The average dry residue obtained for the three macerated was 6%.

Materials and Methods

Chemicals and materials

Ethanol absolute grade (Toscano[®] Brazil), methanol grade HPLC (Tedia[®] Brazil) anhydrous phosphoric acid (Merck[®] Germany) were used. The standards substance quercetin with purity of 97% (Sigma-Aldrich[®] Brazil).

Herbal material

The leaves of *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (*A. colubrina*) were collected from micro region of cariri in the state of Paraíba in May 2015. The research project agreed of requirements of the Ministry of Environment of Brazil (ICMBio\SISBio\MMA-Brazil) for activities with scientific purpose n° 41277-2. The exsiccate of the plant species was deposited in the herbarium Lauro Pires Xavier, UFPB Joao Pessoa, Brazil, under registration NC262.

Particle-size distribution

The Brazilian pharmacopoeia [23] classifies the powders in specific particle size ranges as described: coarse powder, moderately thick, semi-fine powder, fine powder and finest powder. In the evaluation of particle-size distribution was used a system of self-vibrating sieves with meshes between 16 and 200 mesh (1190 and 74 µm). The calculation of the percentage retained in each meshes was determined according to the equation:

$$\% \text{ Mass} = \frac{M1}{M2} \times 100 \text{ (1)}$$

At where:

M1 = Mass of powder retained

M2 = Sum of masses retained in all meshes.

With the mass data retained in each mesh, the granulometric distribution was determined in the range 74 and 1190 µm, and so it was possible to classify the vegetable powder according to the classification system of the Brazilian pharmacopoeia.

Evaluation of the extractive process of maceration

The extraction technique used to produce the fluid extract was the cold maceration with the proportion of 20% mass: volume (m: v) of herbal drug milled, on the solvent system composed of ethanol: water for 5 days, protected of the light. In this work the proportions of the solvent system were 30: 70%, 50: 50%, 70: 30% volume: volume (v: v) were evaluated, being chosen the system with greater extraction efficiency. The

efficiency extractive was measured by the quantification of quercetin content in the fluid extract through a previously methodology validated [32].

Evaluation of the influence of particle size on the extractive process

The influence of particle size on the extraction process of phytoconstituents with the particle size in the range 355 and 74 μm was investigated. This range was chosen to evaluate the extraction process because it presents material with greater surface area. The extraction efficiency was measured by the concentration of quercetin marker in the fluid extract for each range of particle size.

Determination of dry residue in fluid extracts

The determination of dry residue of fluid extract of *A. colubrina* was as described in item 5.4.3.2.3 of Brazilian pharmacopoeia, volume I. Calculation of the dry residue was expressed as a percentage of the mass.

Chromatographic conditions

A high-performance liquid chromatography system coupled diode arrangement detector (HPLC-DAD) was used, (SHIMADZU® Japan); software LC Solutions®. The chromatography system is composed by the modules: pump 20AT, degasser DGU 20A5, interface CBM 20A auto injector SIL 20A, SPD detector M20A, oven CTO 20A. The system control was performed by LC Solutions® software. The elution system was carried out an isocratic system (47: 53%) methanol: phosphoric acid 1%. The system of stationary phase was composed by column C-18 octadecylsilane Gemini nx (5 μm) 150 x 4.6mm x 0.5 μm (Phenomenex®); Pre-column Gemini C-18 4 x 3.0mm (Phenomenex®). Flow of the mobile phase was carried out with 1.2 mL/ min; Oven temperature at 40°C; the wave-length number 370nm; injection volume 20 μL ; chromatographic run time of 30 minutes.

Quantification of marker quercetin in fluid extract

A pretreatment of the fluid extract samples was performed to ensure total extraction of the marker, cleaning of possible interferents from the complex matrix and then analyzed by HPLC-DAD, according to the methodology validated (Souza et al., 2017). The extracts of *A. colubrina* were prepared in triplicate and it was noted their respective solid residues. After pretreatment of the samples, the quercetin concentrations in the fluid extract were analyzed by HPLC-DAD.

Statistical analysis

The experimental data were analyzed with the aid of the Statistica® 13.2 software program (Dell Inc., Tulsa, USA). The results were expressed as average standard deviation ($\pm\text{SD}$) and relative standard deviation ($\pm\text{RSD}$). Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$ and larger values were not considered.

Acknowledgements

The authors thanks to the National Council of Scientific and Technological Development (CNPq) for project financing, Development Institute in Pharmaceutical Studies (IDEF) for financial support and the Federal University of Paraíba for supporting the infrastructure of laboratories. The authors also thanks to the Prof. Alessandra Vieira Lacerda for her important contribution in the botanical identification of the specie studied.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interests.

Reference

- [1] França ISXD, Souza JA, Baptista RS, Britto VRDS. Popular medicine: benefits and harms of medicinal plants. Rev. Bras. Enf. 2008; 61: 2.
- [2] Leite JPV. Phytotherapy: scientific and technological bases. Atheneu, 2009.
- [3] Pessoa WS, Estevão LRDM, Simões RS, Barros MEGD, Mendonça FDS, Baratella-Evêncio L, Evêncio-Neto J. Effects of angico extract (*Anadenanthera colubrina* var. *cebil*) in cutaneous wound healing in rats. Acta Cir. Bras 2012; 27: 655-670.
- [4] Souza-Moreira TM, Salgado HRN, Pietro RC. O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. Revista Brasileira de Farmacognosia 2010; 435-440.
- [5] BRASIL. RDC nº 26, de 13 de maio de 2014. Provides for the registration of herbal medicines and the registration and notification of traditional herbal products. ANVISA National Health Surveillance Agency.
- [6] CUNHA VDS. Evaluation of the in vitro effect of the hydroalcoholic extract of *Anadenanthera colubrina* (VELLOZO) Brenan frente à *Candida albicans*. 2015. Masters dissertation.
- [7] Lopes GC, Longhini R, Dos Santos PVP, Araújo AA, Bruschi ML, De Mello JCP. Preliminary assessment of the chemical stability of dried extracts from *Guazuma ulmifolia* Lam.(Sterculiaceae). International Journal of Analytical Chemistry 2012.
- [8] Weber-Sobrinho CR. Determination of the antimicrobial and cytotoxic activity of extracts of the stem bark of *Anadenanthera colubrina* (Vell.). 2010. Masters dissertation.
- [9] Salvador IDS, leite RDS, Souza VG, Andrade FHD, Batista RSA, Souza FS, Macedo RO. The Study of the Acute and Sub-Acute Oral Toxicities of the Nebulized Extract of *Myracrodruon Urundeuva Allemão* in Rabbits. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science 2017; v. 9: 154-160.
- [10] Cordell GA, Colvard MD. Natural products and traditional medicine: turning on a paradigm. Journal of natural products 2012; 75: 514-525.
- [11] López CAA. General considerations on medicinal plants. Environment: Management and Development 2006; 1:19-27.
- [12] Landim LP, Feitoza GS, DA Costa JGM. Development and validation of a HPLC method for the quantification of three flavonoids in a crude extract of *Dimorphandra gardneriana*. Revista Brasileira de Farmacognosia 2013; 23: 58-64.
- [13] Coelho JÁ. In vitro evaluation of the antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of organic extracts of the bark of the fruit jabuticaba (*Myrciaria cauliflora* Berg). Masters dissertation 2017.
- [14] Oliveira ACD, Ropke C. The ten years of the National Policy of Medicinal Plants and Phytotherapies (PNPMF) and the main obstacles in the productive chain of plant extracts and herbal medicines in Brazil. Revista Fitos Eletrônica 2016; 10: 185-198.

- [15] Bassani VL, Gonz  les OG, Petrovick PR. Technological development of herbal products. *Revista Fitos Eletrônica* 2013; 1: 14-17.
- [16] Pandey A, Tripathi S. Concept of standardization, extraction and pre- phytochemical screening strategies for herbal drug. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 2014; 2: 5
- [17] Araruna SM. Development and standardization (HPLC-DAD) and pre-clinical evaluation of dry extract by spray dryer of *Amburana cearensis* AC Smith (CUMARU). [PhD thesis]. 2013.
- [18] Folashade O, Omoregie H, Ochogu P. Standardization of herbal medicines-A review. *International Journal of Biodiversity and Conservation* 2012; 4: 101-112.
- [19] P  rtille, R. Isolation and structural elucidation of polar compounds of *Lippia alba* (Miller) NE Brown Ex Britt. & Wils. Masters dissertation 2007.
- [20] LIST, Paul Heinz; SCHMIDT, Peter C. *Phytopharmaceutical technology*. CRC Press, 1989.
- [21] Florence AT, Attwood D. *Physicochemical principles of pharmacy: In manufacture, formulation and clinical use*. pharmaceutical press, 2015.
- [22] Yella A, Heiniger LP, Gao P, Nazeeruddin MK, Gr  tzel M. Nanocrystalline rutile electron extraction layer enables low-temperature solution processed perovskite photovoltaics with 13.7% efficiency. *Nano letters* 2014; 14: 2591-2596.
- [23] BRAZIL. Ministry of Health, National Health Surveillance Agency. *Pharmacopoeia of Brazilian* 5th edition, Brasília DF, 2010.
- [24] Karam MC, Petit J, Zimmer D, Djantou EB, Scher J. Effects of drying and grinding in production of fruit and vegetable powders: A review. *Journal of Food Engineering* 2016; 188: 32-49.
- [25] Sandini TM, Rodrigues NM, Peloi KE, Perez E. Avalia  o farmacognóstica de *Phyllanthus tenellus* Roxb., Euphorbiaceae (Quebra-Pedra) coletadas em Rancho Alegre D'Oeste, Paraná. *Biosaúde* 2016; 13: 1-11.
- [26] Borges LL. Standardized products in phenolic compounds obtained from agroindustrial residues from the shells of *Myrciaria cauliflora* fruits (Mart.) O. Berg. 2015.
- [27] Pivotto LJ, Cardoso CRP. Qualidade e obten  o do extrato de *Astronium fraxinifolium* Schott, espécie do cerrado com potencial antibacteriano. *Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences* 2015; 36: 2.
- [28] Bampouli A, Kyriakopoulou K, Papaefstathiou G, Louli V, Krokida M, Magoulas K. Comparison of different extraction methods of *Pistacia lentiscus* var. chia leaves: Yield, antioxidant activity and essential oil chemical composition. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants* 2014; 1: 81-91.
- [29] Peloi K, Bovo F, Messias-Reason IJ, Perez E. Use of factorial design for the determination of antioxidant capacity and assay of total flavonoids in *Verbena minutiflora* Briq. ex Moldenke (gervai). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* 2016; 18: 1-8.
- [30] Sonaglio D, Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP. Technological development and production of herbal medicines. 2003 p. 289-326

- 1
2
3 [31] Zaiter A, Becker L, Karam MC, Dicko A. Effect of particle size on antioxidant activity and catechin
4 content of green tea powders. *Journal of Food Science and Technology* 2016; 53: 2025-2032.
5
6 [32] Souza VG, Andrade FHDD, Souza FS, Macedo RO. Analytical method by HPLC-DAD allows
7 quantification of quercetin marker in standardized extract of *Anadenanthera colubrina* var. *cebil*. *Int J Pharm*
8 *Pharm Sci* 2017; 9:47-55.
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 **Figure Legends**

4
5 **Fig. 1** Distribution of particle size of *A. colubrine* powder

6
7 **Fig. 2** Chromatographic profile of extracts produced from different particle sizes

Fig. 1

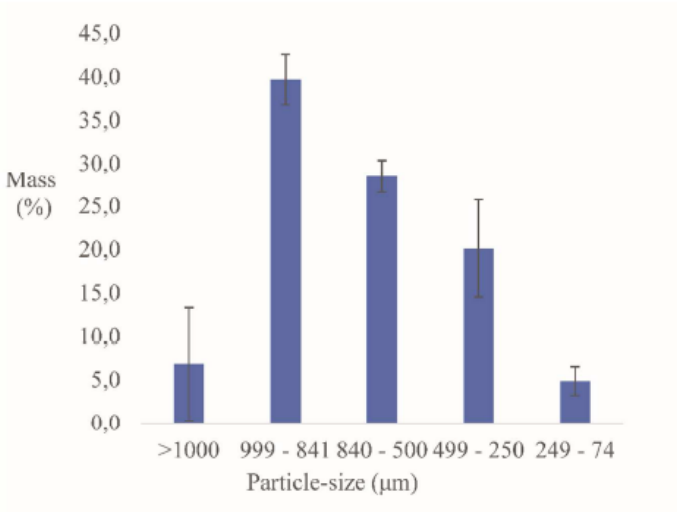
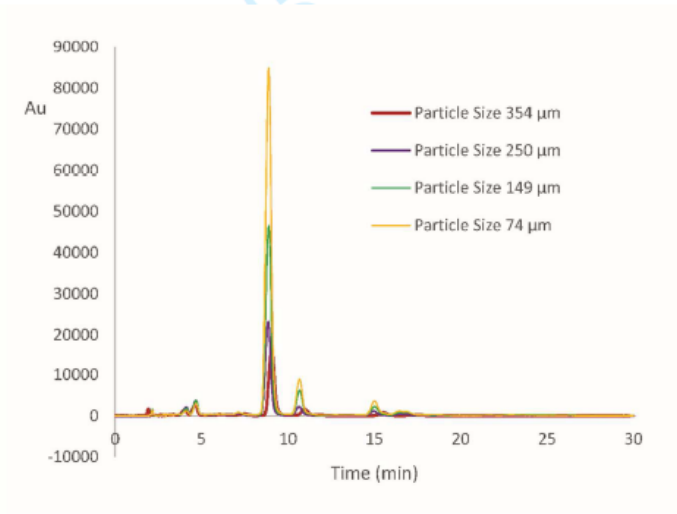


Fig. 2



Tables / Legends

Table 1: Efficiency of the solvent system in the extractive process of vegetable drug

Ethanol : Water	Marker concentration quercetin ($\mu\text{g/mL}$) $\pm$ SD	SDR (%)
70%	124.2 ± 5.2	4.2
50%	122.5 ± 4.8	3.9
30%	73.7 ± 1.7	2.3

note: N (3); mass of the drug vegetable: solvent system: ethanol: water (200g/1000mL)

Table 2: Influence of the particle size of the vegetable drug on the extractive process

Particle size		Quercetin concentration	SDR
Mesh	(μm)	($\mu\text{g/ mL}$) $\pm$ SD	(%)
42	355	61.4 ± 1.9	3.1
60	250	83.0 ± 1.9	2.3
100	149	164.7 ± 6.5	3.9
200	<74	305.1 ± 10.0	3.2

note: Mean and deviations obtained for data with n = 6.

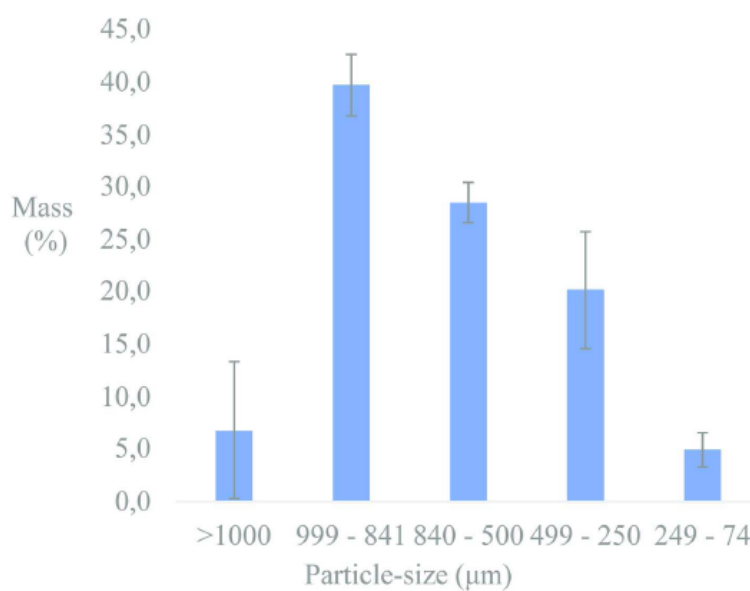


Fig. 1 Distribution of particle size of *A. colubrine* powder

90x67mm (600 x 600 DPI)

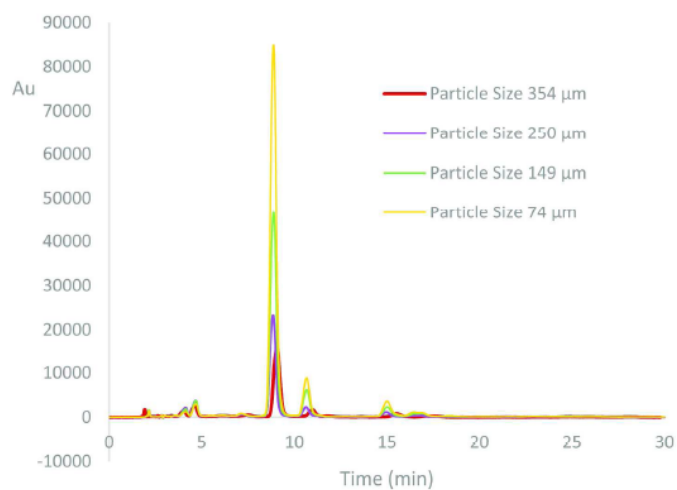


Fig. 2 Chromatographic profile of extracts produced from different particle sizes

90x67mm (600 x 600 DPI)