



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS

Renata da Silva Leite

**ESTUDOS TECNOLÓGICOS APLICADOS À  
PADRONIZAÇÃO DE EXTRATOS SECOS DE**  
*Myracrodruon urundeuva* Allemão

Recife, 2017

Renata da Silva Leite

**ESTUDOS TECNOLÓGICOS APLICADOS À  
PADRONIZAÇÃO DE EXTRATOS SECOS DE *Myracrodruon  
urundeuva* Allemão**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, em cumprimento às exigências para obtenção do grau de Doutor em Ciências Farmacêutica na Área de Concentração: Produção e Controle de Qualidade de Medicamentos.

**Orientador:** Prof. Dr. Fábio Santos de Souza

**Co-orientador:** Prof. Dr. Rui Oliveira Macedo

Recife, 2017

Catálogo na fonte

Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

L533e Leite, Renata da Silva.  
Estudos tecnológicos aplicados à padronização de extratos secos de  
Myracrodruon urundeuva Allemão / Renata da Silva Leite. – 2017.  
110 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientador: Fábio Santos de Souza.  
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2017.  
Inclui referências e apêndices.

1. Anacardiaceae. 2. Extratos vegetais. 3. Quercetina. I. Souza, Fábio Santos de (Orientador). II. Título.

615.3 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2017-074)

**Renata da Silva Leite**

**ESTUDOS TECNOLÓGICOS APLICADOS À PADRONIZAÇÃO  
DE EXTRATOS SECOS DE *Myracrodruon urundeuva* Allemão**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, em cumprimento às exigências para obtenção do grau de Doutor em Ciências Farmacêutica.

Aprovada em: 23 de fevereiro de 2017

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Fábio Santos de Souza (Presidente e Orientador)  
Universidade Federal da Paraíba

---

Prof. Dra Beate Saegesser Santos (Avaliador Interno)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof. Dr. Cícero Flávio Soares Aragão (Avaliador Externo)  
Universidade Federal do Rio Grande do Norte

---

Prof. Dra. Ana Paula Barreto Gomes (Avaliador Externo)  
Universidade Federal do Rio Grande do Norte

---

Prof. Dr. Hemerson Yuri Ferreira Magalhães (Avaliador Externo)  
Universidade Federal da Paraíba

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**

**REITOR**

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

**VICE-REITOR**

Prof<sup>a</sup> Florisbela de Arruda Camara e Siqueira Campos

**PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

Prof. Ernani Rodrigues de Carvalho Neto

**DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Prof. Nicodemos Teles de Pontes Filho

**VICE-DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Profa. Dra. Vânia Pinheiros Ramos

**CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Antônio Rodolfo de Faria

**VICE-CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Prof. Dra. Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley

**VICE-COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Prof. Rafael Matos Ximenes

Recife, 2017

## **DEDICATÓRIA**

À Deus e a Maria Santíssima,  
Aos meus pais Reginaldo e Maria do Socorro,  
Aos meus irmãos Rômulo e Ruana.  
Aos meus familiares e amigos.

*Dedico.*

## AGRADECIMENTOS

À **Deus** em primeiro lugar sempre, pelo seu amor infinito e misericordioso, pela sua bondade, pela força que sustenta e dá sentido a minha vida;

Aos meus pais **Reginaldo** e **Maria do Socorro** e aos meus irmãos **Rômulo** e **Ruana**, pelo amor, pela confiança, o apoio e a segurança que impulsionam o meu caminhar. A **Maria Helena** minha sobrinha querida pela alegria e esperança que contagiam meu coração.

A toda minha **família**, pela dedicação e incentivo;

Ao **Prof. Fábio Santos de Souza**, pela orientação, apoio, dedicação e disponibilidade em orientar esse trabalho, além de sua amizade, ao qual serei eternamente grata por todo aprendizado e as oportunidades a mim concedidas;

Ao **Prof. Rui Oliveira Macedo** pela Co-orientação, colaboração e apoio durante o desenvolvimento desse estudo e durante toda minha formação acadêmica como meu professor;

Aos **colegas** dos Laboratórios Unificados de Desenvolvimento e Ensaio de Medicamentos (LUDEM) em especial a **Valmir, Islaine, Fabrício, Venâncio, Agna, Cinthya e Rayanne**, pelo apoio e auxílio no decorrer de todo o trabalho;

Aos membros da banca examinadora, por aceitarem o convite de participar deste momento especial na minha vida (Prof<sup>a</sup>. Dra. Beate Saegesser, Prof. Dr. Cícero Flávio, Prof<sup>a</sup>. Dra. Ana Paula e Prof. Dr. Hemerson);

À **Universidade Federal da Paraíba**, pela estrutura física que possibilitou o desenvolvimento desse trabalho;

Aos meus **amigos** que fazem toda a diferença na minha vida.

À **Universidade Federal de Pernambuco**, pela oportunidade de fazer parte desse programa. A todos que fazem o **Departamento de Ciências Farmacêuticas** da UFPE.

À **Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas** da UFPE e seu corpo docente, pela enorme contribuição na minha formação acadêmica.

As pessoas que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho ou estiveram presentes ao meu lado nesta jornada.

*“Para Deus nada é impossível.”*

(Lc 1, 37)

## RESUMO

O uso de metodologias analíticas validadas é fundamental na obtenção de extratos vegetais padronizados que assegurem a produção de fitoterápicos com a devida qualidade tecnológica, segurança e eficácia terapêutica. A *Myracrodruon urundeuva* Allemão é uma espécie nativa do Brasil que têm mostrado atividades antiulcerogênica, anti-inflamatória, antibacteriana, neuroprotetora, cicatrizante, antihistamínica, e analgésica. Estudos fitoquímicos identificaram flavonoides nas folhas dessa espécie e a quercetina é uma dos flavonóides identificados. Assim, este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de metodologias analíticas e processos tecnológicos para a obtenção de extratos secos padronizados a partir das folhas de *M. urundeuva*. No estudo foi desenvolvido e validado um método analítico por CLAE-DAD para quantificação da quercetina nos extratos hidroalcoólicos e secos (ES) da planta. Os ES foram obtidos por *spray-dryer*. Foram obtidas misturas do ES com os excipientes celulose, lactose, maltodextrina e amido. Foram realizados estudos com TG, DTA, MEV e Estudo de estabilidade acelerada. A atividade anti-inflamatória do ES foi avaliada em camundongos *Swiss* pelo método do edema da pata. Os resultados da validação da metodologia por CLAE-DAD mostraram os tempos de retenção da quercetina na amostra do padrão e no extrato hidroalcoólico de 10,2 e 10,1 minutos, respectivamente. A linearidade foi verificada com a equação de regressão linear da curva média de  $y = 56948x - 6354,1$  e coeficiente de correlação  $R^2 = 0,9996$ . O limite de detecção foi de 0,18  $\mu\text{g/mL}$  e o de quantificação de 0,56  $\mu\text{g/mL}$ . O coeficiente de variação da precisão intra-dia foi de 2,3% e os da precisão inter-dia variaram entre 0,8 e 5,3%. A recuperação do padrão variou entre 97,1 e 100,7%. Na obtenção dos ES por *spray-dryer* as variações nas condições de secagem não representaram variações significativas nos rendimentos do processo. A temperatura de secagem e a taxa de alimentação influenciaram significativamente a concentração de quercetina ( $p \leq 0,05$ ). Nas análises por CLAE-DAD dos ES, os perfis cromatográficos apresentaram tempos de retenção da quercetina na amostra do padrão e no ES de 9,7 e 10,2 minutos, respectivamente e o coeficiente de variação da precisão intra-dia do teor de quercetina foi de 3,7%. A curva TG do ES mostrou a ocorrência de quatro eventos de perda de massa. A perda de massa mais significativa foi observada entre 193,5 e 267,0°C (29,7%). As análises por TG e DTA não indicaram incompatibilidade térmica entre o ES e lactose, celulose e amido, mas indicaram uma possível interação com a maltodextrina. As imagens MEV mostraram as partículas de ES com formas esféricas, tamanhos irregulares e superfícies rugosas. O estudo de estabilidade mostrou que a concentração de quercetina no ES e misturas foi estável no período de 6 meses. O ES apresentou atividade anti-inflamatória em camundongos por via oral. Assim, o processo de secagem resultou em ES estáveis e a quercetina foi um biomarcador adequado para monitorar o processo. Portanto, os resultados obtidos no estudo suportam o desenvolvimento de fitoterápicos padronizados a partir de extratos hidroalcoólicos e secos das folhas de *M. urundeuva*.

**Palavras-chave:** Anacardiaceae. Extratos Vegetais. Quercetina.

## ABSTRACT

The use of validated analytical methodologies is essential in obtaining standardized plant extracts that ensure the production of plant products with the appropriate technological quality, safety and therapeutic efficacy. *Myracrodruon urundeuva* Allemão is a native species to Brazil that have shown antiulcerogenic, anti-inflammatory, antibacterial and neuroprotective, healing, antihistaminic, and analgesic activities. Phytochemical studies have identified flavonoids in the leaves of this species and quercetin is one of the flavonoids identified. Thus, the objective of this work was the development of analytical methodologies and technological processes to obtain standardized dry extracts from the leaves of *M. urundeuva*. An analytical method by HPLC-DAD for the quantification of quercetin in the hydroalcoholic extracts and dry extracts (ES) of the plant was developed and validated in this study. The ES were obtained by spray-dryer. Binary mixtures of ES were obtained with the excipients cellulose, lactose, maltodextrin and starch. Studies with TG, DTA, SEM and Accelerated Stability study were performed. The anti-inflammatory activity of dry extract was evaluated in Swiss mice by the paw edema method. The results of the validation of the methodology by HPLC-DAD showed the retention times of quercetin in the standard sample and in the hydroalcoholic extract of 10.2 and 10.1 minutes, respectively. The linearity was verified with the linear regression equation of the mean curve of  $y = 56948x - 6354.1$  and correlation coefficient  $R^2 = 0.9996$ . The detection limit was 0.18  $\mu\text{g/mL}$  and of quantification was 0.56  $\mu\text{g/mL}$ . The coefficient of variation of the intra-day precision was 2.3% and of the inter-day precision varied between 0.8 and 5.3%. The recovery of the standard varied between 97.1 to 100.7%. In obtaining ES by spray-dryer the variations in the drying conditions did not represent significant variations in the yields of the process. The drying temperature and feed rate significantly influenced the concentration of quercetin ( $p \leq 0.05$ ). In the analyzes by HPLC-DAD of ES, the chromatographic profiles presented retention times of quercetin in the standard and ES of 9.7 and 10.2 minutes, respectively, and the coefficient of variation of the intra-day precision of the quercetin content was 3.7%. The TG curve of ES showed the occurrence of four mass loss events. The most significant mass loss was observed between 193.5 and 267.0  $^{\circ}\text{C}$  with a loss of 29.7%. The TG and DTA curves showed no thermal mismatch between the ES and the excipients lactose, cellulose and starch, but indicated a possible interaction with maltodextrin. The SEM image showed the particles of dry extract with spherical shapes, irregular sizes and rough surfaces. The stability study showed that the concentration of quercetin in ES was stable over a period of 6 months. The ES showed anti-inflammatory activity in mice orally. Thus, the drying process resulted in stable ES and the quercetin was a suitable biomarker to monitoring the process. Therefore, the results obtained in the present study support the development of standardized herbal products from hydroalcoholic and dry extracts of the leaves of *M. urundeuva*.

**Keywords:** Anacardiaceae. Plant Extracts. Quercetin.

## LISTA DE FIGURAS

		<b>Páginas</b>
<b>Figura 1</b>	Árvore, folhas e frutos de <i>Myracrodruon urundeuva</i> Allemão.....	26
<b>Figura 2</b>	Estrutura química da quercetina .....	29
<b>Figura 3</b>	Representação das etapas para o desenvolvimento de um medicamento fitoterápico.....	31
<b>Figura 4</b>	Representação geral dos requisitos que devem ser atendidos pelos medicamentos fitoterápicos.....	32
<b>Figura 5</b>	Perfis Cromatográficos em 370 nm: Fase móvel (Etanol:água pH 1.6) (A), padrão quercetina (B) e seus espectros DAD de pureza do pico da quercetina (B1, em 370 nm e B2 em vários comprimentos de onda) e da amostra do extrato hidroalcoólico de <i>M. urundeuva</i> (C) e seus espectros DAD de pureza do pico da quercetina (C1, em 370 nm e C2, em outros comprimentos de onda).....	55
<b>Figura 6</b>	Curva analítica média da quercetina, obtida a partir dos dados das três curvas individuais, para avaliação da linearidade do método.....	57
<b>Figura 7</b>	Gráfico exploratório dos resíduos da regressão da curva analítica de calibração da quercetina (0,4 µg/mL a 7,6 µg/mL).....	58
<b>Figura 8</b>	Distribuição granulométrica das folhas coletadas, secas e moídas de <i>M. urundeuva</i> .....	63
<b>Figura 9</b>	Gráfico de superfície de resposta da concentração de quercetina em função da temperatura (°C) e do fluxo de alimentação (mL/min).....	67
<b>Figura 10</b>	Perfis Cromatográficos em 370 nm: da fase móvel (Etanol:água pH 1.6) (A), do padrão quercetina (B) e dos seus espectros DAD de pureza do pico da quercetina (B1, em 370 nm e B2 em outros comprimentos de onda) e da amostra do extrato seco de <i>M. urundeuva</i> (C) e dos seus espectros DAD de pureza do pico da quercetina (C1, em 370 nm e C2, em outros comprimentos de onda).....	69
<b>Figura 11</b>	Curva TG da quercetina Substância Química de Referência.....	71
<b>Figura 12</b>	Curvas TG e DTA do extrato seco de <i>M. urundeuva</i> .....	72
<b>Figura 13</b>	Curvas TG e DTA do extrato seco de <i>M. urundeuva</i> (ES), da Lactose (LAC) e mistura binária 1:1, (ES+LAC).....	74

<b>Figura 14</b>	Curvas TG e DTA do extrato seco de <i>M. urundeuva</i> (ES), da Celulose (CEL) e mistura binária 1:1, (ES+CEL).....	75
<b>Figura 15</b>	Curvas TG e DTA do extrato seco de <i>M. urundeuva</i> (ES), do Amido (AMD) e mistura binária 1:1, (ES+AMD).....	76
<b>Figura 16</b>	Curvas TG e DTA do extrato seco de <i>M. urundeuva</i> (ES), da Maltodextrina (MALT) e mistura binária 1:1, (ES+MALT).....	77
<b>Figura 17</b>	Imagens por MEV do extrato seco de <i>M. urundeuva</i> obtido por <i>spray-dryer</i> em (a) 500x, (b) 1000x e (c) 2500x.....	78
<b>Figura 18</b>	Imagens por MEV em 1000x das misturas físicas 1:1 m/m dos extratos secos de <i>M. urundeuva</i> com excipientes farmacêuticos: (a) Lactose, (b) Celulose, (c) Amido e (d) Maltodextrina.....	79
<b>Figura 19</b>	Concentração de quercetina no extrato seco de <i>M. urundeuva</i> durante o estudo de estabilidade acelerada ( $n = 3/\text{grupo}$ ).....	81

## LISTA DE TABELAS

	<b>Páginas</b>
<b>Tabela 1</b> Informações utilizadas para calcular a recuperação da quercetina nos extratos.....	46
<b>Tabela 2</b> Matriz do Planejamento fatorial $2^{3+1}$ para secagem dos extratos por <i>spray-dryer</i> .....	48
<b>Tabela 3</b> Concentração utilizada da quercetina e a média da Área do pico da quercetina obtida no perfil cromatográfico (n=3).....	56
<b>Tabela 4</b> Resultados da linearidade média do método.....	57
<b>Tabela 5</b> Resultados da análise de variância para linearidade.....	58
<b>Tabela 6</b> Resultados do teor de quercetina nos extratos hidroalcoólico de <i>M. urundeuva</i> nas repetições intra-corrída.....	59
<b>Tabela 7</b> Coeficiente de variância em porcentagem inter-corrídas dos Estudos por CLAE da quercetina nos extratos hidroalcoólicos de <i>M. urundeuva</i> .....	60
<b>Tabela 8</b> Resultados para a recuperação do padrão de quercetina adicionado às amostras do extrato hidroalcoólico de <i>M. urundeuva</i> .....	60
<b>Tabela 9</b> Dados para avaliação da robustez considerando alterações da temperatura, fluxo da fase móvel e o pH para determinação do teor de quercetina em extratos hidroalcoólicos de <i>M. urundeuva</i> utilizando CLAE.....	61
<b>Tabela 10</b> Avaliação da Estabilidade do extrato hidroalcoólico no período de 24 horas.....	62
<b>Tabela 11</b> Avaliação do sistema de solventes na obtenção do extrato hidroalcoólico de <i>M. urundeuva</i> .....	64
<b>Tabela 12</b> Avaliação da influência do tamanho de partícula no processo de extração de <i>M. urundeuva</i> .....	64
<b>Tabela 13</b> Avaliação de Processo Extrativo em Função dos Parâmetros de Secagem do extrato <i>M. urundeuva</i> .....	65
<b>Tabela 14</b> Sumário dos efeitos das variáveis independentes e suas significâncias (ANOVA) sobre as respostas analisadas no planejamento fatorial de obtenção de extrato seco de <i>M. urundeuva</i> por <i>spray dryer</i> .....	66
<b>Tabela 15</b> Determinação do teor de quercetina no extrato seco de <i>M. urundeuva</i> .	70

<b>Tabela 16</b>	Concentração de quercetina nas misturas binárias 1:1 (m/m) Extrato seco:Excipientes (n=9).....	82
<b>Tabela 17</b>	Efeito de extratos secos de <i>M. urundeuva</i> no edema da pata induzido por carragenina em camundongos.....	83

## ABREVIATURAS E SIGLAS

°C = Graus Celsius

AMD = Amido

ANOVA = Análise de Variância

ANVISA = Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CG = Carragenina

CEL = Celulose

CLAE = Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CLAE/UV-DAD = Cromatografia Líquida de Alta Eficiência/Ultravioleta com detector de arranjo de diodos

CR = Concentração Real

CSD = Dióxido de Sílicio Coloidal

CT = Concentração teórica

CV = Coeficiente de variação

DP = Desvio padrão

DSC = Calorimetria Exploratória Diferencial

DTA = Análise Térmica Diferencial

DTG = Termogravimetria derivativa

ES = Extrato Seco

ESMU = Extrato seco de *Myracrodruon urundeuva*

CG = Cromatografia Gasosa

GHS = *Globally Harmonised System*

HPLC = *High Performance/Pressure Liquide Chromatography*

I = coeficiente angular da curva analítica

LAC = Lactose monohidratada

LD = Limite de Detecção

LQ = Limite de Quantificação

M1 = massa do extrato seco obtida

M2 = massa teórica de extrato seco

MALT = Maltodextrina

MEV = Microscopia Eletrônica de Varredura

MSR = Metodologia de Superfície de Resposta

min = minuto

mL = mililitro

OMS = Organização Mundial de Saúde

pH = Potencial hidrogeniônico

PI = porcentagem de inibição

PNPIC = Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares

PTFE = Politetrafluoretileno

Rec. = Recuperação

S = desvio padrão da regressão linear

SEM = *Scanning Electronic Microscopy*

SQR = Substância química de referência

T = Temperatura

T<sub>f</sub> = Temperatura final

To = Espessura da pata dos camundongos do grupo controle em um tempo. Tt = Espessura da pata dos camundongos tratados com os extratos em um tempo.

TG = Termogravimetria

T<sub>i</sub> = Temperatura inicial

V/V = Volume/Volume

μL = Microlitro

μm = Micrometro

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	20
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	23
2.1. Objetivo Geral .....	23
2.2. Objetivos específicos .....	23
<b>3. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	25
3.1 <i>Myracrodruon urundeuva</i> Allemão .....	25
3.1.1 Aspectos Botânicos .....	25
3.1.2 Aspectos Etnobotânicos e Etnofarmacológicos .....	26
3.1.3 Aspectos fitoquímicos .....	27
3.1.4 Aspectos Farmacológicos .....	27
3.1.5 Toxicidade .....	28
3.2 Flavonóide quercetina .....	29
3.3 Considerações sobre o Desenvolvimento e a Legislação Brasileira sobre Medicamentos Fitoterápicos .....	30
3.4 Técnicas Analíticas utilizadas na padronização de produtos vegetais .....	33
3.5. Processos de secagem para a obtenção de Extratos secos .....	36
3.5.1 Secagem por <i>spray-dryer</i> .....	36
3.5.2 Planejamento experimental na otimização do processo de secagem .....	38
3.6 Análise térmica .....	39
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	43
4.1 Material Botânico .....	43
4.2 Solventes e padrões analíticos .....	43
4.3 Obtenção do Extrato Hidroalcoólico .....	43
4.4 Validação de Metodologia Analítica por CLAE para análise da quercetina .....	43
4.4.1 Preparação das Amostras do Extrato hidroalcoólico .....	44
4.4.2 Solução Padrão do Biomarcador .....	44
4.4.3 Validação de Metodologia analítica por CLAE – UV/DAD .....	44
4.5. Obtenção de extratos secos de <i>M. urundeuva</i> Allemão por <i>spray-dryer</i> e otimização do processo .....	47
4.5.1 Análise do tamanho de partículas do Material vegetal e Avaliação do sistema de solventes para obtenção do extrato hidroalcoólico .....	47
4.5.2 Avaliação da influência do tamanho de partícula no processo de extração da droga vegetal no sistema de solvente .....	47
4.5.3 Obtenção do Extrato Seco por <i>spray dryer</i> .....	48
4.5.3.1 Preparação da amostra do extrato seco para análise por CLAE .....	49
4.5.3.2 Determinação do Rendimento do processo de secagem .....	49
4.5.3.3 Análise estatística .....	49
4.5.3.4 Doseamento da quercetina nos extratos secos padronizados de <i>M. urundeuva</i> ...	50
4.6 Análise do comportamento térmico e de compatibilidade dos extratos secos com excipientes farmacêuticos .....	50
4.6.1 Obtenção das misturas binárias .....	50
4.6.2 TG e DTA .....	51
4.7. Análises por Microscopia Eletrônica de Varredura .....	51
4.8 Estudo de Estabilidade Acelerada .....	51
4.9 Atividade Anti-inflamatória .....	52
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	54

5.1 Validação de Metodologia analítica por CLAE – UV/DAD para análise da quercetina nos extratos hidroalcoólicos de <i>M. urundeuva</i> .....	54
5.1.1 Seletividade .....	54
5.1.2 Linearidade .....	56
5.1.3 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ) .....	59
5.1.4 Precisão.....	59
5.1.5 Exatidão .....	60
5.1.6 Robustez .....	61
5.1.7 Estabilidade .....	61
5.2 Obtenção do Extrato seco de <i>M. urundeuva</i> por <i>spray-dryer</i> .....	62
5.2.1 Análise do tamanho de partículas do material vegetal e Avaliação do sistema de solventes para obtenção do extrato hidroalcoólico.....	62
5.2.2 Avaliação dos Parâmetros de secagem por <i>spray-dryer</i> .....	65
5.2.3 Doseamento da quercetina nos extratos secos padronizados de <i>M. urundeuva</i> . ....	68
5.3 Análise do comportamento térmico e de compatibilidade dos extratos secos com excipientes farmacêuticos.....	70
5.3.1 Análise por TG da quercetina.....	70
5.3.2 Análise de TG e DTA do extrato seco de <i>M. urundeuva</i> .....	71
5.3.3 Análise de TG e DTA das misturas físicas dos extratos secos com excipientes farmacêuticos.....	73
5.4 Microscopia de Varredura Eletrônica (MEV) .....	78
5.5 Estudos de Estabilidade Acelerada.....	80
5.5.1 Estudo de Estabilidade Acelerada dos Extratos secos de <i>M. urundeuva</i> .....	80
5.5.2 Estudo de Estabilidade Acelerada das misturas físicas dos extratos secos com excipientes farmacêuticos.....	81
5.6 Atividade Anti-inflamatória dos extratos secos de <i>M. urundeuva</i> . ....	82
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	85
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	88
<b>APÊNDICE 1</b> – Artigo publicado. ....	105

# **INTRODUÇÃO**

## 1. INTRODUÇÃO

A pesquisa e o desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos requerem estudos e controles que abrangem os aspectos botânicos, fitoquímicos, farmacológicos, toxicológicos, analíticos e tecnológicos que visam garantir a eficácia e segurança do produto final a ser comercializado (BRASIL, 2010). A diversidade da flora brasileira favorece o estudo e desenvolvimento de pesquisas focadas nesses produtos.

No Brasil, o registro de fitoterápicos é regulamentado pela RDC nº 14 de 2010 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Dentre os requisitos e parâmetros exigidos por essa resolução, estão à necessidade do controle de qualidade que abrangem desde a matéria-prima vegetal, derivados da droga vegetal até o produto final, com métodos analíticos validados e a comprovação de segurança de uso.

A padronização de extratos de produtos naturais, fundamentada em análise química de constituintes ou metabólitos secundários, para acompanhamento durante os processos, identificação da droga vegetal ou para verificação da presença de substâncias responsáveis pela ação farmacológica, representa parâmetro de avaliação de integridade indispensável para o controle de qualidade dos produtos (KOO *et al.*, 1997; FANCO; BUENO, 1999; ADELMANN, 2005; LONGHINI *et al.*, 2007). A padronização serve para assegurar lote a lote as especificações dos teores de ativos em relação aos quais os ensaios clínicos de segurança foram estabelecidos (FERREIRA & LEITE, 2009).

A utilização de extratos secos na produção de medicamentos fitoterápicos tem sido empregado devido suas vantagens sobre os extratos líquidos, em relação a maior estabilidade química, físico-química e microbiológica, maior concentração de compostos ativos, facilidade de padronização, manipulação e maior capacidade de transformação em diferentes formas farmacêuticas (CARVALHO *et al.*, 2008; OLIVEIRA; PETROVICK, 2010).

Dentre as técnicas empregadas com sucesso na preparação de extratos secos de vegetais destaca-se a nebulização ou *spray-dryer*, que produz pós com características definidas, como forma e tamanho de partícula, e a rápida evaporação do solvente reduz o tempo do processo e o risco de alteração dos produtos termolábeis (GALLO *et al.*, 2011, CUNHA *et al.*, 2010, TEIXEIRA, 1997, BROADHEAD *et al.*, 1992).

A *Myracrodruon urundeuva* Allemão conhecida popularmente como aroeira do sertão, aroeira-do-cerrado e aroeira-preta, é uma espécie arbórea nativa do Brasil pertencente à

família Anacardiaceae (LORENZI, 2008). Estudos tem demonstrado atividades antiulcerogênica (CARLINI *et al.*, 2010; SOUZA *et al.*, 2007; RAO *et al.*, 1987), antiinflamatória (SOUZA *et al.*, 2007; VIANA *et al.*, 1997) antibacteriana, antifúngica (SÁ *et al.*, 2009a), neuroprotetora (NOBRE JUNIOR *et al.*, 2007), e citotoxicidade em células cancerígenas (MAHMOUD *et al.*, 2011).

Estudos fitoquímicos do caule e da folha de *M. urundeuva* constataam a presença de taninos, flavonóides, mono e sesquiterpenos, triterpenos e esteróides, proantocianidinas condensadas e leucoantocianidinas, além de açúcares (SILVA, 2008; MONTEIRO, 2005). A quercetina é uma dos flavonóides identificados em *M. urundeuva* (JANDÚ *et al.*, 2013; MACHADO, 2013).

Assim o presente trabalho propõe o desenvolvimento de metodologias analíticas e processos tecnológicos para a obtenção de extratos secos padronizados a partir da das folhas de *Myracrodruon urundeuva* Allemão.

# **OBJETIVOS**

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

Desenvolver metodologias analíticas e processos tecnológicos visando à obtenção de extratos secos padronizados de *Myracrodruon urundeuva* Allemão.

### 2.2. Objetivos específicos

- Desenvolver e validar método analítico para a identificar e quantificar da quercetina nos extratos hidroalcoólicos de *M. urundeuva*.
- Realizar a obtenção tecnológica de extratos secos a partir das folhas de *M. urundeuva* Allemão.
- Desenvolver métodos cromatográficos (CLAE) qualitativos e quantitativos para o controle de qualidade dos extratos secos de *M. urundeuva*.
- Padronizar e otimizar o método de secagem para obtenção do extrato seco de *M. urundeuva* por *spray dryer*.
- Caracterizar por Termogravimetria (TG), Análise Térmica Diferencial (DTA) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) os extratos secos obtidos por *spray dryer*.
- Realizar estudos de compatibilidade entre os Extratos secos e excipientes farmacêuticos por TG e DTA;
- Realizar estudo de estabilidade acelerada dos Extratos secos e das misturas binárias.
- Realizar estudo da atividade anti-inflamatória dos extratos secos obtidos.

# **REVISÃO DA LITERATURA**

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 *Myracrodruon urundeuva* Allemão

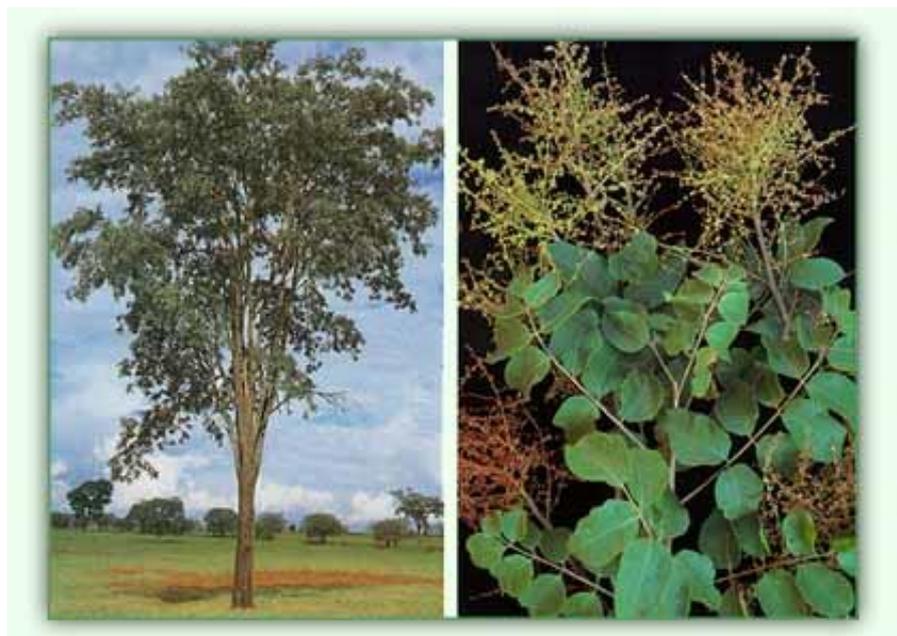
##### 3.1.1 Aspectos Botânicos

A *Myracrodruon urundeuva* Allemão é uma espécie arbórea que pertence à família Anacardiaceae, foi descrita por Freire Allemão em 1862 e tem por sinonímia *Astronium urundeuva* após requalificação feita por Engler em 1881 (LORENZI, 2008). Ela é conhecida popularmente como aroeira do sertão, aroeira-do-cerrado e aroeira-preta, é nativa do Brasil sendo amplamente distribuída nas regiões nordeste, sudeste e centro-oeste, mas pode também ser encontrada no México, Argentina, Bolívia e Paraguai (SANTIN & LEITÃO FILHO, 1991).

A *M. urundeuva* é uma árvore caducifólia, cujo porte varia correspondentemente com a região onde é encontrada, possui folhas compostas, imparipinadas, com 5-7 pares de folíolos ovado-obtusos, pubescentes em ambas as faces da lâmina foliar, quando jovens. A madeira apresenta grande resistência mecânica e dificuldade de putrefação, sendo largamente utilizada na construção civil (CARVALHO, 2003; LORENZI, 2008).

Em decorrência dos múltiplos usos, a aroeira vem sofrendo um processo de exploração intensa, de forma predatória, causando a devastação de suas populações naturais, sendo, portanto, considerada ameaçada de extinção e categorizada como “menos preocupante” pelo Centro Nacional de Conservação da Flora, assim estudos vêm analisando seus usos e presença em sistemas agroflorestais, a conservação de seus recursos genéticos, estudos químicos e bioquímicos (MENDONÇA & LINS, 2000; GAINO *et al.*, 2010; CNCFlora, 2017). Essa espécie é proibida de corte em floresta atlântica primária e autorizada sob aprovação de plano de manejo florestal em floresta secundária, cerradões e cerrados (IBAMA, 1991). Estudos com essa planta requerem autorização Ministério do Meio Ambiente no Brasil.

**Figura 1-** Árvore, folhas e frutos de *Myracrodruon urundeuva* Allemão.



Fonte: LORENZI, 2008.

### 3.1.2 Aspectos Etnobotânicos e Etnofarmacológicos

No Brasil, a *M. urundeuva* é recomendada na medicina popular no tratamento de hemorragias, infecções respiratórias, urinárias, gastrites, úlceras gástricas, cervicites, vaginites e hemorróidas (LORENZI & MATOS, 2008). As raízes são usadas no tratamento de reumatismo e as folhas são indicadas para o tratamento de úlceras (ALMEIDA *et al.*, 1998).

Estudos etnofarmacológicos citam o emprego por via oral, na forma de infusos e decoctos, para o tratamento de afecções respiratórias, diarreias, hemoptise e metrorragias (BRAGA, 1976). A literatura cita seu uso como antirreumático e adstringente (CONCEIÇÃO, 1982). O decocto da casca do caule é usado no tratamento de feridas como tônico e adstringente (SANGUINETTI, 1989; COIMBRA, 1994). Estudos citam que folhas cascas e as raízes são usadas no tratamento de doenças respiratórias, inflamações e doenças infecciosas e parasitárias, sendo estas consumidas em forma de infusos, xaropes e maceração (FRANCO & BARROS, 2006; ROQUE *et al.*, 2010).

### 3.1.3 Aspectos fitoquímicos

Queiroz *et al.* (2002) encontraram elevadas quantidades de compostos fenólicos na madeira de *M. urundeuva* Allemão, cerca de 20,2% (equivalente em ácido gálico) dos extratos brutos metanólicos.

Foram isolados ainda compostos mais apolares como cicloeucalenol e cicloeucalenona a partir do extrato hexânico da entrecasca, que apresentam atividade antioxidante (DANTAS, 2003).

Lorenzi & Matos (2008) citaram a presença de taninos dos tipos catéquico e pirogálicos, encontrados na periderme do caule de *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Anacardiaceae) e a presença de chalconas diméricas e outros flavonóides, todos biologicamente ativos.

Em estudos da entrecasca da planta foram identificados 7 componentes fitoquímicos, dos quais 2 chalconas diméricas naturais, que possuem a propriedade antiinflamatória denominadas Urundeuveína A e B (VIANA *et al.*, 1995).

Estudos fitoquímicos do caule e da folha de indivíduos jovens e adultos de *Myracrodruon urundeuva* constataam que as partes analisadas possuem compostos semelhantes quanto à presença de taninos, flavonóides, mono e sesquiterpenos, triterpenos e esteróides, proantocianidinas condensadas e leucoantocianidinas, além de açúcares (ARAÚJO *et al.*, 2005; MONTEIRO, 2005; SILVA, 2008).

Nas folhas de *M. urundeuva* foi identificada a presença dos seguintes óleos essenciais em ordem crescente de concentração:  $\beta$ -cariofileno, car-3-eno,  $\alpha$ -terpinoleno,  $\beta$ -elemeno e eugenol (SIMÕES *et al.*, 2007; BANDEIRA, 2002).

O estudo do extrato de etanólico (70%) das folhas de *M. urundeuva* mostrou que os metabólitos secundários de maior ocorrência na espécie são os derivados de ácidos fenólicos, principalmente, os galotaninos, que são polímeros do ácido gálico (SOUZA, 2012).

### 3.1.4 Aspectos Farmacológicos

Estudos químicos e farmacológicos de extratos hidroalcoólico e aquoso da entrecasca da aroeira-do-sertão têm mostrado efeitos antiinflamatório, cicatrizante, antiulcerogênico, antihistamínico, antibradicinina e analgésico, aliados à ausência de efeitos tóxicos e teratogênicos, nas doses utilizadas (MENEZES, 1985; BANDEIRA, 1993; VIANA *et al.*, 1997; ALBUQUERQUE *et al.*, 2004; CAVALCANTE, 2005; CARLINI *et al.*, 2010).

Estudos com os extratos dos brotos e renovos do caule de *M. urundeuva* permitiu comprovar a existência de chalconas diméricas e taninos com ação analgésica e antiinflamatória (BANDEIRA et al., 1994; VIANA et al., 1997; VIANA et al., 2003).

Um estudo (CECÍLIO et al, 2012) mostrou que extratos etanólicos da *M. urundeuva* apresenta potencial atividade contra rotavirus. Calou et al (2014) demonstraram a atividade neuroprotetora de extratos hidroalcoólicos de *M. urundeuva* em ratos, em um modelo de doença de Parkinson, possivelmente, devido ao efeitos antioxidantes e anti-inflamatório da planta.

Um trabalho mostrou que uma fração de chalconas diméricas isolada da casca do caule da *M. urundeuva* apresentou atividade antiapoptótica e preveniu a necrose causada pela 6-hidroxdopamina em células mesencefálicas de ratos (NOBRE-JÚNIOR et al, 2009). Da casca de *M. urundeuva* também foi isolada a proteína lectina com atividade larvicida contra o mosquito *Aedes aegypti* (SÁ et al., 2009).

Souza et al (2007) identificou a presença de tanino do tipo profisetidina no extrato da casca dessa planta que apresentou atividade anti-inflamatória e antiulcerogênica em lesões gástricas induzidas em roedores.

Estudos clínicos já foram realizados abordando diferentes indicações terapêuticas da *M. urundeuva*. Viana et al (1995) avaliaram o elixir da aroeira em pacientes de ambos os sexos (12 no total) diagnosticados com úlcera duodenal ou/e gastrite e lesão endoscópica na dose de 1 a 2 g extrato/dia por 30 dias e os resultados mostraram que em 75% ocorreu cicatrização completa sem efeitos colaterais. Campos (2008) avaliou o uso do creme vaginal de aroeira a 15% no tratamento de cervicites, vaginites e ectopias em 18 mulheres e os resultados demonstraram efetividade no tratamento das doenças estudadas e ausência de reações adversas durante o tratamento.

### **3.1.5 Toxicidade**

O estudo toxicológico agudo pré-clínico do extrato hidroalcoólico das folhas de *Myracrodruon urundeuva* demonstrou que em camundongos por via intraperitoneal tem alta toxicidade (8 mg/kg) (ALMEIDA et al., 2010).

Viana et al (1995) demonstrou que extratos hidroalcoólicos e aquoso da entrecasca de *M. urundeuva* tem baixa toxicidade quando administrados por via oral e ausência de efeitos teratogênicos nas doses estudadas. Outro Estudo demonstrou que extratos liofilizados da entrecasca de *M. urundeuva* administrado por via oral durante 83 dias a ratos machos causou

diminuição do hematócrito e induziram malformações ósseas nos fetos quando administradas a ratas prenhas (CARLINI et al., 2013).

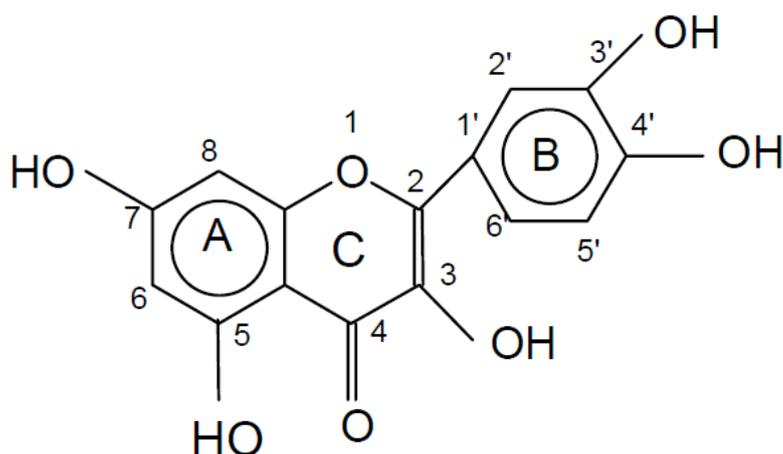
### 3.2 Flavonóide quercetina

Os flavonóides compõem uma ampla classe de substâncias de origem natural, constituídos substâncias aromáticas com 15 átomos de carbono (C15) no seu esqueleto básico, sendo compostos fenólicos, que possuem nessa estrutura anéis aromáticos C6-C3-C6 (HARBORNE et al, 1986). Os flavonoides são frequentemente usados como biomarcadores taxonômicos devido sua abundância em espécies vegetais, facilidade de identificação, especificidade em determinadas espécies e acúmulo em determinados órgãos vegetais e sofrem menor influência das variações ambientais (HARBORNE et al, 1986; ZUANAZZI & MONTANHA, 2007).

Estudos relatam que os flavonóides e taninos são capazes de inibir as isoformas das enzimas ciclo-oxigenase (COX-2), a óxido nítrico sintase (iNOS), e outros mediadores do processo inflamatório (SOOBRAATTEE *et al*, 2005).

A quercetina, 3,3',4',5,7-pentahidroxi-flavona, (Figura 2) é uma dos flavonóides identificados em *M. urundeuva* (JANDÚ et al, 2013; MACHADO, 2013). Ela está associada uma variada atividade biológica de diferentes drogas vegetais utilizadas na medicina tradicional e em medicamentos fitoterápicos.

**Figura 2** – Estrutura química da quercetina.



Fonte: COSTA, 2005

A quercetina possui peso molecular de 302,24 g/mol na forma anidra e 338,24 g/mol na forma dihidratada, apresenta-se como pó amarelo sendo praticamente insolúvel em água (BUDAVARI, 1996).

Ensaio *in vivo* e *in vitro* da substância isolada ou contida em extratos vegetais tem comprovado ação anti-inflamatória (ROTELLI *et al*, 2003; GARCÍA-MEDIAVILLA *et al*, 2007; LÓPEZ-POSADAS *et al*, 2008; KLEEMANN *et al*, 2011), antimicrobiana (GATTO *et al*, 2002; NITIEMA *et al*, 2012), antioxidante (BOOTS *et al*, 2008; ZHANG *et al*, 2011; MUTHUKALA *et al*, 2015), antistamínica (KAHRAMAN *et al*, 2003) e antiangiogênico (TAN *et al*, 2003). Um estudo mostrou que a quercetina atua normalizando os níveis de glicose plasmática, aumentando o conteúdo de glicogênio hepático e induzindo as enzimas glicocinase e hexocinase hepáticas (VESSAL *et al*, 2003; SHETTY *et al*, 2004).

Os métodos de análise da quercetina citados na literatura incluem métodos espectrofotométricos e cromatográficos (D'MELLO *et al*, 2011; ANG *et al*, 2014).

### **3.3 Considerações sobre o Desenvolvimento e a Legislação Brasileira sobre Medicamentos Fitoterápicos**

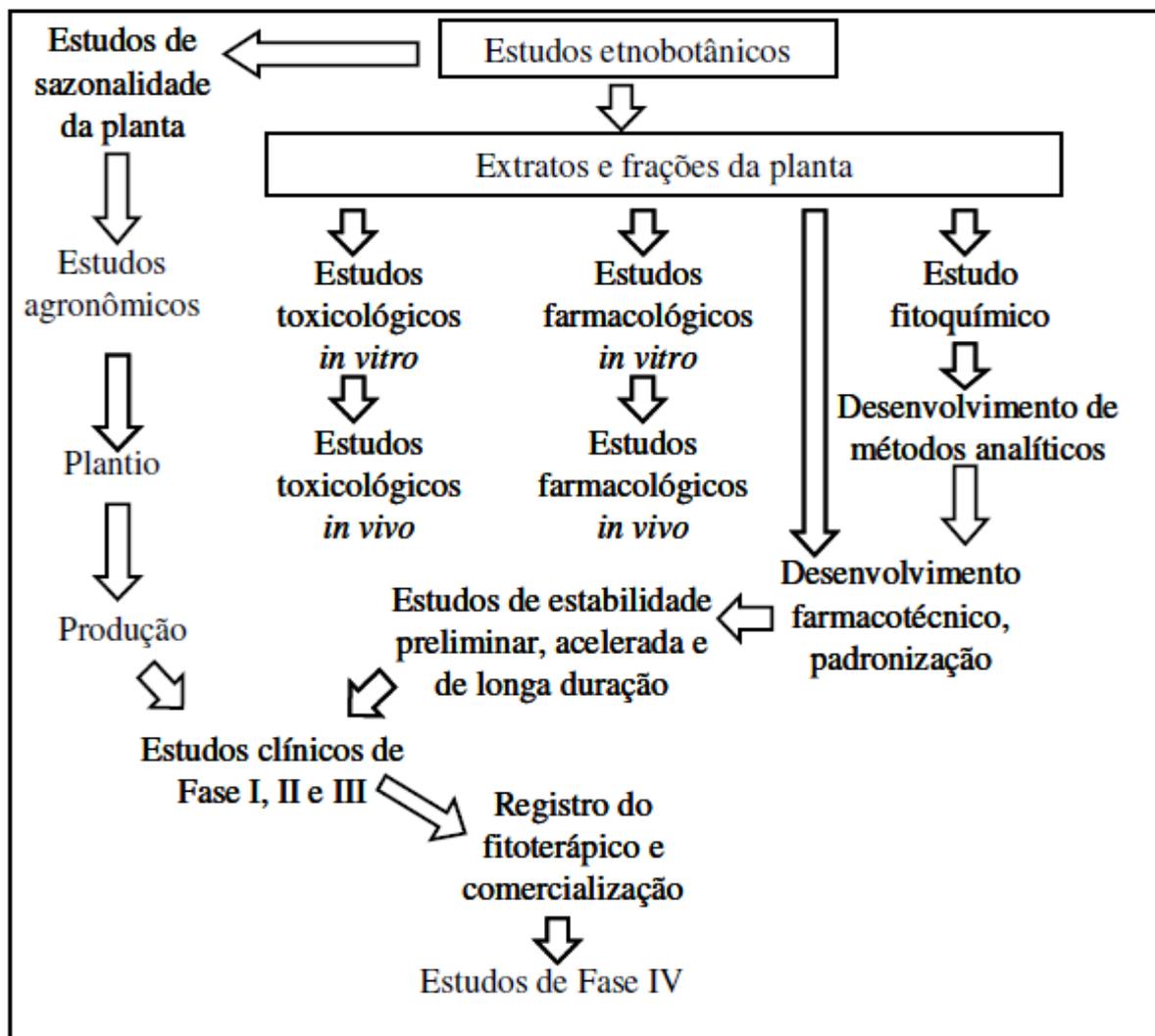
No Brasil, a normatização dos fitoterápicos teve início em 1996, com a Portaria n. 6 da então Secretaria de Vigilância Sanitária, posteriormente, a ANVISA, emitiu as resoluções RE n. 17, de 25 de fevereiro de 2000 e n. 48, de 16 de março de 2004 as quais tinham por objetivo a normatização do registro de medicamentos fitoterápicos. Em 2006, o país aprovou a Portaria 971, que aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) e o Decreto n.º 5.813, que aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF).

A PNPIC tem por objetivo garantir à população brasileira o acesso ao uso racional das plantas medicinais, promovendo o uso da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e a sustentabilidade da indústria nacional (BRASIL, 2006).

A PNPMF estabelece diretrizes e linhas prioritárias para o desenvolvimento de ações pelos diversos parceiros em torno de objetivos comuns voltados à garantia do acesso seguro e uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos no país, ao desenvolvimento de tecnologias e inovações, assim como ao fortalecimento das cadeias e dos arranjos produtivos, ao uso sustentável da biodiversidade e ao desenvolvimento do Complexo Produtivo da Saúde (BRASIL, 2006).

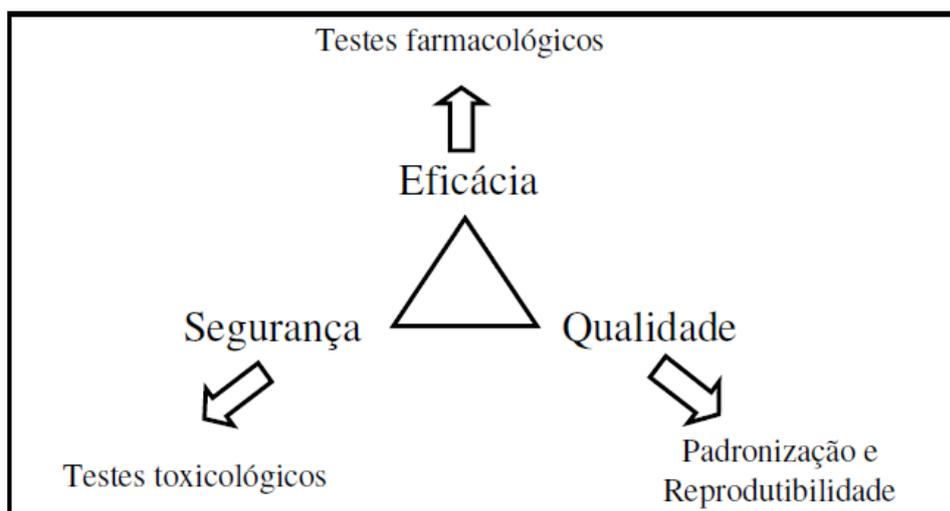
Atualmente, encontra-se em vigor a Resolução - RDC n. 14 de 2010 que estabelece os requisitos mínimos para o registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil (BRASIL, 2010). Dentre os requisitos e parâmetros exigidos, está a necessidade do controle de qualidade, com métodos analíticos que incluam resultados de prospecção (*screening*) fitoquímica ou perfis cromatográficos, além de comprovação de segurança de uso, incluindo estudos de toxicidade pré-clínica (BRASIL, 2010). A figura 3 ilustra as etapas necessárias para o desenvolvimento de um Fitoterápico.

**Figura 3** – Representação das etapas para o desenvolvimento de um medicamento fitoterápico.



A Resolução - RE n. 88 de 2004 da ANVISA fornece as referências bibliográficas para avaliação de segurança e eficácia de fitoterápicos e a Resolução RE nº 90 de 2004 dispõe sobre o Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos que tem por objetivo indicar métodos padronizados para os estudos de toxicologia pré-clínica para registro e renovação de registro de fitoterápicos destacando que os estudos de toxicidade devem ser conduzidos com amostras padronizadas do medicamento fitoterápico ou do derivado vegetal a partir do qual é produzido (BRASIL, 2004). A figura 4 ilustra de uma maneira geral as três características fundamentais que devem ser atendidas pelos fitoterápicos: eficácia, segurança e qualidade.

**Figura 4** – Representação geral dos requisitos que devem ser atendidos pelos medicamentos fitoterápicos.



Fonte: SIMÕES et al., 2007

Também foi publicada a Lista de Registro Simplificado de Fitoterápicos, Resolução-RE nº89 de 2004 da ANVISA, que dispõe sobre as espécies cujos fitoterápicos ou derivados vegetais terão seu registro facilitado por não haver necessidade de validação de suas indicações terapêuticas e segurança de uso por estar definida a parte utilizada, padronização, formas de uso, indicações/ações terapêuticas, dose, via de administração, posologia e restrição de uso (BRASIL, 2004).

A qualidade de um produto terapêutico vegetal é determinada pela sua caracterização e se estabelece desde a obtenção da planta medicinal, devidamente cultivada, colhida e seca, até

o processamento, por meio de técnicas de extração, concentração e a secagem, além da caracterização físico-química do insumo farmacêutico vegetal obtido, como tintura, extrato fluido e seco, ou óleo essencial (FARIAS, 2004, CARVALHO et al., 2006).

No controle de qualidade dos fitoterápicos, derivados da droga vegetal, excipientes e o produto final tecnologicamente acabado, deve-se utilizar metodologia descrita na farmacopéia ou formulários oficiais reconhecidos pela ANVISA ou validar metodologias analíticas obedecendo aos parâmetros especificados para a validação de métodos analíticos descritos na Resolução RE n, 899 de 2003 da ANVISA (NETTO et al., 2013, BRASIL, 2003).

### **3.4 Técnicas Analíticas utilizadas na padronização de produtos vegetais**

Vários métodos analíticos têm sido empregados nas análises quantitativas e qualitativas de materiais vegetais. Considerando que as plantas são matrizes complexas a identificação e quantificações de metabólitos específicos são fundamentais para o controle de qualidade da planta, os derivados vegetais e os produtos intermediários tecnológicos obtidos durante o desenvolvimento do fitoterápico.

As técnicas cromatográficas têm sido amplamente empregadas na análise de matrizes complexas como os materiais vegetais pela capacidade de realizarem separações dos constituintes da amostra e permitirem a quantificação e identificação do analito de modo exato, preciso e sensível (GONG, 2003).

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é uma das metodologias mais bem estabelecidas e aplicadas na padronização de produtos vegetais, inúmeros são os estudos realizados com essa finalidade (SCHENKEL et al., 2007, LIMA, 2009, FONSECA, 2009, BACCARIN, 2010).

O processo cromatográfico por CLAE utiliza colunas fechadas, recheadas de materiais especialmente preparados e uma fase móvel que é eluída sob alta pressão a uma vazão controlada, apresentando a capacidade de realizar separações de uma grande quantidade de compostos, em escala de tempo de minutos, com alta resolução, eficiência e sensibilidade (COLLINS, 1990, ESCRIBANO-BAILÓN, 2004). Além disso, esta técnica utiliza instrumentos sofisticados que podem ser totalmente automatizados e a possibilidade de unir o CLAE a outras metodologias analíticas como Espectroscopia de Massa e Ressonância Magnética Nuclear, permite, além da separação e quantificação, a identificação estrutural dos constituintes da amostra vegetal (PINTO et al, 2002, FONSECA, 2009).

As vantagens da CLAE incluem a sensibilidade, sendo capaz de detectar massas na ordem de  $10^{-9}$ g, a capacidade de reciclagem da fase estacionária, versatilidade e curto tempo de análise comparando-se a outras técnicas, que interessa a indústria farmacêutica como ferramenta para o controle de qualidade e desenvolvimento de produtos, contudo apresenta alto custo instrumental inicial e de manutenção do equipamento, relativo custo operacional, ausência de um detector universal e necessidade de recursos humanos devidamente treinados (CIOLA, 1998, VALLADÃO et al., 2008).

Nas análises de extratos vegetais através dessa técnica é possível obter perfis cromatográficos que são usados como a “impressão digital” ou *fingerprint* da amostra, sua identidade fitoquímica, fornecendo informações sobre os constituintes da planta, que devem manter um padrão qualitativo dos picos cromatográficos quando os extratos são preparados sob a mesma condição (GONGA et al., 2003; FONSECA, 2009).

Com o auxílio de detectores espectrofotométricos por arranjo de fotodiodo (DAD) que fornecem espectros de varredura do analito no UV-VIS, obtém-se o espectro de absorção correspondente a cada pico do “*fingerprint*” que pode ser comparado com espectros presentes em bancos de dados para a identificação do composto, nesse caso, são utilizados padrões para comparação dos tempos de retenção e espectros de absorção característicos para cada composto (VOLPATO, 2005). Em amostras que a totalidade dos constituintes químicos não é conhecida, como no caso dos extratos vegetais, compostos majoritários ou marcadores químicos podem ser utilizados para a sua caracterização, mesmo não estando relacionados com a atividade do extrato (VOLPATO, 2005).

Um método analítico deve assegurar que seus resultados sejam confiáveis através da validação da metodologia desenvolvida. Um processo de validação fornece evidências objetivas de que os métodos e os sistemas são adequados para o uso pretendido. A validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (BRASIL, 2003). No Brasil, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) disponibiliza um guia para o procedimento de validação de métodos analíticos e bioanalíticos, a Resolução ANVISA RE n. 899, de 29 de maio de 2003.

Os parâmetros de desempenho analítico exigidos para validação de métodos de separação são: especificidade e seletividade; linearidade; precisão; exatidão; limite de detecção; limite de quantificação e robustez.

A especificidade e seletividade de um método instrumental de separação como por CLAE, É a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença

de outros componentes, como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz, ela garante que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse (RIBANI et al, 2004, BRASIL, 2003). Uma maneira de avaliar a seletividade é através do uso de detectores como arranjo de diodos e espectrômetro de massas, que comparam o espectro do pico obtido na separação com o de um padrão, como uma indicação da presença do composto puro (HUBER, 1998, JENKE, 1998, VESSMAN et al, 2001, RIBANI et al, 2004).

A linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (BRASIL, 2003). A correlação matemática entre o sinal medido, área ou altura do pico, e a massa ou concentração da substância a ser quantificada é geralmente, determinada empiricamente a partir de sinais medidos para massas ou concentrações conhecidas dessa substância e expressa como uma equação de reta da curva analítica obtida (AUGUSTO et al, 2000, BARROS NETO et al, 2002). Os resultados dos testes deverão ser tratados por métodos estatísticos apropriados para determinação do coeficiente de correlação, cujo valor mínimo aceitável deve ser 0,98 (BRASIL, 2003).

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra (BRASIL, 2003). A Repetibilidade (precisão intra-corrída) é a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação (BRASIL, 2003). A Precisão intermediária (precisão inter-corrídas) é a concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes (BRASIL, 2003). A precisão pode ser expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%), cujo valor máximo aceitável é de 5% (BRASIL, 2003).

O limite de detecção é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectada, não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas, estabelecido por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até o menor nível detectável (BRASIL, 2003). Já o limite de quantificação é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas (BRASIL, 2003).

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro (ICH, 1995, INMETRO, 2003). A ANVISA estabelece que um mínimo de nove determinações envolvendo um mínimo de três diferentes níveis de concentração deve ser

obedecido (BRASIL, 2003). Um dos processos utilizados para avaliar a exatidão de um método são os ensaios de recuperação em que a proporção da quantidade da substância de interesse, presente ou adicionada na porção analítica do material teste, é extraída e passível de ser quantificada (THOMPSON et al, 1999, RIBANI et al, 2004). Os intervalos aceitáveis de recuperação para análise de resíduos variam entre 50 e 120%, com precisão de até  $\pm 15\%$  dependendo do nível de complexidade da amostra (THOMPSON et al, 1999).

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos, indicando sua confiança durante o uso normal (BRASIL, 2003). Em CLAE, a robustez pode ser avaliada, variando parâmetros como a concentração do solvente orgânico da fase móvel, o pH da fase móvel em 0,1 unidades de pH ou a temperatura da coluna em  $\pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$  (RIBANI et al, 2004).

### **3.5. Processos de secagem para a obtenção de Extratos secos**

Os extratos secos são preparações sólidas, pulverulentas ou granuladas obtidas por evaporação de extratos de plantas medicinais adicionadas ou não de adjuvantes, apresentando o teor de substâncias ativas indicado na respectiva monografia (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988).

Os extratos secos apresentam vantagens sobre os líquidos relacionadas à maior estabilidade química, físico-química e microbiológica, facilidade de padronização, maior concentração de compostos ativos, distribuição granulométrica dos constituintes da preparação e por isso na indústria de fitoterápicos tem sido aplicado na preparação de comprimidos, cápsulas, granulados, pomadas e outras formas farmacêuticas, como produto intermediário (CORDEIRO, 2000). No Brasil estão registrados 512 medicamentos fitoterápicos, dos quais mais de 70% apresentam-se como formas farmacêuticas sólidas cujas matérias primas são extratos secos (CARVALHO et al., 2008). Eles podem ser preparados a partir de soluções extrativas vegetais submetidas aos processos de secagem como a liofilização, a evaporação rotativa e secagem por *spray-dryer* (RUNHA et al, 2001; SILVA et al, 2012).

#### **3.5.1 Secagem por *spray-dryer***

O processo de secagem por aspersão consiste na dispersão como gotículas de uma mistura diluída sólido-fluido em uma corrente de ar aquecida que promove evaporação do

solvente e a formação da partícula sólida utilizando um equipamento específico (NONHEBEL & MOSS, 1971; MASTERS, 1985; BROADHEAD et al., 1992; SHAW, 1997; WENDEL & CELIC, 1998, RANKELL et al., 2001, OLIVEIRA & PETROVICK, 2010).

Trata-se de um processo de secagem rápido que produz partículas com tamanho definido, custos de produção relativamente baixos, versatilidade da técnica, capacidade de gerar um produto com especificações definidas e de qualidade, além disso, o tempo em que o material permanece no interior da câmara de secagem é relativamente pequeno possibilitando a secagem de materiais termolábeis, como os extratos vegetais (GEORGETTI et al., 2008, SILVA, 2006, ISONO et al., 1995).

Os pós obtidos por *spray-dryer* apresentam características relacionadas à granulometria do produto, umidade final, homogeneidade, densidade, forma e fluidez que garantem padrões elevados de qualidade do produto final e exigidos na indústria (REMILI et al., 1994).

As propriedades do produto final são influenciadas pelos fatores relacionados às características do material de entrada e aos parâmetros de operação e equipamento. Os fatores relacionados ao material de entrada incluem o uso de adjuvantes de secagem, viscosidade do material, tensão superficial, concentração e tipo de solvente da amostra que devem ser investigados e controlados para obtenção de produtos com características adequadas (OLIVEIRA & PETROVICK, 2010). Em relação aos fatores relacionados ao processo e equipamentos estão a temperatura de entrada e saída, fluxo de alimentação, pressão de atomização, tipo de bico atomizador e vazão do ar de secagem, que determinam tanto a qualidade do produto como do processo (LIST & SCHMIDT, 1989; OLIVEIRA & PETROVICK, 2010).

Para a secagem de extratos vegetais são utilizados normalmente, adjuvantes de secagem como amido, ciclodextrinas, dióxido de silício coloidal, fosfato tricálcico, gelatina, goma arábica, lactose, maltodextrina que vão determinar a estabilidade e a qualidade dos produtos, influenciando ainda sua biodisponibilidade (VASCONCELOS et al., 2005; SILVA JÚNIOR et al., 2006, OLIVEIRA & PETROVICK, 2010).

O dióxido de silício coloidal é um pó fino, adsorvente, com grande área de superfície específica, assim possui baixa densidade aparente e excelentes características de vazão, sendo empregado para otimizar processos de compressão e encapsulação de formas farmacêuticas sólidas, sendo considerado seguro em produtos farmacêuticos administrados pela via oral e também tópica, por isso tem sido empregado com sucesso na obtenção de extratos secos de vegetais (ROWE, SHESKEY, OWEN, 2006, CAMPOS, 1996; DE SOUZA, 1997).

Carvalho (1997) mostrou que a adição deste adjuvante a 10% e a 20% em extratos de *Maytenus ilicifolia* Martius ex Reissek, em relação ao teor de sólidos na solução extrativa, provocou redução na higroscopicidade dos produtos secos. Outros estudos evidenciaram que a substituição do dióxido de silício coloidal por  $\beta$ -ciclodextrina ou por celulose microcristalina na secagem de soluções extrativas de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC tiveram efeito negativo sobre a estabilidade dos produtos obtidos referente à umidade residual (TEIXEIRA, 1997; DE PAULA et al., 1998).

### 3.5.2 Planejamento experimental na otimização do processo de secagem

No processo de secagem por *sprya-dryer*, a otimização dos parâmetros de secagem é fundamental na obtenção de extratos secos com melhores características físico-químicas e com maior rendimento da operação, que podem ser influenciadas por fatores como: temperaturas de entrada e saída, velocidade de fluxo de alimentação, seleção do adjuvante tecnológico e pelos teores de resíduo seco do extrato fluído a ser nebulizado (GAUDY et al., 1991; DE PAULA et al., 1998).

A otimização do processo de secagem pode ser realizada utilizando ferramentas estatísticas. O planejamento experimental é uma ferramenta que proporciona a geração e interpretação de dados e aplicação de experimentos científicos de maneira eficaz através dos planejamentos univariados que variam um único fator ou multivariáveis que avaliam vários fatores, simultaneamente (FRANCIS et al, 2003, FERREIRA, et al, 2007).

Os planejamentos experimentais trabalham, geralmente, com fatores chamados variáveis independentes (X) em diferentes níveis (n), com o objetivo de avaliar uma resposta, chamada de variável dependente (BOX & BEHKEN, 1960). O total de ensaios realizados depende do número de fatores e níveis estudados, assim  $n^X = n^\circ$  total de ensaios, por exemplo, se dois fatores são estudados em dois níveis, então  $2^2 = 4$  ensaios (BOX & BEHKEN, 1960). Através do planejamento, verificam-se quais fatores possuem maior impacto na resposta, eliminam-se fatores sem importância para o processo, possibilitando reduzir o número de fatores a serem investigados (MYERS, 2003, LI, 2003).

A metodologia de superfície de resposta (MSR) é uma técnica que consiste em um grupo de procedimentos matemáticos e estatísticos que são usados para estudar a relação entre uma ou mais respostas (variáveis dependentes) e um número de fatores (variáveis independentes), gerando um modelo matemático que descreve o processo em estudo (BARROS NETO, SCARMINIO & BRUNS 1996; DINIZ & MARTIN, 1996).

Dentre as técnicas multivariadas utilizadas na otimização de processos, a MSR tem-se destacado por possibilitar a avaliação do efeito de múltiplas variáveis e suas interações sobre as variáveis respostas com número reduzido de tentativas, contribuindo para aumentar o rendimento dos processos, sem aumentar os custos (BAŞ & BOYACI, 2007; WU et al., 2007).

O planejamento experimental fatorial associado à técnica de MSR fornece informações seguras do processo, reduzindo soluções empíricas que envolvem técnicas de tentativa e erro (BOX et al, 1978). Usando esta técnica para realizar os ensaios experimentais, é possível estimar os efeitos principais das variáveis na resposta ou variável dependente. A tabela de análise de variância obtida fornece informações sobre o quanto foi bom o ajuste, sendo possível propor o modelo probabilístico que correlaciona a resposta em função das variáveis estudadas, construindo a superfície de resposta para determinar a faixa ótima de operação (RODRIGUES et al,1998).

### **3.6 Análise térmica**

Análise térmica é um termo usado para descrever técnicas analíticas que medem as propriedades físicas e químicas de uma amostra com uma função da temperatura, enquanto a substância é submetida a programa controlado de temperatura (IONASHIRO, 2004). Na indústria farmacêutica, a análise térmica destaca-se como um método analítico, qualitativo e comparativo, capaz de produzir resultados rápidos e reprodutíveis, visando à análise global da qualidade de produtos farmacêuticos, nos estudos de pré-formulação para análise de polimorfismo, estudos de estabilidade e de interações fármaco-excipiente (MACÊDO, 1996, GIRON, 1997).

Dentre as técnicas termoanalíticas mais utilizada, a Termogravimetria (TG), Análise Térmica Diferencial (DTA) e Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) são as mais utilizadas com aplicação na área farmacêutica.

A Termogravimetria é uma técnica em que se analisa a mudança de massa de uma substância em função da temperatura ou do tempo (HATAKEYAMA & QUINN, 1999; THOMAS et al., 2002). Os dados obtidos de uma curva de TG fornecem informações sobre a estabilidade térmica da amostra, dos seus produtos de decomposição e sobre a cinética de decomposição dos processos físico-químicos que ocorrerem na amostra (HATAKEYAMA & QUINN, 1999).

A análise térmica diferencial (DTA) é uma técnica de medição contínua das temperaturas da amostra e de um material de referência termicamente inerte, à medida que ambos são sujeitos a um gradiente de temperatura controlada, assim são registradas a diferença entre a temperatura da referência e a da amostra, em função da temperatura ou do tempo, de forma linear (SKOOG et al, 2002; IONASHIRO, 2004). Esse método fornece um caminho simples e preciso para determinação do ponto de fusão e ebulição e decomposição de compostos orgânicos (SKOOG et al, 2002).

A calorimetria exploratória diferencial é uma técnica em que se mede a diferença de energia cedida a uma substância e a um material de referência em função da temperatura, quando a substância e a referência são submetidas a um programa de temperatura controlada, com o DSC-fotovisual é possível à visualização de todo o processo (SKOOG et al, 2002; THOMAS et al., 2002). As curvas TG e DSC fornecem informações importantes sobre a propriedade física das substâncias como estabilidade, compatibilidade, cinética de degradação, decomposição térmica, fase de transição e polimorfismo (GIRON, 1997; RODRIGUES et al., 2005; SANTOS et al., 2008 LEITE et al., 2013).

As técnicas termoanalíticas vêm sendo aplicada também nas análises de matérias-primas e derivados vegetais. Análises de extratos de *Cissampelos sympodialis* Eichl por TG avaliaram sua estabilidade térmica e cinética de degradação (ARAGÃO et al., 2002). Estudos termoanalíticos foram utilizados para determinar teores de umidade e cinzas de amostras comerciais de *Paullinia cupana* Kunth em pó de cafés in natura e processados e os resultados mostraram não haver diferença entre os dados obtidos por métodos convencionais quando comparados com os da TG, além disso, o método por TG teve menor tempo de análise, menor consumo de amostra, a obtenção simultânea do teor de umidade e cinzas, além de possibilitar a visualização do seu perfil termoanalítico (ARAÚJO et al., 2006, PEREIRA, et al., 2005). Sampaio *et al* (2016) utilizaram TG e DTA para caracterizar termicamente extratos secos de *Arrabidaea chica* obtidos por *spray dryer*. Medeiros et al (2002) avaliaram a presença de dióxido de silício coloidal e ciclodextrina durante a secagem de extratos de *Albizia inopinata* usando TG, demonstrando a maior estabilidade dos extratos com ciclodextrina. Costa et al (2013) utilizando DSC e TG, avaliou o grau de compatibilidade de um extrato liofilizado da *Heliotropium indicum* com hidroxietilcelulose, metilparabeno e propileno glicol mostrando que essas duas últimas substâncias interagem com o extrato.

As vantagens das técnicas termoanalíticas como a pequena quantidade de amostra utilizada, a rapidez de resultados, a limpeza da técnica e a possibilidade de visualização do seu perfil termoanalítico, fazem delas importantes e promissoras ferramentas no estudo de

padronização de matérias-primas vegetais e estudos de pré-formulação para no desenvolvimento de fitoprodutos (ARAGÃO et al., 2002; ARAÚJO et al., 2006).

# **MATERIAL E MÉTODOS**

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Material Botânico**

Para o desenvolvimento deste estudo foram utilizadas folhas de *M. urundeuva* coletadas na Fazenda Cacimbas, Município de Caraúbas no estado da Paraíba em maio de 2013. Uma excisata desta espécie foi registrada no Herbário Lauro Pires Xavier, sob o NC240 e a identificação botânica foi realizada pela Professora Alecksandra Vieira de Lacerda da Universidade Federal de Campina Grande. O material vegetal foi limpo, seco em estufa sob uma temperatura de  $50 \pm 2^\circ\text{C}$  por 96 horas, triturado em moinho mecânico e armazenado em saco plástico hermeticamente fechado até sua utilização. O projeto foi autorizado pelo Ministério do Meio Ambiente com número 53346-1 para atividades com finalidade científica com esta planta.

### **4.2 Solventes e padrões analíticos**

Todos os solventes utilizados foram grau HPLC (Tedia, Fairfield, Ohio, USA) e foram degaseificados com gás hélio. A água foi purificada utilizando o sistema Sistema Milli-Q (Millipore, Massachusetts, USA). Todas as soluções foram filtradas em membrana de 0.45mm (Millipore, Massachusetts, USA). A quercetina dihidratada de CAS – 117-39-5 (97% de pureza), utilizada como substância química de referência (SQR), foi adquirida da Merck, Brasil.

### **4.3 Obtenção do Extrato Hidroalcoólico**

A droga vegetal seca foi submetida ao processo de maceração e o extrato fluido foi obtido após 120 horas em sistema de solvente Etanol:Água (50%: 50%), em uma proporção droga/solvente de 20%.

### **4.4 Validação de Metodologia Analítica por CLAE para análise da quercetina**

Os ensaios cromatográficos dos extratos de *M. urundeuva* foram realizados em sistema cromatográfico Prominence series (Shimadzu, Tóquio, Japão), equipado com sistema de fornecimento multissolvente LC-20AT, sistema de degaseificação DGU-20A5, autoinjeter

SIL-20A, forno para coluna CTO-20A e detecção por espectrometria eletrônica na região do ultravioleta-visível com arranjo de diodo SPD-M20A UV-VIS. Os dados foram coletados e integrados através software Classe VP V6.14 SP1. A fase móvel consistia de uma mistura de Metanol: ácido fosfórico 1% (47%:53%) com pH controlado em torno de 3,1 e razão do fluxo de 1,2 mL/min no modo isocrático. Para realização das corridas cromatográficas utilizou-se uma coluna C18 (Phenomenex) de dimensões 4,6 mm X 25 cm X 5 µm, o detector de ultravioleta com o comprimento de onda em 370nm, volume de injeção de 20 µL, a temperatura do forno da coluna de 40°C e o tempo de análise de 30 minutos.

#### **4.4.1 Preparação das Amostras do Extrato hidroalcoólico**

Os extratos de *M. urundeuva* foram analisados por adição de 2 mL de hexano a 1 mL de extrato. A mistura foi homogeneizada por 2 minutos e depois centrifugada, durante 10 minutos. Após isso, a fase hexânica foi descartada, e 3 mL de diclorometano foram adicionados a 500 µL do extrato resultante, que foi homogeneizada durante 2 minutos e centrifugado durante 10 minutos. Este processo foi repetido por 2 vezes, resultando em 9 mL de fase de diclorometano. 4 mL desta fase foram evaporados, em banho-maria à 50 °C, e reconstituída em 2 mL de metanol, filtrado em filtro PTFE de 0,45µm e injetou-se a solução no sistema cromatográfico por CLAE.

#### **4.4.2 Solução Padrão do Biomarcador**

Estudos fitoquímicos apontaram a presença majoritária de compostos fenólicos na composição fitoquímica de *Myracrodruon urundeuva* dentre elas o flavonóide quercetina (JANDÚ et al, 2013; MACHADO, 2013). O solvente utilizado na preparação das soluções padrão estoques e de leitura foi o metanol 70 e 50%, respectivamente. As concentrações das soluções de quercetina foram preparadas a partir das soluções-mãe de 200 µg/mL e 100 µg/mL.

#### **4.4.3 Validação de Metodologia analítica por CLAE – UV/DAD**

O método foi validado através dos parâmetros de seletividade, linearidade, precisão, exatidão, recuperação e limites de quantificação e detecção de acordo com a RE 899/2003 da ANVISA.

### *Seletividade*

A seletividade avalia o grau de interferência provocado pela presença de outros compostos na amostra o que garante que a resposta do pico gerado é referente ao composto de interesse. Para avaliar a seletividade do método foi analisado por CLAE uma amostra controle (fase móvel), uma amostra do extrato, além do marcador químico quercetina. A presença da quercetina foi determinada ao compararem-se os picos registrados dos perfis cromatográficos.

### *Linearidade*

Uma curva média de linearidade foi construída a partir de três curvas de calibrações autênticas do padrão quercetina cujas concentrações foram: 0,4 µg/mL, 0,6 µg/mL, 1,6 µg/mL, 2,8 µg/mL, 4 µg/mL, 5,2 µg/mL, 6,4 µg/mL, 7,6 µg/mL. As soluções foram aferidas com solução de metanol a 50%. Para avaliar-se a capacidade do método de gerar resultados diretamente proporcionais a concentração do analito, foi utilizado o método de regressão linear dos mínimos quadrados. Cada curva de calibração foi constituída de 8 pontos e deveria possuir um coeficiente de correlação linear ( $R^2$ ) no mínimo igual a 0,99.

### *Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação(LQ)*

Os limites de detecção e quantificação foram determinados a partir de parâmetros da curva analítica da substância química de referência e calculado matematicamente usando-se as equações escritas abaixo:

$$LD = 3,3 \times S / I \quad (4.1)$$

$$LQ = 10 \times S / I \quad (4.2)$$

Em que S é o desvio padrão da regressão linear e I o coeficiente angular da curva analítica.

### *Precisão*

A repetibilidade (precisão intra-corrída) foi determinada a partir da injeção de 6 soluções amostrais do extrato fluido de *M. urundeuva* pelo mesmo analista no mesmo dia, sob as mesmas condições instrumentais e cromatográficas. A precisão intermediária (Inter-

corridas) foi realizada em três dias consecutivos por analistas diferentes, com 6 determinações no mesmo dia. Os estudos de precisão intra-corrída e inter-corrídas foram determinados através dos coeficientes de variação (CV%) conforme recomenda a resolução nº 899 de 2003 da ANVISA e o critério de aceitação deste parâmetro foi um desvio padrão relativo de no máximo 15% em razão da matriz vegetal ser complexa.

### *Exatidão*

A exatidão do método foi realizada através da adição às amostras do extrato hidroalcolico de *M. urundeuva* de quantidades conhecidas de quercetina SQR em três concentrações: baixa, média e alta, 20%, 100% e 180%, respectivamente, da concentração obtida na precisão. As amostras foram preparadas em triplicata e as análises foram realizadas em duplicatas para cada nível de concentração, e avaliados os desvios padrão relativos e capacidade de recuperação da quercetina. Para avaliar a recuperação no nível de 20% e considerando um valor de concentração [W] obtido na precisão foi adicionado 0,2 x [W] de concentração do marcador monitorado. O valor teórico é a concentração determinada na precisão intermediária somando-se a concentração adicionada, logo, 0,2 x [W] + [W] e o cálculo da recuperação foi feito calculando a razão entre o valor real obtido e o valor teórico multiplicado por 100 (BRASIL, 2003). Abaixo segue a Tabela 1 com as informações para todos os níveis.

**Tabela 1.** Informações utilizadas para calcular a recuperação da quercetina nos extratos.

Nível	Precisão ( $\mu\text{g}/0,5\text{mL}$ )	Adição Padrão	Valor teórico (Vt)	% Recuperação
20%	[ W ]	0,2 x [ W ]	0,2 x [ W ] + [ W ]	$\% \text{ Rec} = \frac{V_{\text{real}} (\mu\text{g}/\text{mL})}{V_{\text{t}} (\mu\text{g}/\text{mL})} \times 100$
100%	[ W ]	[ W ]	[ W ] + [ W ]	
180%	[ W ]	1,8 x [ W ]	1,8 x [ W ] + [ W ]	

[ W ]: Concentração da quercetina obtida na precisão. Fonte: BRASIL, 2003.

### *Robustez*

Para avaliar a robustez do método utilizou-se a amostra do extrato líquido de *M. urundeuva*. Os fatores modificados para avaliação foram: o fluxo (1,1, 1,2, 1,3 mL/min) e pH (1,5, 1,6 e 1,7) da fase móvel e temperatura da coluna (38, 40 e 42°C) . Para cada uma das

condições estabelecidas, a solução da amostra e da solução padrão (preparada tal como descrito na Seção 4.4.1 e 4.4.2) foram injetadas (triplicado) após filtração através de uma membrana de 0,45 milímetros de PTFE modificado. Foi avaliada também a estabilidade das soluções analíticas em um período de 24 horas.

Para avaliar se os dados na condição do método proposto e na condição alterada não apresentaram diferença, estatisticamente significativa, foi aplicado o teste Análise de Variância de fator único (ANOVA *one-way*) com intervalo de confiança de 95%.

#### **4.5. Obtenção de extratos secos de *M. urundeuva* Allemão por *spray-dryer* e otimização do processo**

##### **4.5.1 Análise do tamanho de partículas do Material vegetal e Avaliação do sistema de solventes para obtenção do extrato hidroalcoólico**

A droga vegetal pulverizada foi submetida a sistema de tamisação contendo malhas de 1190; 850; 600; 425; 300; 250; 150 e 75  $\mu\text{m}$ . Diferentes valores de massa da droga pulverizada foram utilizados para avaliar a distribuição dos diferentes tamanhos de partícula nos sistema de tamises em intervalo de tempo diferente.

A tecnologia de extração empregada na obtenção do extrato hidroalcoólico foi à maceração a frio, realizada em recipientes cilíndricos de aço inox fechados por período de 120 horas. A proporção da massa da droga vegetal foi de 20% frente ao volume do sistema de solvente escolhido.

Foram avaliadas as seguintes proporções de solvente etanol:água: 30:70; 50:50 e 70:30. A resposta do estudo do processo extrativo foi definida em função da concentração do marcador quercetina determinado por CLAE-DAD conforme metodologia analítica previamente validada descrita na seção 4.4 desse trabalho.

##### **4.5.2 Avaliação da influência do tamanho de partícula no processo de extração da droga vegetal no sistema de solvente**

Com o objetivo de avaliar a influência do tamanho de partícula no processo extrativo foram obtidos extratos hidroalcoolicos a partir da droga vegetal pulverizada submetida a sistema de tamises com malhas de 355, 250, 150 e 75  $\mu\text{m}$ . A influencia do tamanho de partícula no processo extrativo foi determinada em função do teor do marcador monitorado

no extrato de *M. urundeuva*, por metodologia analítica validada descrita na seção 4.4 desse trabalho.

#### 4.5.3 Obtenção do Extrato Seco por *spray dryer*

O extrato hidroalcoólico de *M. urundeuva* obtido na condição do sistema de solvente etanol:água 50%:50% (v/v) foi submetido ao processo de secagem em *spray dryer* de escala laboratorial Modelo LAB PLANT SD-05. O bico atomizador duplo fluido pneumático com orifício de abertura de 1.2 mm operou com taxa de vazão de ar de 40L/min e pressão de 2.0 bar. O Dióxido de silício coloidal (CSD) com tamanho médio das partículas primárias de 12nm foi adquirido da Henrifarma (Lot 3157052414, Brasil) foi utilizado como adjuvante de secagem.

Para avaliar a melhor condição de obtenção do extrato seco foram avaliados os parâmetros de secagem: Proporção do CSD (10, 15 e 20%), Temperatura de entrada (160, 170 e 180°C) e fluxo de alimentação (4, 6 e 8 mL/min). Foi realizado um planejamento fatorial da ordem de  $2^{3+1}$ , gerando um total de 27 experimentos considerando a triplica de cada condição em estudo (Tabela 2). As amostras do produto tecnológico foram armazenadas em temperatura ambiente entre 15 e 30°C. Protegidas da luz e da umidade em frascos hermeticamente fechados.

**Tabela 2.** Matriz do Planejamento fatorial  $2^{3+1}$  para secagem dos extratos por *spray-dryer*.

Ensaio	Codificado			Não codificado		
	A	B	C	T (°C)	F (mL/min)	A (%)
1	1	-1	1	180	4	20
2	1	1	1	180	8	20
3	1	-1	-1	180	4	10
4	-1	1	-1	160	8	10
5	-1	1	1	160	8	20
6	1	1	-1	180	8	10
7	-1	-1	-1	160	4	10
8	-1	-1	1	160	4	20
9	0	0	0	170	6	15

T: temperatura de entrada, F: fluxo de alimentação, A: Proporção de CSD (Dióxido de silício coloidal).

O dióxido de silício foi selecionado para o estudo por ser um adjuvante com elevada área superficial e estabilidade térmica, além de ser um excipiente seguro quando utilizado em produtos farmacêuticos por via oral ou tópica, sendo muito utilizado com adjuvante tecnológico em estudos para secagem de extratos vegetais por *spray-dryer* (ROWE, SHESKEY, OWEN, 2006).

#### 4.5.3.1 Preparação da amostra do extrato seco para análise por CLAE

Para análise cromatográfica, o extrato seco foi reconstituído a condição semelhante de extrato líquido, pesando-se 300 mg do extrato seco e diluindo com 5mL do solvente na proporção etanol:água (50%:50%). Em seguida foi realizado o procedimento descrito na seção 4.4.1 deste estudo. A quantificação do marcador quercetina nas análises realizadas nos extratos de *M. urundeuva* foi realizada utilizando método analítico por CLAE-DAD previamente validado, como está descrito na seção 4.4 desse trabalho.

#### 4.5.3.2 Determinação do Rendimento do processo de secagem

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

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{M1 (g)}}{\text{M2 (g)}} \times 100 \quad (4.3)$$

Onde: M1 = massa do extrato seco obtida

M2 = massa teórica de extrato seco (resíduo do extrato com a massa do adjuvante adicionado)

#### 4.5.3.3 Análise estatística

Para a análise estatística dos dados experimentais foi empregado ANOVA e regressão múltipla associada à metodologia de superfície de resposta (MSR), através do *software* Statistica 7

® (Statsoft Inc., Tulsa,OK, EUA). Foi estabelecido como parâmetro significativo  $p < 0,05$  e negligenciados os que apresentaram nível de significância  $p > 0,05$ .

#### **4.5.3.4 Doseamento da quercetina nos extratos secos padronizados de *M. urundeuva***

Com o intuito de verificar a adequação do método desenvolvido para doseamento de quercetina, por CLAE, no extrato líquido padronizado à análise do extrato seco, foi realizada uma co-validação, onde foram avaliados os parâmetros linearidade, seletividade e precisão. O extrato seco utilizado foi o obtido na melhor condição de secagem (10% 180°C 8mL/min conforme seção 4.5.4).

Uma curva média de linearidade foi construída a partir de três curvas de calibrações autênticas do padrão quercetina cujas concentrações foram: 0,4 µg/mL, 0,6 µg/mL, 1,6 µg/mL, 2,8 µg/mL, 4 µg/mL, 5,2 µg/mL, 6,4 µg/mL, 7,6 µg/mL. As soluções foram aferidas com solução de metanol a 50%. Para avaliar-se a capacidade do método de gerar resultados diretamente proporcionais a concentração do analito, foi utilizado o método de regressão linear dos mínimos quadrados. Cada curva de calibração foi constituída de 8 pontos e deveria possuir um coeficiente de correlação linear ( $R^2$ ) no mínimo igual a 0,99.

A precisão foi avaliada apenas no nível repetibilidade, onde se procedeu a análise de seis réplicas da solução preparada e em seguida calculou-se o coeficiente de variação entre os teores obtidos. A preparação das amostras para ser injetado no CLAE-DAD está descrito no item 4.5.3.1 deste trabalho.

### **4.6 Análise do comportamento térmico e de compatibilidade dos extratos secos com excipientes farmacêuticos**

#### **4.6.1 Obtenção das misturas binárias**

No estudo foram utilizados os excipientes farmacêuticos: Lactose monohidratada malha 200 (Pharma mostra, Lote 3367, Brasil), Celulose Microcristalina PH102 (Purifarma, Lote C1312098, Brasil), Amido pré-gelatinizado (Henrifarma, Lote GDI0258\*036710/15), Brasil) e Maltodextrina DE20 (Pharma Nostra Comerc, Lote 746158, Brasil), identificados como LAC, CEL, AMD e MALT, respectivamente. As misturas binárias foram preparadas por mistura física do extrato seco de *M. urundeuva* Allemão obtidos na melhor condição de

secagem (10% 180°C 8mL/min conforme seção 4.5.4) (ES) com os excipientes farmacêuticos na proporção de 1:1 Extrato/Excipiente (m/m).

#### **4.6.2 TG e DTA**

As curvas de TG dinâmica e de DTA do extrato nebulizado, excipientes farmacêuticos e das misturas binárias foram obtidas utilizando uma mesma termobalança modelo model DTG-60 (Shimadzu, Kyoto, Japan), com razão de aquecimento de 10 °C/ min de 25 a 900 °C, na atmosfera de nitrogênio, com fluxo constante de 100 mL/min. As amostras foram acondicionadas em cadinho de alumina com uma massa em torno de 5,0 ( $\pm$  0,5) mg. O equipamento TG foi calibrado usando oxalato de cálcio monohidratado. As curvas TG e DTA foram analisadas pelo programa TA-60 W (Shimadzu).

#### **4.7. Análises por Microscopia Eletrônica de Varredura**

A morfologia e características de superfície de extratos secos de *M. urundeuva* e misturas binárias foram avaliadas por microscopia eletrônica de varredura (Hitachi TM - 1000, Hiscope - New Jersey, EUA) sob vácuo atmosférico de 5-10 Torr. As imagens foram capturadas com uma voltagem de aceleração de 15 kV. As amostras foram metalizadas por pulverização de ouro e foram posteriormente exibidas em diferentes resoluções.

#### **4.8 Estudo de Estabilidade Acelerada**

O estudo de estabilidade do extrato seco de *M. urundeuva* Allemão obtidos na melhor condição de secagem (10% 180°C 8 mL/min conforme seção 4.5.4) e as misturas binárias foi realizado sob temperatura de 40 °C ( $\pm$  2 °C), controlada através de uma câmara climática Tecnal, B.O.D.TE- 371 (João Pessoa, Brasil) por um período de 6 meses (ICH Q1A R2, 2003, BRASIL, 2005). Nove amostras com aproximadamente 3 g dos produtos secos foram colocadas em envelopes herméticos de PVC-alumínio. As análises de quercetina foram realizadas em três amostras do extrato e das misturas binárias em 0, 3 e 6 meses.

#### 4.9 Atividade Anti-inflamatória

A atividade anti-inflamatória do extrato seco de *M. urundeuva* obtidos na melhor condição de secagem (10% 180°C 8mL/min conforme seção 4.5.4) foi avaliada em camundongos *Swiss* machos (32 ± 5g) utilizando o modelo de edema de pata induzido por carragenina (Winter et al, 1962). Os animais foram divididos em quatro grupos, consistindo cada um em seis animais. O edema de pata foi induzido pela injeção de 0,1 mL de carragenina 1% (p/v) em solução salina estéril e administrada na região subplantar da pata direita dos camundongos (n = 6). Uma hora antes da injeção de carragenina, o extrato seco da droga vegetal foi administrado (v.o.), previamente dissolvido em água destilada, nas doses equivalentes a 500 mg/kg e 2000 mg/kg da droga vegetal seca, cuidadosamente ajustada para a quantidade de extrato seco. O grupo controle recebeu 10 mL/kg de salina (v.o.). O diclofenaco de sódio (10 mg/kg, v.o.), utilizado como fármaco de referência, foi adquirido da Novartis (Brasil). A espessura da pata foi medida antes da injeção da carragenina e após 1, 2, 3, e 4h utilizando um paquímetro. A carragenina foi adquirida da Sigma-Aldrich (Brasil) e o diclofenaco de sódio da Novartis (Brasil).

O projeto dessa pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) (Protocolo nº 0207/10) e todos os animais utilizados foram do Biotério do Centro de Biotecnologia da UFPB. A atividade anti-inflamatória foi calculada como a percentagem de inibição do edema nos animais tratados com o extrato em comparação com o grupo controle da carragenina utilizando a Equação (4.4).

$$PI (\%) = \frac{T_o - T_t}{T_o} \cdot 100 \quad (4.4)$$

Onde  $T_t$  é a espessura da pata dos camundongos tratados com os extratos em um tempo correspondente e  $T_o$  é a espessura da pata dos camundongos do grupo controle no mesmo tempo. Os resultados foram analisados pelo teste t de *Student*, onde os valores são expressos como média ± desvio padrão (dp), e os resultados foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ .

# **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Validação de Metodologia analítica por CLAE – UV/DAD para análise da quercetina nos extratos hidroalcoólicos de *M. urundeuva*

A otimização das condições cromatográficas conduziu a uma boa resolução dos picos da quercetina neste estudo quando comparado com outros métodos previamente descritos para a quantificação desse composto em derivados vegetais (CHOU et al., 2009; BATISTA et al., 2010; D’MELLO et al., 2011; ANG et al., 2014). A validação do método seguiu os parâmetros de seletividade, linearidade, precisão, exatidão e robustez exigida pela legislação brasileira e órgãos internacionais (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

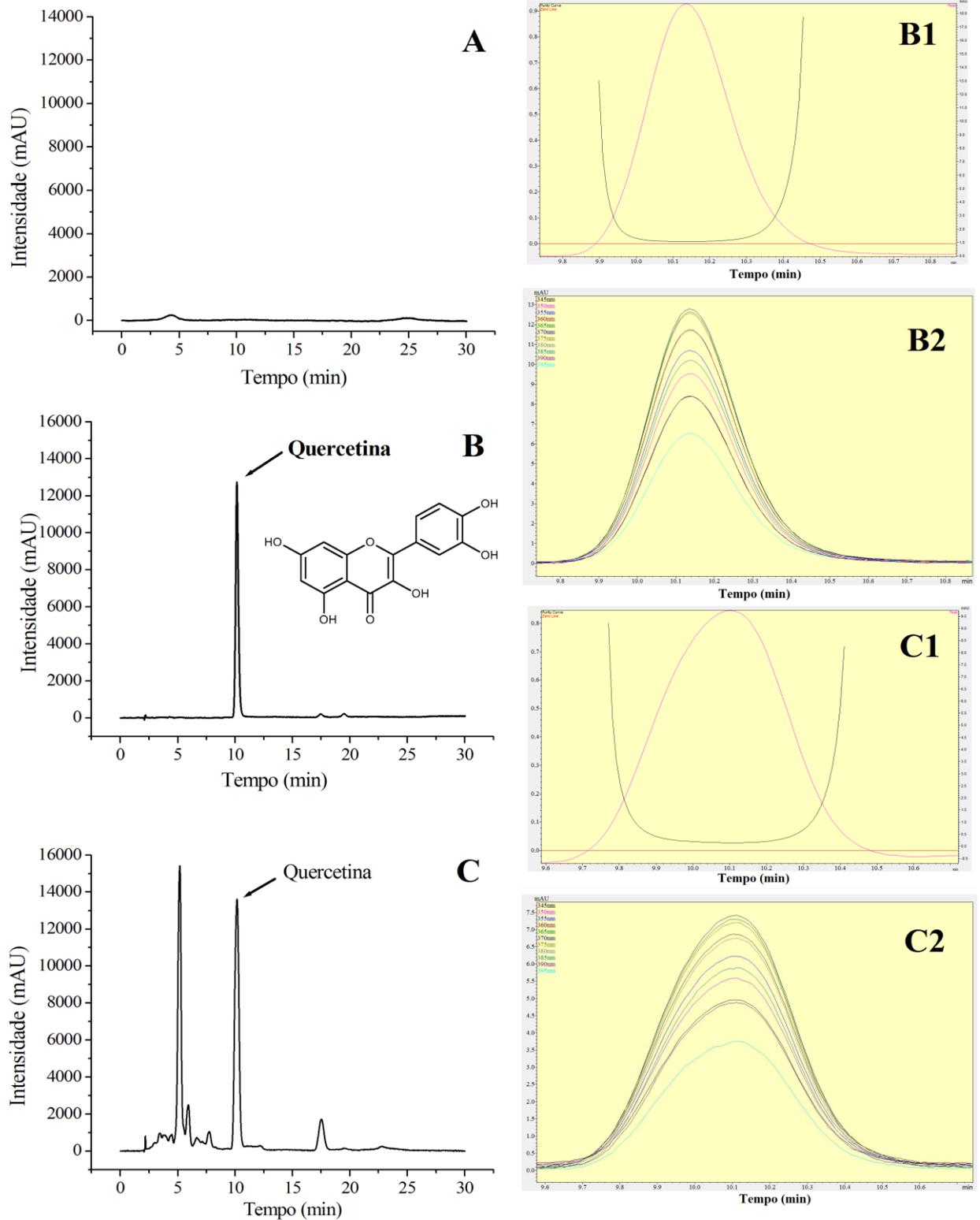
#### 5.1.1 Seletividade

A seletividade de um método instrumental de separação é a capacidade de avaliar as substâncias na presença de componentes que podem interferir com sua determinação em uma amostra complexa, como outro ingrediente ativo, excipientes, impurezas e produtos de degradação, outros compostos de propriedades similares que possam estar presentes na amostra, garantindo que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse (USP, 1999; RIBANI et al, 2004).

Para avaliar se o método desenvolvido foi seletivo para a quercetina nas amostras do extrato hidroalcoólico, foi comparado o perfil cromatográfico do padrão com o perfil da amostra, o tempo de retenção e os espectros de UV também foram analisados. Os perfis cromatográficos da fase móvel, do padrão quercetina e da amostra do extrato hidroalcoólico de *M. urundeuva* e dos seus espectros DAD estão ilustrados na Figura 5. Os tempos de retenção da quercetina na amostra do padrão e no extrato líquido foram de 10,2 e 10,1 minutos, respectivamente. Como pode ser observado, não houve interferências no pico do marcador quercetina nos perfil cromatográfico da amostra do extrato já que os comprimentos de onda máximos apresentaram as bandas espectrofotométricas características do padrão quercetina em 370 nm, além disso, os picos cromatográficos apresentaram-se definidos, resolutos e sem interferentes quando comparados entre si.

Na análise de pureza de pico, os espectros DAD da quercetina padrão de referência e do extrato analisado (Figura 5 B1, B2, C1, C2) evidenciaram a similaridade espectral da quercetina com um índice de similaridade de pico de 0,99, confirmando a capacidade do método de determinar a quercetina na presença de compostos da matriz vegetal.

**Figura 5** - Perfis Cromatográficos em 370 nm: Fase móvel (Etanol:água pH 1.6) (A), padrão quercetina (B) e espectros DAD de pureza do pico da quercetina (B1, em 370 nm e B2 em outros comprimentos de onda) e da amostra do extrato hidroalcoólico de *M. urundeuva* (C) e espectros DAD de pureza do pico da quercetina (C1, em 370 nm e C2, em outros comprimentos de onda).



Fonte: Dados da Pesquisa

### 5.1.2 Linearidade

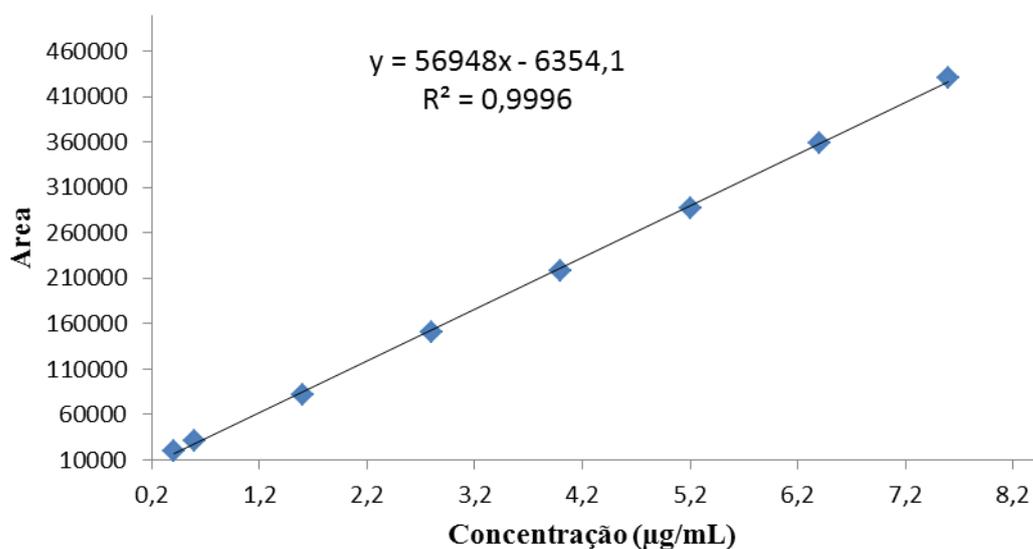
A linearidade é capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância analisada, dentro de uma determinada faixa de aplicação (ICH, 1995; USP, 1999). A linearidade foi verificada na faixa de quantificação aplicada para as amostras utilizando as concentrações para a construção das curvas analíticas (Tabela 3 e Figura 6). Os parâmetros estatísticos da linearidade estão dispostos na Tabela 4. A equação de regressão linear da curva média foi  $y = 56948x - 6354,1$ , onde y é a área do pico da quercetina e x a sua concentração. A análise de regressão linear demonstrou um coeficiente de correlação  $R^2 = 0,9996$  valor que comprova a linearidade do método (Figura 6).

**Tabela 3** - Concentração utilizada da quercetina e a média da Área do pico da quercetina obtida no perfil cromatográfico (n=3).

Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	Área média $\pm$ DP
0,40	19755 $\pm$ 424
0,60	30522 $\pm$ 415
1,60	82213 $\pm$ 3578
2,80	150658 $\pm$ 600
4,00	218479 $\pm$ 3613
5,20	287088 $\pm$ 2258
6,40	359096 $\pm$ 3038
7,60	430061 $\pm$ 8825

DP: Desvio padrão

**Figura 6** - Curva analítica média da quercetina, obtida a partir dos dados das três curvas individuais, para avaliação da linearidade do método.



Fonte: Dados da Pesquisa

**Tabela 4** - Resultados da linearidade média do método.

Variáveis	
Equação de regressão	$y = 56948x - 6354,1$
$R^2$	0.9996
Slope	$56946,6 \pm 654,9$
Intercepto X	$0,1115 \pm 0,012$
Intercepto Y	$-6354 + 732,5$
1/Slope	0,00001756

A partir da análise de variância (Tabela 5) pode-se verificar a validação do modelo e a significância estatística da curva ajustada. As análises de variância dos dados demonstraram que o método é linear na faixa de concentração estudada (0,4 µg/mL a 7,6 µg/mL), pois o  $F_{\text{calculado}} \geq \text{valor-p}$ , existe relação linear entre as variáveis e a inclinação da reta de regressão não é nula, indicando que a regressão é significativa (PIMENTEL & BARROS-NETO, 1996). A análise mostrou também que não há falta de ajuste do modelo, já que esta relação apresentou um valor de  $F_{\text{calculado}} = 2,05$ , abaixo do valor crítico  $F_{\text{crítico}} = 2,74$  com 6 e 16 graus

de liberdade e 95% de confiança demonstrando que o modelo linear está ajustado na faixa de concentração estudada (PIMENTEL & BARROS, 1996).

Na Figura 7 é possível observar através do gráfico de probabilidade normal, do histograma e da plotagem dos resíduos versus o ajuste e a ordem de obtenção dos dados, que o modelo linear é aplicável aos dados e que de acordo com o gráfico de resíduos não houve tendências óbvias que demonstrassem heteroscedasticidade ou desvio de linearidade.

**Tabela 5** - Resultados da análise de variância para linearidade.

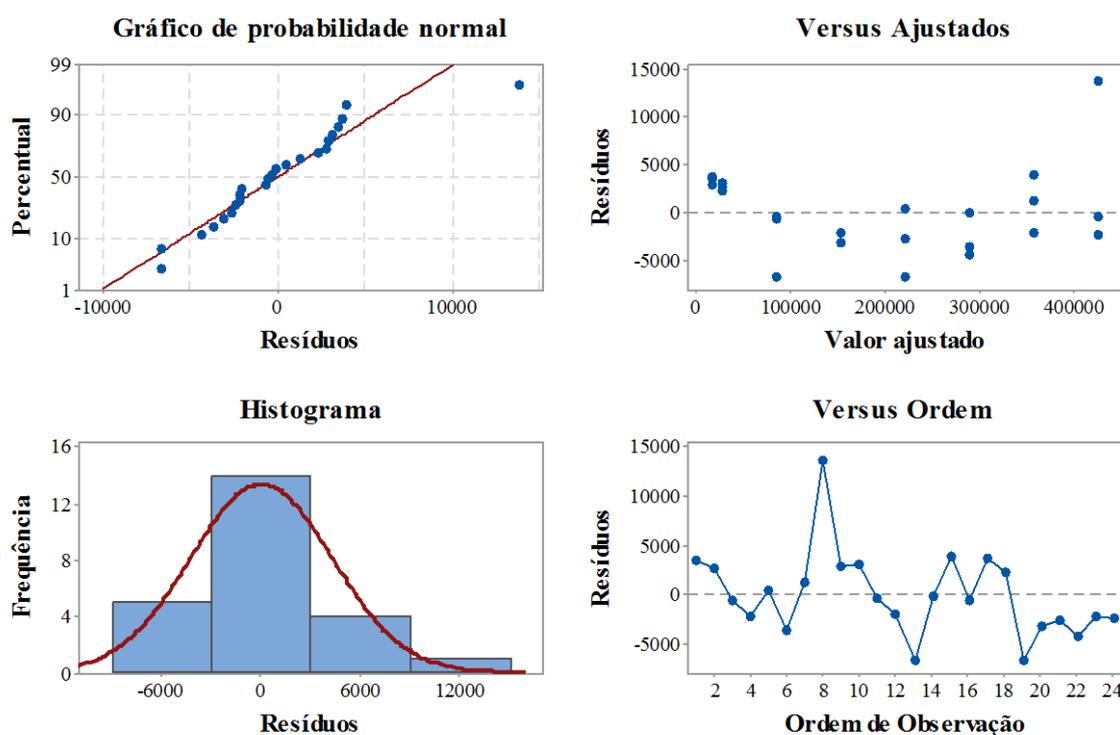
Fonte	gl	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	F crítico	Valor-P
Modelo SQ reg	1	4,91x10 <sup>11</sup>	4,91 x10 <sup>11</sup>	25695,6	4,301	0,000
Residual SQ res	22	420115510	19096160	Curva Linear*		
Falta de ajuste SQ faj	6	182569747	30428291	2,05	2,741	0,118
Erro puro SQ erp	16	237545763	14846610	Não há falta de ajuste**		
Total SQ tot	23	4,91E+11				

SQ = Soma Quadrática; gl = Graus de Liberdade; MQ = Média Quadrática.

\* Regressão Estatisticamente Significativa.

\*\* Proporcionando uma curva linear.

**Figura 7** – Gráfico exploratório dos resíduos da regressão da curva analítica de calibração da quercetina (0,4 µg/mL a 7,6 µg/mL).



Fonte: Dados da Pesquisa

### 5.1.3 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

Através dos valores da curva analítica de calibração, os limites de detecção e quantificação foram determinados teoricamente por extrapolação matemática da curva. O limite de detecção foi calculado conforme a Equação 4.1 e obteve-se o valor de 0,18 µg/mL. O limite de quantificação foi calculado conforme a Equação 4.2 e obteve-se o valor de 0,56 µg/mL.

### 5.1.4 Precisão

A repetitividade representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição, assim foram realizadas seis medições da mesma amostra, em diferentes preparações e a repetitividade foi expressa através do coeficiente de variação (RIBANI *et al*, 2004).

Como observado nas Tabelas 6 e 7, os valores do coeficiente de variação para a precisão das análises de quercetina apresentaram-se valores que variaram entre 0,8 e 5,3% que atendem aos critérios estabelecidos para reprodutibilidade do método (BRASIL, 2004).

Conforme a análise estatística utilizando ANOVA, o valor de F calculado foi de 3,326 e o P de 0,3145. Assim, não houve variação significativa entre os dados, pois valor de p foi acima de 0,05, e valores de F menores que os valores do F tabelado (5,05) quando n=6, dessa forma, a dispersão dos resultados para a análise dos extratos, não apresentaram diferença significativa entre os diferentes dias.

**Tabela 6** - Resultados do teor de quercetina nos extratos hidroalcoólico de *M. urundeuva* nas repetições intra-corrida.

Amostras	Intra-dia	
	Área encontrada	Conc. (µg/mL)
1	179685	29,50
2	183386	30,11
3	174269	28,61
4	173076	28,42
5	174906	28,72
6	174493	28,65
Média	176636	29,41
DP	4017,9	0,66
CV %	2,3	2,3

DP: Desvio padrão. CV: Coeficiente de Variação.

**Tabela 7** - Coeficiente de variância em porcentagem inter-corridas dos Estudos por CLAE da quercetina nos extratos hidroalcoólicos de *M. urundeuva*.

Dias	Inter-dias		
	Médias das áreas $\pm$ DP	Conc. ( $\mu\text{g/mL}$ )	CV %
01	178502 $\pm$ 1441,9	29,3 $\pm$ 0,24	0,8
02	176636 $\pm$ 4018	29,4 $\pm$ 0,66	2,3
03	180557 $\pm$ 9540	29,8 $\pm$ 1,6	5,3

DP: Desvio padrão. CV: Coeficiente de Variação.

### 5.1.5 Exatidão

A tabela 8 mostra os resultados obtidos para a recuperação do padrão quercetina adicionado às amostras dos extratos. O parâmetro exatidão avalia a proximidade dos resultados médios obtidos em um determinado ensaio em relação ao valor verdadeiro, ou seja, avalia a recuperação da substância analisada diante dos interferentes da matriz da amostra. Foram considerados três níveis: baixo (20%), médio (100%) e alto (180%) de adição de quantidades conhecidas de quercetina SQR a partir da concentração obtida na precisão (Tabela 6 e 7).

Os resultados mostram adequabilidade do método em relação à exatidão, pois os valores médios de recuperação foram compatíveis com os valores admitidos (95,0 a 105,0%) para a recuperação segundo a Resolução nº 899 de 2003 da ANVISA (BRASIL, 2003).

**Tabela 8** - Resultados para a recuperação do padrão de quercetina adicionado às amostras do extrato hidroalcoólico de *M. urundeuva*.

Nível (%)	CT ( $\mu\text{g/mL}$ )	CR ( $\mu\text{g/mL}$ )	Rec. (%)	CV (%)
20	34,9	34,4 $\pm$ 0,5	98,4	2,1
100	57,3	57,5 $\pm$ 1,3	100,7	2,8
180	80,5	78,2 $\pm$ 0,9	97,1	2,67

CT: Concentração teórica; CR: Concentração Real, DP: Desvio padrão; Rec.: Recuperação; CV: Coeficiente de Variação.

### 5.1.6 Robustez

Os resultados do teste de robustez do método analítico para o extrato líquido de *M. urundeuva* estão dispostos na Tabela 9. De acordo com resultados, as alterações na temperatura de forno, pH e fluxo do solvente não apresentaram variações significativas, quando comparados à metodologia proposta ( $p > 0,05$ ). Com intervalo de confiança de 95%, referente aos valores médios obtidos o método pode ser considerado robusto em relação às variáveis analisadas.

**Tabela 9** - Dados para avaliação da robustez considerando alterações da temperatura, fluxo da fase móvel e o pH para determinação do teor de quercetina em extratos hidroalcoólicos de *M. urundeuva* utilizando CLAE.

Condição	Área média	Concentração média		** CV %	* <i>p-value</i>	
		µg/mL	%			
Temperatura	38	187439	31,9	108,5	3,9	0,35
	40	180717	29,8	101,4		
	42	180542	31,9	108,5		
Fluxo	1,1 mL/min	180292	29,1	100,7	1,2	0,24
	1,2 mL/min	180717	29,8	101,4		
	1,3 mL/min	166743	30,3	103,1		
pH	1,5	179825	30,6	104,1	0,4	0,89
	1,6	180717	29,8	101,4		
	1,7	179935	29,9	101,7		

\*Valores estatisticamente diferentes para *p-value* < 0,05 (n = 21) Valores médios (n = 3 para cada condição).

\*\* CV% (Coeficiente médio de variação).

### 5.1.7 Estabilidade

A tabela 10 apresenta as variações definidas pela estabilidade das amostras após um período de 24 h. Os dados de estabilidade mostram que até 24 horas houve estabilidade da amostra mantida a temperatura ambiente, não comprometendo a eficiência do método. Os cálculos estatísticos realizados pela Anova (Análise de Variância) não demonstraram diferenças significativas entre os resultados da amostra no tempo 0 e 24 horas.

**Tabela 10** - Avaliação da Estabilidade do extrato hidroalcoólico no período de 24 horas.

Tempo	Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ ) $\pm$ DP		
		CV%	Valor de p <sup>*</sup>
0h	29,4 $\pm$ 0,75	2,6%	0,67
24h	29,6 $\pm$ 0,82	2,8%	

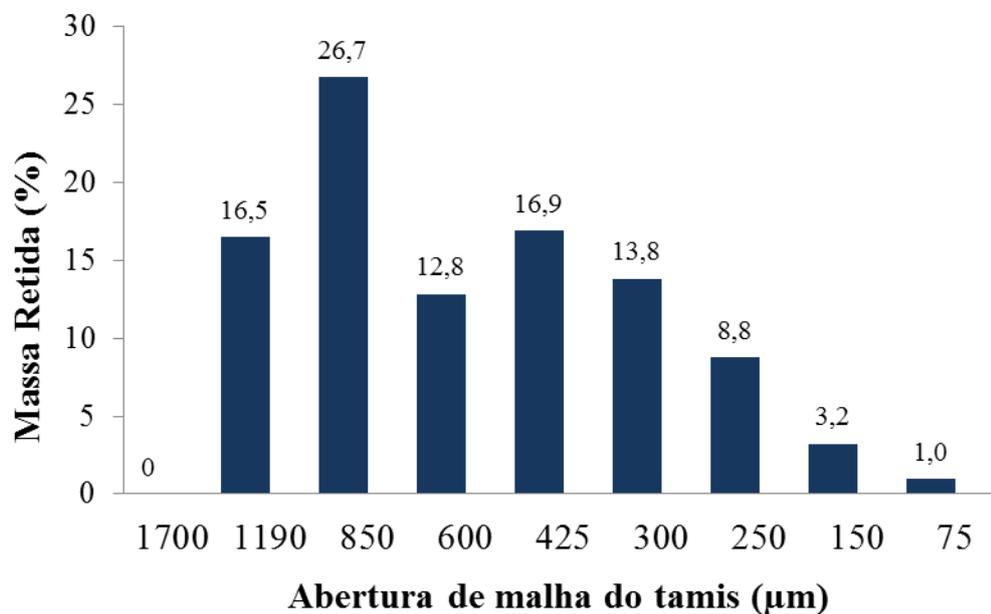
DP: Desvio padrão; Rec.: Recuperação; CV: Coeficiente de Variação.\*Valor de significância de  $p < 0,05$

## 5.2 Obtenção do Extrato seco de *M. urundeuva* por *spray-dryer*

### 5.2.1 Análise do tamanho de partículas do material vegetal e Avaliação do sistema de solventes para obtenção do extrato hidroalcoólico

A análise granulométrica do material vegetal por tamisação demonstrou que a maior parte das partículas ficou retidas na malha de 0,850 mm (Figura 8). De acordo com a Farmacopeia brasileira (2010) o material vegetal se encontra na classe de pó grosso, cujas 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  $\mu\text{m}$ . A avaliação granulométrica do material moído é uma etapa importante da padronização, pois o tamanho de partícula pode influenciar a eficiência do processo extrativo, pois partículas finas favorecem absorção do líquido extrator e aumentam a eficiência da extração e partículas de alta granulometria não apresentam grande superfície de contato o que diminui a eficiência da extração (SIMÕES et al., 2007; PÉRTILE, 2007).

**Figura 8** – Distribuição granulométrica das folhas coletadas, secas e moídas de *M. urundeuva*.



Fonte: Dados da Pesquisa

A quantificação do marcador quercetina nas análises realizadas nos extratos de *M. urundeuva* foi realizada utilizando método analítico por CLAE-DAD previamente validado, como está descrito na seção 4.4 desse trabalho.

A Tabela 11 mostra os resultados da avaliação do sistema de extração relacionados à proporção de solventes (etanol:água) utilizado na obtenção do extrato hidroalcolólico de *M. urundeuva*. O sistema de solvente que proporcionou a maior extração da quercetina foi o sistema etanol em água na proporção de 50% (v/v). Alguns trabalhos têm demonstrado que a extração de flavonóides de diferentes matrizes vegetais tem sido eficiente na combinação de etanol em água na proporção que varia de 50% a 70% (v/v) (COLOMBO, 2003; AGUIAR *et al.*, 2007; MACHADO, 2011; SOUZA-SARTORI *et al.*, 2013).

**Tabela 11** - Avaliação do sistema de solventes na obtenção do extrato hidroalcoólico de *M. urundeuva*.

<b>Proporção Etanol:Água</b>	<b>Massa da droga Vegetal/ sistema de solvente</b>	<b>Quercetina (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>CV %</b>
30%	200g/1000mL	$43,7 \pm 1,0$	2,3
50%	200g/1000mL	$56,1 \pm 1,9$	3,5
70%	200g/1000mL	$37,1 \pm 1,3$	4,3

Dados expressos como Média  $\pm$  DP (Desvio Padrão) (n= 3).

Para avaliar a influência do tamanho de partícula na concentração da quercetina, foram obtidos extratos líquidos com a droga vegetal obtida em sistema de tamis de malhas de 355, 250, 150 e 75  $\mu\text{m}$  utilizando o sistema de solvente Etanol: Água, 50% (v/v) (Tabela 12). Os resultados mostraram que a redução do tamanho de partícula da droga vegetal de *M. urundeuva* resultou em extratos hidroalcoólicos com maiores teores de quercetina, tendo em vista que o aumento de superfície de partículas favoreceu seu contato com o líquido extrator e a maior extração dos constituintes da planta.

**Tabela 12** - Avaliação da influência do tamanho de partícula no processo de extração de *M. urundeuva*.

<b>Tamanho de Partícula (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Massa droga vegetal/sistema de solvente</b>	<b>Quercetina (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>CV %</b>
355	200g/1000mL	$22,9 \pm 0,7$	3,1
250	200g/1000mL	$22,5 \pm 0,5$	2,3
140	200g/1000mL	$38,8 \pm 1,5$	3,9
75	200g/1000mL	$72,6 \pm 2,3$	3,2

Dados expressos como Média  $\pm$  DP (Desvio Padrão) (n= 3). CV: Coeficiente de variação.

### 5.2.2 Avaliação dos Parâmetros de secagem por *spray-dryer*

A Tabela 13 apresenta os resultados referentes ao planejamento fatorial  $2^{3+1}$  envolvendo os seguintes parâmetros de secagem: Proporção do CSD, Temperatura de entrada e Razão do fluxo de alimentação. As variações nos parâmetros de secagem utilizados corroboram com valores encontrados na literatura para secagem de produtos vegetais (GALLO et al., 2011; CORTÉS-ROJAS et al., 2015).

De acordo com os resultados, as variações nos parâmetros de secagem avaliados não resultaram em grandes alterações nos rendimentos e teores de quercetina nos produtos nebulizados obtidos, de modo que qualquer uma dessas condições poderia ser utilizada para obtenção de extratos secos de *M. urundeuva*.

**Tabela 13** - Avaliação de Processo Extrativo em Função dos Parâmetros de Secagem do extrato *M. urundeuva*.

<b>Parâmetros de Secagem Spray Dryer* (%CSD/Temperatura/Fluxo)</b>	<b>Rendimento (%) *</b>	<b>Quercetina (µg/mL)**</b>	<b>CV (%)</b>
20% 160°C 8mL/min	37,94%	20,1	2,2
20% 160°C 4 mL/min	37,13%	19,8	0,8
20% 180°C 8 mL/min	41,16%	20,8	0,8
15% 170°C 6 mL/min	39,48%	21,4	5,3
10% 180°C 4 mL/min	40,87%	23,3	6,0
20% 180°C 4 mL/min	40,90%	20,8	4,6
10% 180°C 8 mL/min	39,06%	23,0	3,2
10% 160°C 4 mL/min	42,69%	23,2	2,5
10% 160°C 8 mL/min	44,51%	21,7	1,9

\*Media do Rendimento do Extrato Nebulizado (N=3) \*\* Concentração média do extrato nebulizado ( N=3). As concentrações referem-se às médias de 3 experimentos para cada condição. CV: Coeficiente de variação.

Para avaliar o efeito dos fatores sobre o rendimento e a concentração de quercetina no extrato seco de *M. urundeuva*, foram realizadas análises estatísticas por ANOVA e regressão linear múltipla empregando a metodologia de superfície de resposta. Foi estabelecido como

parâmetro significativo  $p < 0,05$  e negligenciados os que apresentaram nível de significância  $p > 0,05$ . O principal objetivo da aplicação da ANOVA é comparar a variação das repostas pelo planejamento com a variação devido aos erros randômicos inerentes à mensuração dessas repostas, a partir desta comparação, é possível avaliar a significância da regressão usada para prever repostas, considerando a variabilidade experimental (BEZERRA *et al.*, 2008; SOUSA, 2014). Um sumário com os principais efeitos e seus valores de significância está disposto na Tabela 14.

Os dados obtidos através da análise de planejamento fatorial foram determinados através do modelo de superfície-resposta que é classificado como um método do tipo simultâneo, onde as variáveis de interesse que realmente apresentam influências significativas na resposta são avaliadas ao mesmo tempo, além de possibilitar uma avaliação ampla de todos os efeitos estimados.

**Tabela 14** - Sumário dos efeitos das variáveis independentes e suas significâncias (ANOVA) sobre as repostas analisadas no planejamento fatorial de obtenção de extrato seco de *M. urundeuva* por *spray-dryer*.

Variáveis independentes	<i>p-value</i>	
	Rendimento	Teor de quercetina
Temperatura	0,464907	<b>0,000340</b>
Fluxo	0,767776	<b>0,006605</b>
%CSD	0,367157	0,207443
Temperatura *Fluxo	0,470684	<b>0,000285</b>
Temperatura *%CSD	0,685150	<b>0,000035</b>
Fluxo*%CSD	0,301538	0,263401
Temperatura*Fluxo*%CSD	0,797260	<b>0,010428</b>

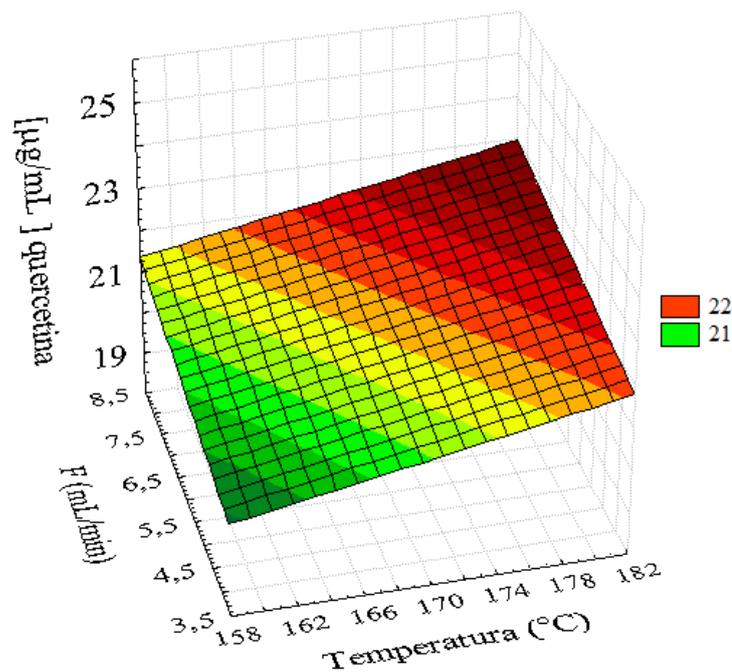
Como apresentado na Tabela 14, as variáveis independentes, temperatura de secagem, fluxo de alimentação e proporção de CSD, não afetaram o rendimento do processo de maneira significativa ( $p \geq 0,05$ ). No entanto, a temperatura de secagem e o fluxo de alimentação influenciaram significativamente à concentração da quercetina ( $p \leq 0,05$ ).

A análise da superfície de resposta dos dados de concentração da quercetina nos extratos secos mostrou que à medida que a temperatura aumentou em associação com um aumento na taxa

de alimentação do material de entrada, a concentração de quercetina também aumentou (Figura 9). Isto indicou que a uma temperatura de 180 °C e uma taxa de alimentação de 8 mL/min resultou em um aumento na eficiência de secagem. Durante o processo de secagem de extratos vegetais, o aumento da temperatura geralmente reduz a tensão superficial e a viscosidade do material de entrada, facilitando a formação de gotículas e resultando em produtos de maior qualidade (SOARES, 2002; CORTÉS-ROJAS et al, 2015). O ajuste adequado da velocidade de alimentação permite que as gotas evaporem antes de entrarem em contato com as paredes da câmara de secagem, impedindo a acumulação de material nas paredes da câmara (MASTERS,1985; RANKELL et al., 2001).

As interações secundárias também foram observadas entre os fatores temperatura de entrada e proporção de CSD ( $p \leq 0,05$ ), o que pode ter ocorrido porque a variável temperatura apresentou alta significância e a proporção de CSD, ao reagir, sofre o efeito desta variável tornando esta interação significativa. Isso também foi encontrado ao avaliar a interação terciária dos três fatores que foram significativos ( $p \leq 0,05$ ), devido às variáveis significativas: temperatura de secagem e fluxo de alimentação (CARDOSO, 2013).

**Figura 9** - Gráfico de superfície de resposta da concentração de quercetina em função da temperatura (°C) e do fluxo de alimentação (mL/min).



Fonte: Dados da Pesquisa

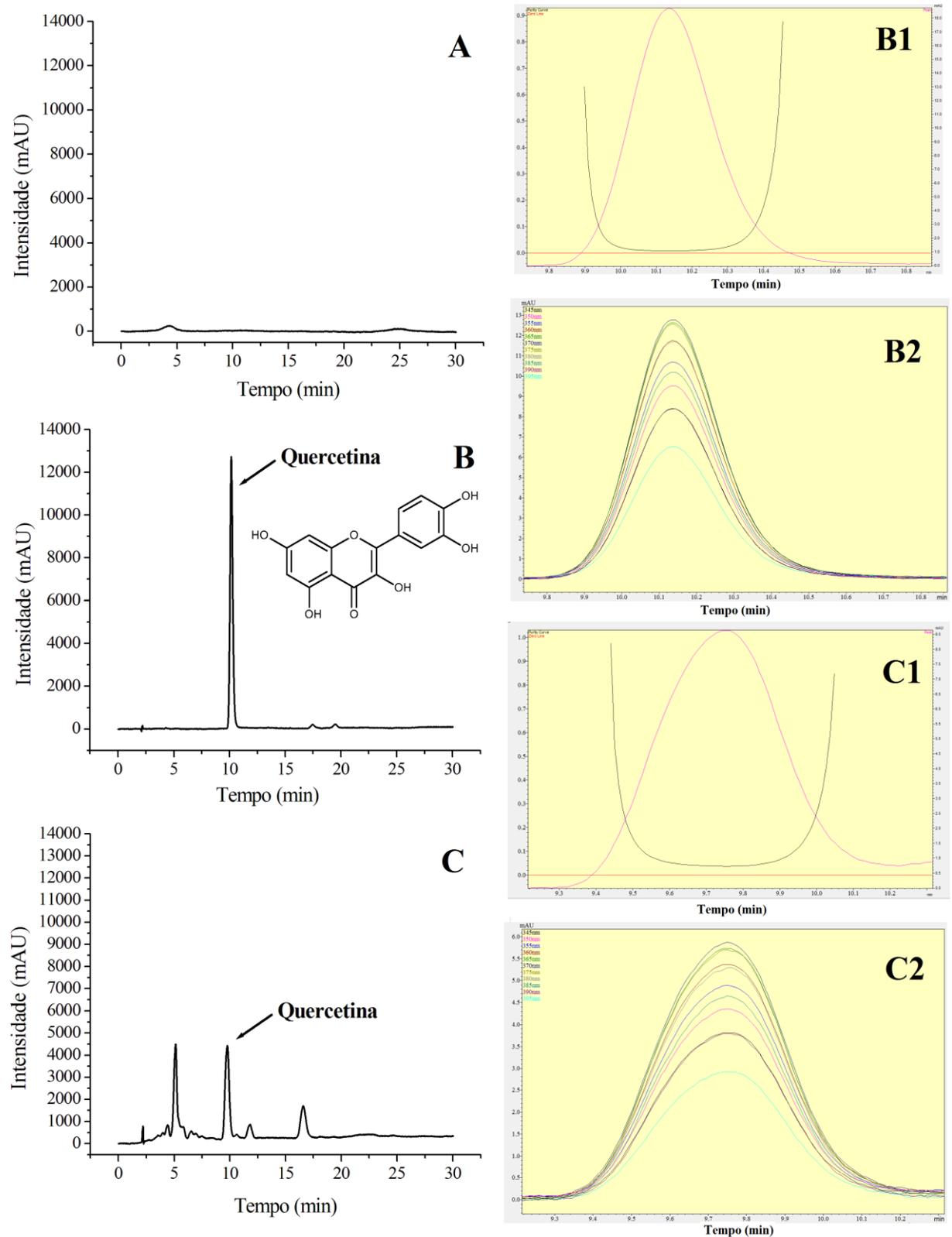
Os aumentos da temperatura e do fluxo de alimentação favoreceram o aumento da concentração de quercetina nos extratos secos, enquanto que a proporção de CSD não teve influência significativa. Assim, o extrato seco de *M. urundeuva Allemão* obtido na condição 10% 180°C 8 mL/min, foi escolhido para a Co-validação do método analítico de identificação e quantificação da quercetina nos extratos secos por CLAE-DAD, para as análises de caracterização térmica e estudos de compatibilidade das misturas binárias com excipientes farmacêuticos por TG e DTA, para realizar os estudos de estabilidade acelerada e para a avaliação da atividade anti-inflamatória.

### **5.2.3 Doseamento da quercetina nos extratos secos padronizados de *M. urundeuva*.**

O método apresentou-se específico para a quantificação da quercetina nos extratos secos, uma vez que se observou a pureza do pico da quercetina comparando-se o cromatograma de varredura do extrato seco (Figura 10C) com o do padrão (Figura 10B) com tempos de retenção 9,7 e 10,2 minutos, respectivamente. O sistema de solvente utilizado, metanol e ácido fosfórico a 1% (47%:53%) (v/v) (Figura 10C) não apresentou pico no tempo equivalente ao tempo de retenção da quercetina.

Os espectros DAD da quercetina e do extrato seco evidenciaram a pureza dos picos da quercetina em 370 nm com um índice de pureza de pico de 0,99 (Figura 10C1), e em outros comprimentos de onda (Figura 10C2), confirmando a capacidade do método de determinar a quercetina na presença de compostos da matriz vegetal.

**Figura 10** - Perfis Cromatográficos em 370 nm: da fase móvel (Etanol:água pH 1.6) (A), do padrão quercetina (B) e dos seus espectros DAD de pureza do pico da quercetina (B1, em 370 nm e B2 em outros comprimentos de onda) e da amostra do extrato seco de *M. urundeuva* (C) e dos seus espectros DAD de pureza do pico da quercetina (C1, em 370 nm e C2, em outros comprimentos de onda).



Fonte: Dados da Pesquisa

O intervalo de trabalho estabelecido na co-validação do extrato seco apresentou-se dentro da faixa de concentração de 0,4 µg/mL a 7,6 µg/mL conforme foi apresentado na Tabela 2. A equação de regressão linear da curva média foi  $y = 56948x - 6354,1$ , onde  $y$  é a área do pico da quercetina e  $x$  a sua concentração. A análise de regressão linear demonstrou um coeficiente de correlação  $R^2 = 0,9996$  valor que comprova a linearidade do método de acordo com os dados da metodologia validada para o extrato hidroalcoólico de *M. urundeuva* Allemão na seção 4.4 deste trabalho.

A precisão intra-dia ou repetibilidade do método foi comprovada, uma vez que o coeficiente de variação entre as seis replicatas do extrato seco foi de 3,7% (Tabela 15), portanto menor que o valor preconizado de 5% (BRASIL, 2003).

**Tabela 15** - Determinação do teor de quercetina no extrato seco de *M. urundeuva*.

Amostra	Área Pico	Extrato reconstituído Quercetina (µg/mL)	Extrato seco Quercetina (µg/g)
1	111488	17,0	283,12
2	104949	16,0	266,51
3	102213	15,6	259,56
4	101831	15,5	258,59
5	103076	15,7	261,76
6	101392	15,4	257,48
Media	104158	15,9	264,50
CV %	3,7	3,7	3,7

CV: Coeficiente de Variação.

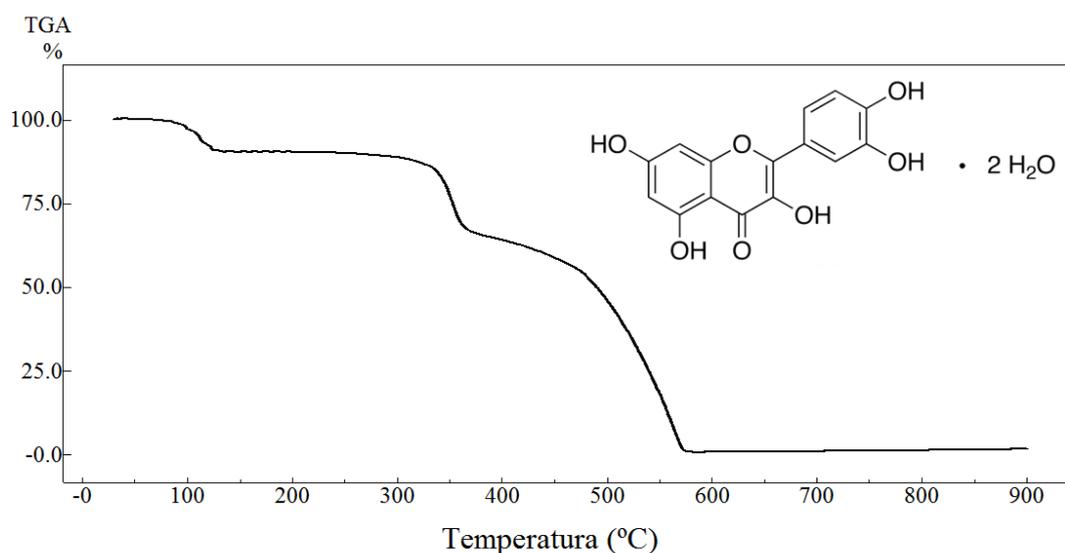
### 5.3 Análise do comportamento térmico e de compatibilidade dos extratos secos com excipientes farmacêuticos

#### 5.3.1 Análise por TG da quercetina

A figura 11 mostra a curva TG da quercetina na faixa de temperatura de 25–900°C e razão de aquecimento de 10°C/min. O perfil termogravimétrico da quercetina apresentou três etapas de perda de massa. Na primeira etapa a perda de massa foi  $\Delta m_1 = 9,2\%$  ( $T_{inicial} = 94,3$

°C e  $T_{final} = 122,2$  °C) que correspondeu, a desidratação da substância, já que o composto era na forma dihidratada. Na segunda etapa  $\Delta m_2 = 23,2\%$  ( $T_{inicial} = 249,7$  °C e  $T_{final} = 369,7$ °C) e na terceira etapa  $\Delta m_3 = 62,1\%$  ( $T_{inicial}=410,4$ °C e  $T_{final}= 574,8$ °C) corresponderam às etapas de decomposição térmica da quercetina. Os resultados foram semelhantes aos relatados na literatura (COSTA et al, 2002; SIMÕES et al, 2013). Assim a curva TG indicou que a amostra do padrão é termicamente estável até 249,7 °C, o que pode inferir que essa é a temperatura do ar de secagem máxima que pode ser aplicada ao extrato líquido de *M. urundeuva*, considerando apenas à estabilidade térmica da quercetina, pois essa substância é um composto polifenólico e possui reatividade com a matriz do extrato e sua estabilidade pode ser influenciada também por outros parâmetros de secagem.

**Figura 11** - Curva TG da quercetina Substância Química de Referência.



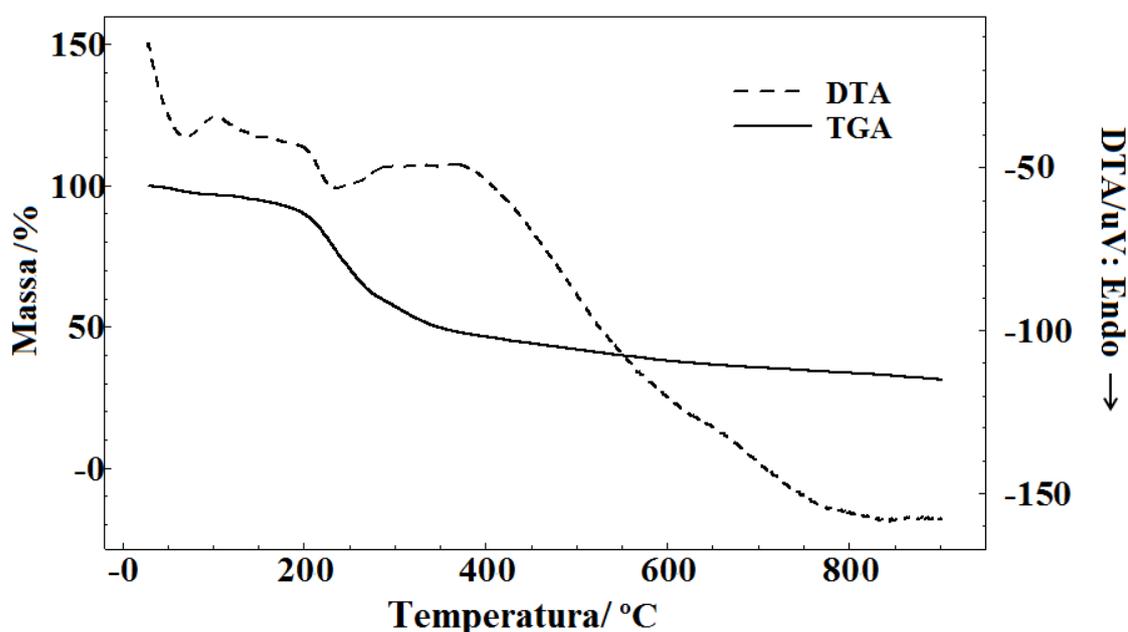
### 5.3.2 Análise de TG e DTA do extrato seco de *M. urundeuva*

As curvas TG foram obtidas com objetivo de avaliar a estabilidade térmica, composição e os resíduos dos extratos vegetais. A curva TG do extrato seco de *M. urundeuva* Allemão mostrou a ocorrência de quatro eventos de perda de massa (Figura 12). O primeiro ocorreu em uma faixa de temperatura de 41,8 a 103,1°C e a perda de massa foi de 2,9% que correspondeu, provavelmente, a desidrataação e perda de produtos voláteis presentes na

amostra vegetal. A curva DTA revelou a natureza endotérmica desse processo através de um pico em 69,0°C ( $\Delta H = 262,6 \text{ J/g}$ ). O segundo evento com perda de massa de 5,0% ocorreu em uma faixa de temperatura entre 105,1 e 189,5°C, correspondendo à primeira etapa de decomposição do extrato. A perda de massa mais significativa do extrato foi observada entre 193,5 e 267,0 °C, com perda de 29,7%. A curva DTA revelou a natureza endotérmica desse evento através de um pico em 235,8 °C ( $\Delta H = 568,5 \text{ J/g}$ ). Esse processo pode está associados à decomposição térmica de carboidratos e demais compostos orgânicos presentes na planta (ARAÚJO et al, 2006). Estudos fitoquímicos identificaram a presença de carboidratos, taninos, flavonóides, mono e sesquiterpenos, triterpenos e esteróides, proantocianidinas condensadas e leucoantocianidinas (MONTEIRO et al, 2005; SILVA, 2008) na espécie em estudo.

A quarta etapa de degradação com perda de massa de 13,5% ocorreu entre 280,5 e 372,5°C. Corresponde, provavelmente, à degradação de compostos mais estáveis e o início da formação de carboxilatos (COSTA et al, 2013; SAMPAIO et al, 2016). Foi observado um resíduo de 48,9 % que pode ser atribuído à massa do dióxido de sílica coloidal, que compõe 10% da amostra, e ao resíduo carboxilato e ao teor de cinzas que corresponde aos sais minerais presentes na amostra.

**Figura 12** - Curvas TG e DTA do extrato seco de *M. urundeuva*.



Fonte: Dados da Pesquisa

### 5.3.3 Análise de TG e DTA das misturas físicas dos extratos secos com excipientes farmacêuticos

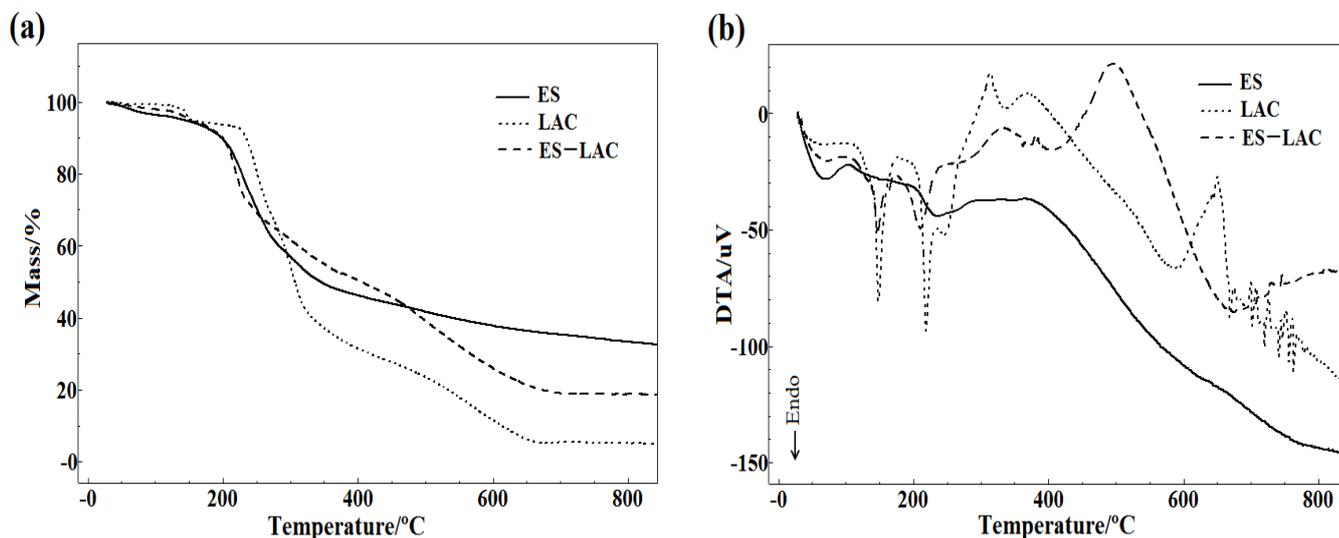
Estudos de pré-formulação durante o desenvolvimento de uma formulação incluem estudos de compatibilidade entre droga e excipientes, tendo em vista que essas interações podem afetar a natureza química da composição, as características físico-químicas e biofarmacêuticas da formulação e conseqüentemente sua segurança e eficácia, assim esses estudos contribuem para a seleção de excipientes que aumentam a probabilidade do desenvolvimento de uma formulação mais estável (MOYANO et al., 2009; TITA et al., 2011).

As curvas TG e DTA do ES de *M. urundeuva* Alemão e da mistura física com a Lactose são mostradas na Figura 13. A lactose é composta de partículas cristalinas brancas, utilizado como adjuvante farmacotécnico por sua ação aglutinante e diluente na produção de comprimidos e cápsulas. A forma mais comum, comercialmente disponível, é a alfa-lactose monoidratada (KIBBE, 2000).

A curva DTA da lactose (Figura 13b) mostrou dois picos endotérmicos. O primeiro pico está relacionado ao processo de desidratação da LAC que ocorreu em 148,6 °C ( $\Delta H = 1,1$  kJ/g) e também foi verificado na curva TG com uma perda de massa de 4,6% ( $T_{\text{onset}} = 141,1$  °C e  $T_{\text{endset}} = 150,1$  °C) atribuída à lactose monohidratada que apresenta estequiometricamente 5% de água (FIGURA, 1993). O segundo pico mostrou a fusão da LAC em 219,2 ( $\Delta H=566,4$  J/g) e em seguida ocorreu o processo de decomposição térmica do excipiente confirmada pela curva TG com duas etapas de perda de massa de 15,2% ( $T_{\text{onset}} = 236,5$  °C e  $T_{\text{endset}} = 252,8$  °C) e 31,2% ( $T_{\text{onset}} = 302,6$  °C e  $T_{\text{endset}} = 314,5$  °C).

O comportamento térmico da mistura física do ES-LAC foi semelhante aos perfis das amostras ES e LAC individuais (Figura 13). A curva DTA da mistura apresentou um evento endotérmico entre 72,4 e 80,7°C ( $\Delta H = 45,5$  J/g) correspondente perda de água e componentes voláteis da mistura como foi observado no ES e também na LAC. Foi observado um pico endotérmico em 147,1°C ( $\Delta H = 45,5$  J/g) que foi verificado na curva TG com uma perda de massa de 3,4% ( $T_{\text{onset}} = 136,2$  °C e  $T_{\text{endset}} = 148,2$  °C). Outro pico endotérmico foi observado em 210,1°C ( $\Delta H = 694,2$  J/g) correspondendo na curva TG a uma etapa de decomposição térmica da mistura com uma perda de massa de 19,8% ( $T_{\text{onset}} = 205,4$  °C e  $T_{\text{endset}} = 225,2$  °C). Assim a mistura ES-LAC apresentou os eventos térmicos resultante do ES e da LAC individuais, indicando que não houve aparente incompatibilidade entre a LAC e o ES.

**Figura 13** - Curvas TG e DTA do extrato seco de *M. urundeuva* (ES), da Lactose (LAC) e mistura binária 1:1, (ES+LAC).



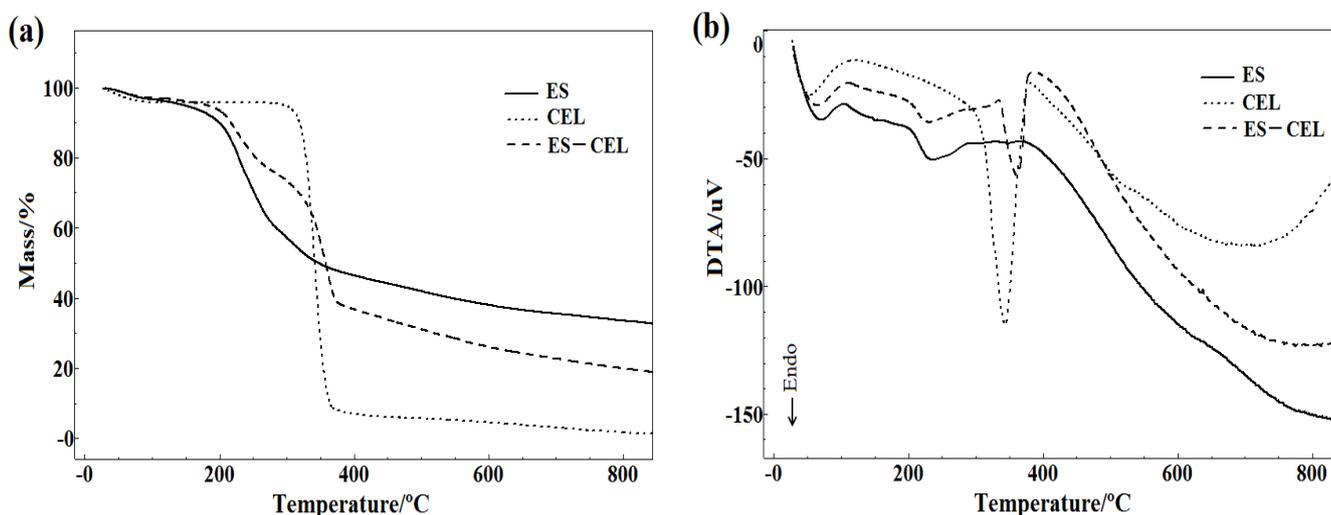
Fonte: Dados da Pesquisa

A celulose microcristalina apresenta-se como um pó cristalino branco, muito utilizado em formulações farmacêuticas sólidas como diluente, agente ligante, agente suspensor, lubrificante, desintegrante e adsorvente (KIBBE, 2000, MIHRANYAN et al, 2004). As curvas TG e DTA do ES de *M. urundeuva* Alemão e da mistura física com a celulose microcristalina PH-102 são mostradas na Figura 14. A curva DTA da celulose (Figura 14b) apresentou um pico endotérmico largo em 54,6°C ( $\Delta H = 618,3$  J/g) que correspondeu à eliminação da água superficial do excipiente e um pico endotérmico correspondente à depolimerização e decomposição térmica da CEL em 343,4°C ( $\Delta H = 3,99$  kJ/g). A curva TG mostrou a perda de água da CEL com perda de massa de 2,8% ( $T_{\text{onset}} = 34,0^\circ\text{C}$ ,  $T_{\text{endset}} = 64,0^\circ\text{C}$ ) e o processo de decomposição térmica da CEL em uma única etapa com perda de massa de 87,6% ( $T_{\text{onset}} = 324,8^\circ\text{C}$ ,  $T_{\text{endset}} = 355,3^\circ\text{C}$ ). Os resultados foram semelhantes aos relatados na literatura (UESU et al, 2000; VERMA & GARG, 2005).

A curva DTA da mistura ES-CEL mostrou três eventos endotérmicos equivalentes na curva TG a três etapas de perda de massa (Figura 14a). O primeiro evento ocorreu entre 40,2 e 95,1°C ( $\Delta H = 327,5$  J/g) e na curva TG apresentou perda de massa de 2,3% ( $T_{\text{onset}} = 48,5^\circ\text{C}$  e  $T_{\text{endset}} = 79^\circ\text{C}$ ) correspondente à perda de água e componentes voláteis do ES como foi observado no ES e também na CEL. O segundo pico ocorreu em 229,3°C ( $\Delta H = 218,9$  J/g) e

na curva TG apresentou perda de massa de 16,6% ( $T_{\text{onset}} = 207,7^{\circ}\text{C}$  e  $T_{\text{endset}} = 235,6^{\circ}\text{C}$ ) correspondente à degradação do ES como foi observado. O terceiro pico ocorreu em  $360,5^{\circ}\text{C}$  ( $\Delta H = 1,1 \text{ kJ/g}$ ) e na curva TG apresentou perda de massa de 32,7% ( $T_{\text{onset}} = 339,1^{\circ}\text{C}$ ,  $T_{\text{endset}} = 368,2^{\circ}\text{C}$ ) correspondente à degradação do excipiente CEL como foi observado. Assim, os perfis térmicos das curvas TG e DTA da mistura ES-CEL podem ser considerados como uma sobreposição das curvas TG e DTA das amostras do ES e da CEL individuais evidenciando a ausência de incompatibilidade do extrato com esse excipiente.

**Figura 14** - Curvas TG e DTA do extrato seco de *M. urundeuva* (ES), da Celulose (CEL) e mistura binária 1:1, (ES+CEL).

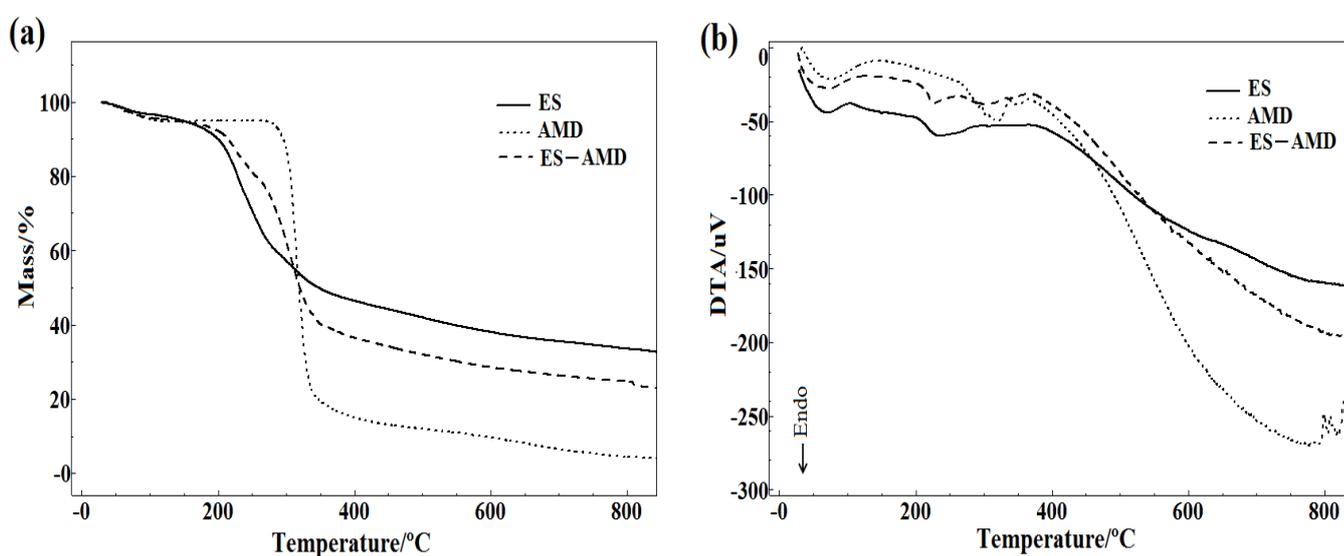


Fonte: Dados da Pesquisa

O amido é um biopolímero semicristalino utilizado como agente aglutinante, diluente e desintegrante em formas farmacêuticas sólidas (PINTO et al, 2012). As curvas TG e DTA do ES de *M. urundeuva* Alemão e da mistura física do ES com o Amido são mostradas na Figura 15. A curva DTA do AMD mostrou dois picos endotérmicos (Figura 15b). O primeiro em  $74,0^{\circ}\text{C}$  ( $\Delta H = 832 \text{ J/g}$ ) correspondeu à desidratação e gelatinização do excipiente com perda de massa na curva TG de 4,2% ( $T_{\text{onset}} = 52,2^{\circ}\text{C}$ ,  $T_{\text{endset}} = 94,4^{\circ}\text{C}$ ) e o segundo em  $320,1^{\circ}\text{C}$  ( $\Delta H = 3,99 \text{ kJ/g}$ ) correspondente à eliminação de grupos de polihidroxilas acompanhadas por despolimerização e decomposição do amido na curva TG com perda de massa de 73,8% ( $T_{\text{onset}} = 301,7^{\circ}\text{C}$  e  $T_{\text{endset}} = 329,2^{\circ}\text{C}$ ) (FORD & TIMMINS, 1989).

Não houve evidência de interação do ES com o AMD, uma vez que as curvas TG e DTA da mistura podem ser consideradas uma sobreposição das curvas do ES e do AMD individuais (Figura 15). A curva DTA da mistura apresentou um pico endotérmico 72,2°C ( $\Delta H = 409,6 \text{ J/g}$ ) atribuídos à desidratação da amostra como ocorreu em ES e AMD e um pico endotérmico em 226,5°C ( $\Delta H = 265,4 \text{ J/g}$ ), correspondente à degradação do ES. Foi observado ainda um evento endotérmico entre 271,6 e 327°C ( $\Delta H=314,8 \text{ J/g}$ ) que corresponde a degradação do AMD.

**Figura 15** - Curvas TG e DTA do extrato seco de *M. urundeuva* (ES), do Amido (AMD) e mistura binária 1:1, (ES+AMD).

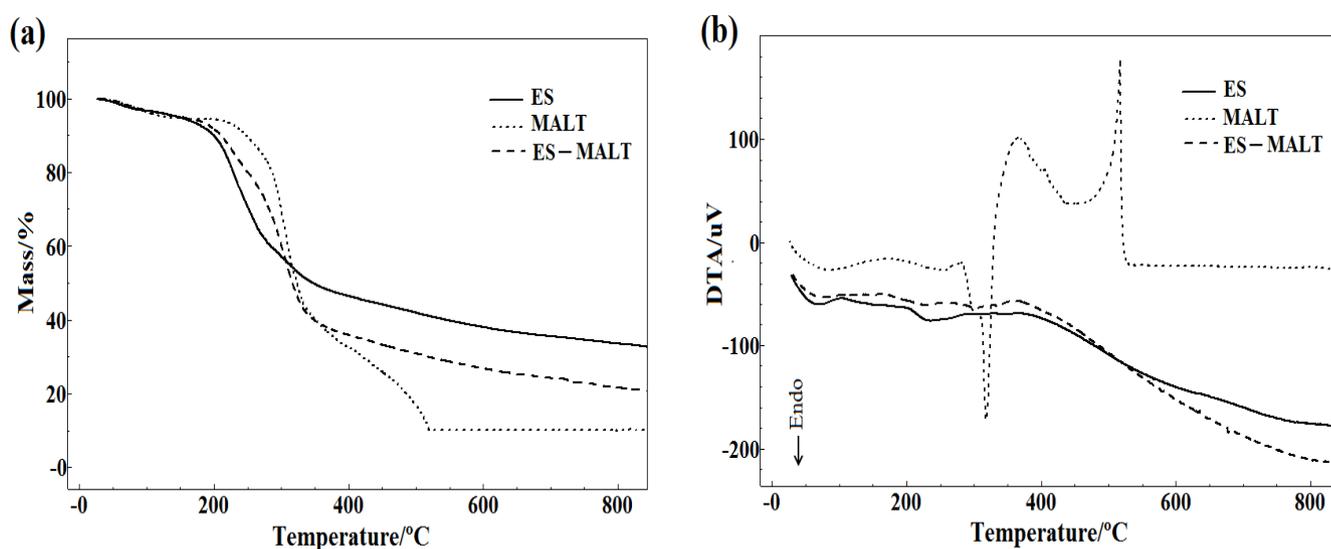


Fonte: Dados da Pesquisa

As curvas TG e DTA do ES de *M. urundeuva* Alemão e da mistura física com a Maltodextrina são mostradas na Figura 16. A curva DTA do excipiente MALT (Figura 16b) mostrou o primeiro evento endotérmico entre 43,9 e 147,6 °C ( $\Delta H = 1,1 \text{ kJ/g}$ ) e na curva TG apresentou perda de massa de 4,6% ( $T_{\text{onset}} = 46,5^\circ\text{C}$  e  $T_{\text{endset}} = 112,6^\circ\text{C}$ ) correspondendo à perda de água e processo de transição vítrea do excipiente (DESCAMPS et al 2009). O segundo evento ocorreu entre 225,3 e 275,1°C ( $\Delta H = 482,4 \text{ J/g}$ ) e na curva TG mostrou perda de massa de 11,3% ( $T_{\text{onset}} = 247,2^\circ\text{C}$  e  $T_{\text{endset}} = 278,6^\circ\text{C}$ ) correspondente à dextrinização do excipiente MALT (FORD & TIMMINS, 1989; OSORIO et al, 2010; OSORIO et al, 2011). O terceiro evento endotérmico mostrou um pico em 318,5°C ( $\Delta H = 4,1 \text{ kJ/g}$ ) e na curva TG

apresentou perda de massa de 37,5% ( $T_{\text{onset}} = 292,7^{\circ}\text{C}$ ,  $T_{\text{endset}} = 320,9^{\circ}\text{C}$ ) correspondente à depolimerização e decomposição do excipiente MALT. Foi observado ainda um evento exotérmico entre 506,9 e 519,1  $^{\circ}\text{C}$  ( $\Delta H = 3,3 \text{ kJ/g}$ ) podem está relacionados aos produtos gasosos como dióxido de carbono e monóxido de carbono resultante dos processos finais de degradação do MALT (FORD & TIMMINS, 1989).

**Figura 16** - Curvas TG e DTA do extrato seco de *M. urundeuva* (ES), da Maltodextrina (MALT) e mistura binária 1:1, (ES+MALT).



Fonte: Dados da Pesquisa

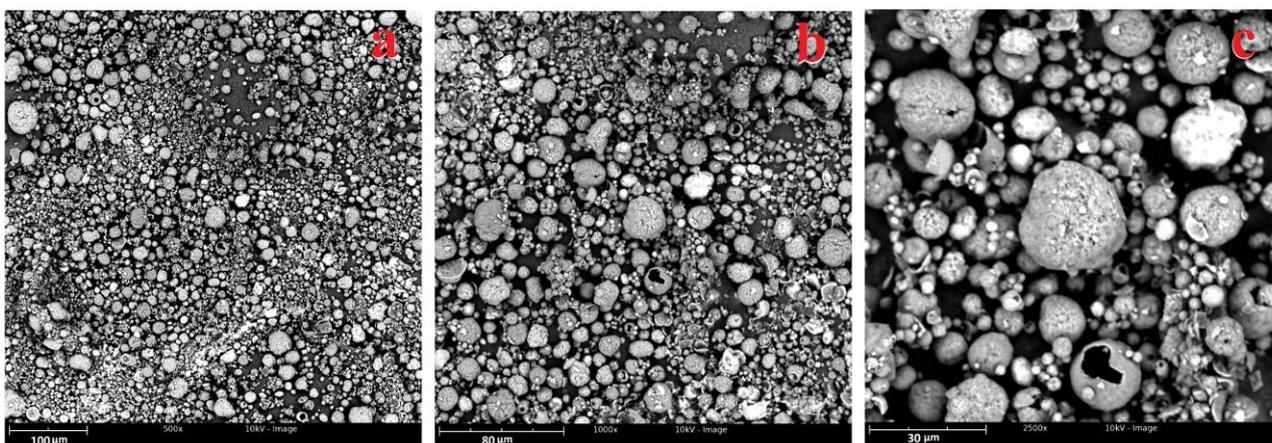
A curva de DTA da mistura do ES-MALT (Figura 16b) mostrou a ocorrência de três eventos endotérmicos. O primeiro evento ocorreu entre 66,6 e 101,8 $^{\circ}\text{C}$  ( $\Delta H = 269 \text{ J/g}$ ) correspondendo na curva TG a uma perda de massa de 4,8% ( $T_{\text{onset}} = 65,2^{\circ}\text{C}$  e  $T_{\text{endset}} = 95,1^{\circ}\text{C}$ ). Esse evento está relacionado à perda de produtos voláteis e desidratação da mistura, como foi observada na amostra do ES e também no excipiente. Os outros eventos endotérmicos correspondem na curva TG a duas etapas de perda de massa da mistura, a primeira de 15,6% ( $T_{\text{onset}} = 202,4^{\circ}\text{C}$  e  $T_{\text{endset}} = 224,6^{\circ}\text{C}$ ) e a segunda de 36,3% ( $T_{\text{onset}} = 283,8^{\circ}\text{C}$  e  $T_{\text{endset}} = 322,9^{\circ}\text{C}$ ), correspondendo à degradação do ES e da MALT que se sobrepõem. Os picos mais intensos, endotérmico e exotérmico, que foram observados na curva DTA da amostra de MALT não foram observados na mistura, indicando uma possível incompatibilidade térmica entre a MALT e o ES.

#### 5.4 Microscopia de Varredura Eletrônica (MEV)

A análise da morfologia das partículas dos extratos secos de *M. urundeuva* Alemão foi realizada por MEV e as imagens são apresentadas na Figura 17. Pode-se observar que as partículas apresentaram formas esféricas, com tamanhos irregulares e superfícies rugosas.

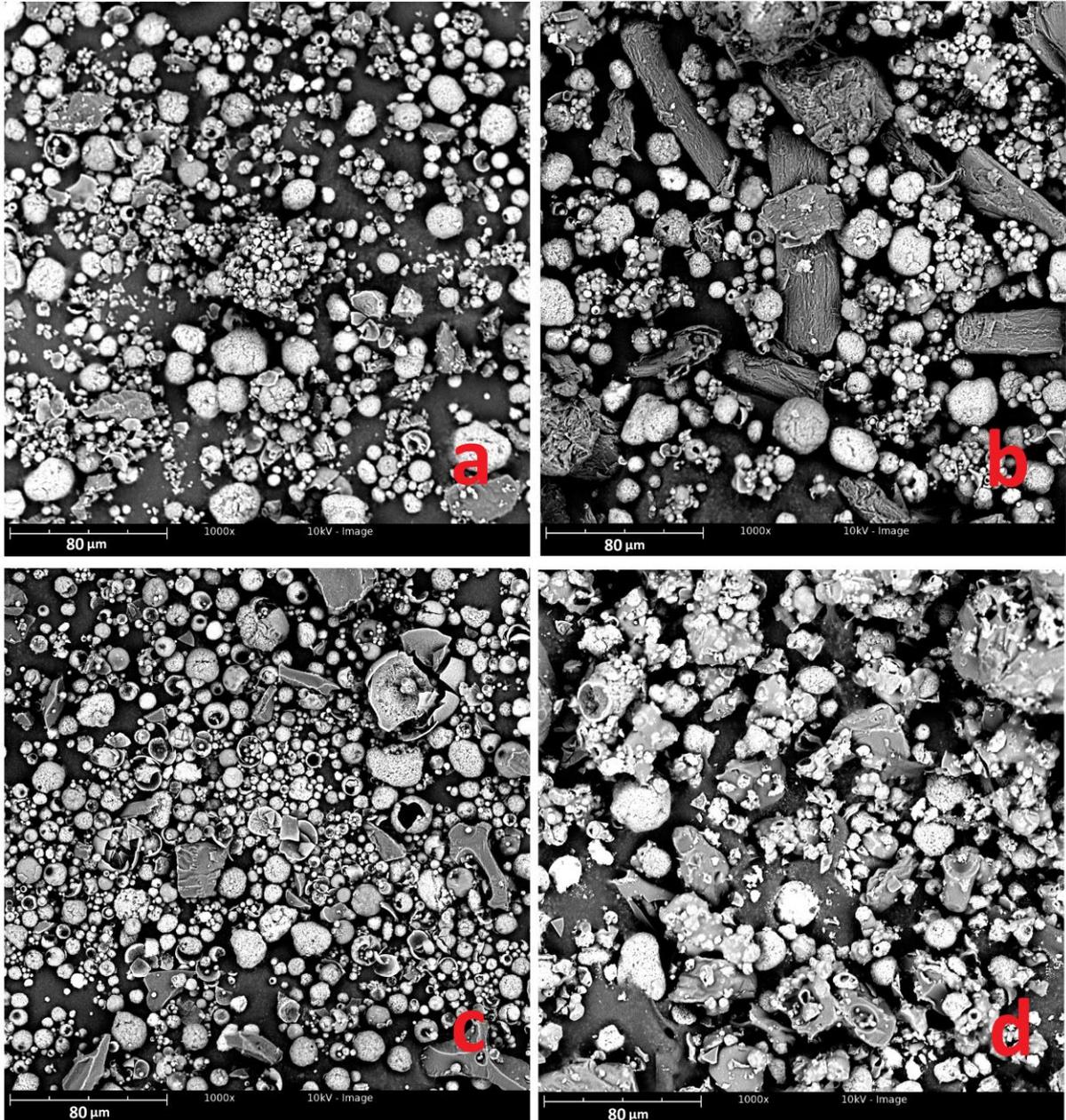
A análise das imagens do MEV das misturas físicas mostrou que as partículas do extrato seco mantiveram sua morfologia esférica e apareceram uniformemente dispersas nas partículas dos excipientes lactose monohidratada, amido pré-gelatinizado, celulose microcristalina e maltodextrina (Figura 18).

**Figura 17** – Imagens por MEV do extrato seco de *M. urundeuva* obtido por *spray-dryer* em (a) 500x, (b) 1000x e (c) 2500x.



Fonte: Dados da Pesquisa

**Figura 18** - Imagens por MEV em 1000x das misturas físicas 1:1 m/m dos extratos secos de *M. urundeuva* com excipientes farmacêuticos: (a) Lactose, (b) Celulose, (c) Amido e (d) Maltodextrina.



Fonte: Dados da Pesquisa

## 5.5 Estudos de Estabilidade Acelerada

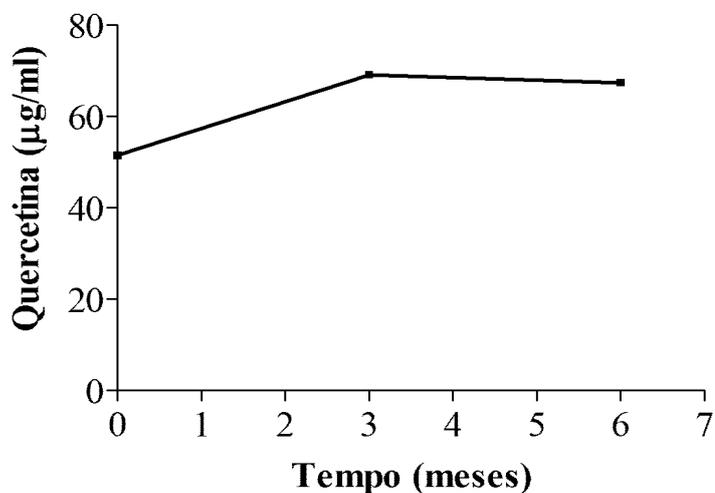
### 5.5.1 Estudo de Estabilidade Acelerada dos Extratos secos de *M. urundeuva*

Um estudo de estabilidade acelerado foi realizado para melhor caracterizar o extrato seco de *M. urundeuva* e monitorar o marcador quercetina por um maior período de tempo. A estabilidade dos produtos farmacêuticos é essencial para avaliar a manutenção da qualidade e eficácia dos produtos durante o período e as condições de armazenamento, especialmente de produtos vegetais que são mais suscetíveis a alterações físicas, químicas e microbiológicas.

A escolha do biomarcador adequado para avaliar a estabilidade de produtos naturais é fundamental para a garantia da qualidade desses produtos durante seu armazenamento. Cortés-Rojas et al (2016) avaliaram a estabilidade de extratos secos de *Bidens pilosa* L. por 12 meses monitorando dois flavonóides, rutina e hiperósido e um poliacetileno, demonstrando a influencia das condições de armazenamento na degradação desses compostos. Outro estudo demonstrou a diminuição de compostos fenólicos em extratos secos de *Myrica rubra* Sieb. et Zucc em um período de 6 meses quando armazenados a 40°C (FANG et al., 2011).

A figura 19 mostra as concentrações de quercetina em amostras de extratos armazenadas a uma temperatura de 40°C ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ) durante o período do teste de estabilidade de 6 meses. Houve um aumento no valor da concentração de quercetina após 3 meses (69,2  $\mu\text{g/mL}$ ) em comparação com a concentração inicial (51,5  $\mu\text{g/mL}$ ), e depois a concentração permaneceu estável (67,4  $\mu\text{g/mL}$ ) após 6 meses. Isso pode ter ocorrido devido à evaporação de componentes voláteis presentes no extrato e perda de umidade resultando em aumento da concentração de quercetina (FLORENCE & ATTWOOD, 2006). Assim, este estudo indicou que o processo de secagem por *spray-dryer* resultou em extratos secos estáveis em relação à preservação de seus constituintes químicos e a quercetina apresentou características físicas e químicas estáveis, mostrando ser um biomarcador adequado para o monitoramento dos processos estudados.

**Figura 19** – Concentração de quercetina no extrato seco de *M. urundeuva* durante o estudo de estabilidade acelerada ( $n = 3/\text{grupo}$ ).



Fonte: Dados da Pesquisa

### 5.5.2 Estudo de Estabilidade Acelerada das misturas físicas dos extratos secos com excipientes farmacêuticos

O desenvolvimento e a produção de fitoterápicos nas formas farmacêuticas sólidas são complexos e inclui a avaliação de excipientes de modo a obter um produto dentro das especificações de qualidade, eficácia e segurança requeridos. Os extratos secos vegetais, geralmente, apresentam problemas tecnológicos quanto ao fluxo de pó, uniformidade de conteúdo, higroscopicidade, e requerem o uso de excipientes e processos para a formulação de produtos adequados para o uso industrial (PALMA et al., 2002; ALVES et al., 2011; KLEIN et al., 2013). No estudo de estabilidade a concentração de quercetina foi monitorada para avaliar a estabilidade de misturas contendo extratos secos de *M. urundeuva* com os seguintes excipientes: Lactose monohidratada, Celulose microcristalina PH102, Amido pré-gelatinizado e Maltodextrina DE20. A Tabela 16 apresenta as concentrações de quercetina em amostras das misturas físicas dos extratos com os excipientes farmacêuticos armazenados a uma temperatura de 40°C ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ) durante o período de 6 meses.

As concentrações de quercetina na mistura com a lactose (ES+LAC), celulose (ES+CEL) e maltodextrina (ES+MALT) no tempo de 3 meses mantiveram-se estáveis, considerando o desvio padrão, e no tempo de 6 meses ocorreu aumento nas concentrações da quercetina nas misturas, semelhante ao que foi observado no extrato seco (Figura 16).

Possivelmente, ocorreu evaporação de água e componentes voláteis presentes no extrato vegetal resultando em aumento na concentração da quercetina que é termicamente estável na temperatura do estudo ( $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) (FLORENCE & ATTWOOD, 2006).

Na mistura com o amido (ES+AMD), no tempo de 3 meses, foi observada uma diminuição na concentração quercetina e no tempo de 6 meses, o valor foi semelhante à concentração inicial (T0). Essa variação pode ter ocorrido devido a mudanças nas características físicas do amido influenciando a extração dos componentes do extrato seco. Considerando a temperatura e o tempo do estudo, o amido pode ter absorvido os constituintes do ES dificultando sua extração, assim, diminuiu o valor da concentração da quercetina (3 meses), em um período de tempo maior (6 meses), o amido pode ter perdido água e alterado sua propriedade de absorção, liberando os constituintes do ES, e dessa forma, o valor de concentração da quercetina foi semelhante à concentração inicial (Tabela 16) (BOURSIER, 1994; LENAERTS et al., 1998; CEREDA, 2002).

**Tabela 16** – Concentração de quercetina nas misturas binárias 1:1 (m/m) Extrato seco:Excipientes (n=9).

Mistura Física	Quercetina ( $\mu\text{g/mL}$ )		
	T0	T (3 meses)	T (6 meses)
ES+LAC	$50,3 \pm 1,5$	$50,2 \pm 1,4$	$59,8 \pm 1,6$
ES+CEL	$50,2 \pm 2,6$	$51,9 \pm 2,2$	$59,6 \pm 2,1$
ES+MALT	$45,3 \pm 2,6$	$44,5 \pm 1,9$	$55,3 \pm 1,7$
ES+AMD	$50,6 \pm 1,3$	$42,7 \pm 1,6$	$50,3 \pm 1,9$

Dados expressos como Média  $\pm$  DP (Desvio Padrão) (n= 9). Extrato Seco (ES), Lactose (LAC), celulose (CEL), amido (AMD) e maltodextrina (MALT).

### 5.6 Atividade Anti-inflamatória dos extratos secos de *M. urundeuva*.

A Tabela 17 mostra os resultados da atividade anti-inflamatória do extrato seco de *M. urundeuva* (ESMU) administrado por via oral em camundongos. As inibições dos edemas de pata foram significativamente diferentes entre os grupos de diclofenaco de sódio e os grupos aos quais foram administradas duas dosagens dos extratos ( $p < 0,05$ ). A uma dose de 500 mg/kg, observou-se a maior percentagem de inibição de edema 2 h após a administração da

carragenina, enquanto que a maior porcentagem de inibição de edema foi observada em uma hora para uma dose de 2000 mg/kg.

A Carragenina é um agente inflamatório que desencadeia o processo inflamatório e, portanto, a formação de edema através da liberação de histamina, serotonina, bradicinina e prostaglandinas (DI ROSA et al., 1971; SOUSA et al., 2007, BABU & KARKI, 2011). Assim, é possível que os compostos presentes no extrato de *M. urundeuva* interfiram com o processo inflamatório mediado por essas substâncias. Vários estudos têm demonstrado a atividade anti-inflamatória de extratos de *M. urundeuva* (BANDEIRA et al., 1994; VIANA et al., 1997; VIANA et al., 2003; SOUZA et al., 2007). Este estudo mostrou que o processo de secagem por *spray-dryer* manteve os constituintes químicos dos extratos responsáveis pelas atividades anti-inflamatórias da planta.

**Tabela 17** - Efeito de extratos secos de *M. urundeuva* no edema da pata induzido por carragenina em camundongos.

Tempo (h)	Diferença entre as patas direita e esquerda (mm)				Inibição (%)		
	CG 1%	DICLO 10mg/kg	ES 500 mg/kg	ES 2000 mg/kg	DICLO 10mg/kg	ESMU 500 mg/kg	ESMU 2000 mg/kg
0	0,1±0,2	0,0±0,1	0,0±0,1	0,0±0,1	-	-	-
1	1,4±0,2	0,8±0,4***	0,8±0,2***	0,4±0,4***	46,4	49,0	69,0
2	1,6±0,3	0,7±0,2***	0,7±0,3**	1,2±0,5***	59,8	60,2	26,8
3	1,2±0,3	0,6±0,2**	0,6±0,3***	1,0±0,3***	53,4	37,8	20,5
4	1,4±0,3	0,6±0,2**	0,6±0,3***	1,1±0,3***	59,3	43,9	16,0

Os valores representam a média da diferença da medida da pata ± desvio padrão (n = 6 / grupo). Estatisticamente diferente do grupo controle, \*\* p<0,01, \*\*\* P <0,001 (ANOVA seguida pelo teste Student Newman-Keuls). ESMU: Extrato seco de *M. urundeuva*, DICLO: diclofenaco de sódio, CG: carragenina.

## **CONCLUSÕES**

## 6. CONCLUSÕES

O método analítico desenvolvido para a identificação e quantificação da quercetina por CLAE no extrato hidroalcoólico das folhas de *M. urundeuva* foi eficiente ao fim ao qual se destinou, cumprindo, satisfatoriamente, com os parâmetros de seletividade, linearidade, precisão, exatidão e robustez exigidos pela legislação brasileira (BRASIL, 2003). O método de doseamento da quercetina nos extratos secos de *M. urundeuva* cumpriu, satisfatoriamente, os parâmetros de seletividade, linearidade e precisão da co-validação exigidos (BRASIL, 2003). Assim, o método mostrou-se como uma importante ferramenta para o controle de qualidade dos derivados vegetais e produtos tecnológicos intermediários obtidos a partir *M. urundeuva* durante o processo de desenvolvimento de um fitoterápico.

A técnica de secagem por *spray-dryer* mostrou-se adequada na obtenção de extratos secos de *M. urundeuva* e as variações nas condições de secagem: proporção do adjuvante de secagem, CSD (10, 15 e 20%), temperatura de entrada (160, 170 e 180 °C) e razão do fluxo de alimentação (4, 6 e 8 mL/min) apresentaram pequenas variações nos rendimentos e teores de quercetina nos pós obtidos. Estatisticamente, o estudo encontrou uma contribuição positiva para a temperatura de entrada e a taxa de alimentação sobre a concentração de quercetina nas respostas analisadas, de modo que uma proporção de 10% de CSD, uma temperatura de entrada de 180 °C e uma taxa de alimentação de 8 mL/min foi considerada a condição mais adequada para a obtenção dos extratos secos de *M. urundeuva*.

As análises por TG do extrato seco de *M. urundeuva* apresentou um perfil térmico com quatro etapas de perda de massa. Os estudos de TG e DTA das misturas binárias não evidenciaram incompatibilidade térmica não evidenciaram interações entre o extrato seco de *M. urundeuva* e a Lactose monohidratada, a Celulose microcristalina e o amido pré-gelatinizado, indicando o uso desses excipientes no desenvolvimento de possíveis formas farmacêuticas sólidas a partir dos extratos secos da planta. Já as curvas de DTA indicaram uma possível interação entre o extrato seco e a maltodextrina.

Assim a caracterização dos extratos secos de *M. urundeuva* Alemão por TG e DTA forneceram dados importantes que podem ser utilizados como parâmetro de controle de qualidade e como ferramenta para seleção de excipientes em estudos de pré-formulação de produtos que utilizem essa matéria prima vegetal.

Os extratos secos apresentaram atividade anti-inflamatória e os estudos de estabilidade acelerada indicaram que o processo de secagem por *spray-dryer* resultou em extratos secos com constituintes químicos estáveis. Além disso, o biomarcador quercetina manteve-se

estável durante o processo de secagem sendo adequado para a monitorização e controle de qualidade de extratos de *M. urundeuva* no desenvolvimento de fitoterápicos utilizando extratos secos desta planta.

# **REFERÊNCIAS**

## REFERÊNCIAS

- ADELMANN, J. Própolis: variabilidade composicional, correlação com a flora e bioatividade antimicrobiana/antioxidante. 2005. 186p. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.
- AGUIAR, C. L.; BAPTISTA, A. S.; ALENCAR, S. M.; HADDAD, R.; EBERLIN, M. N. Analysis de isoflavonoids from Leguminous plant extracts by RPHPLC/DAD and electrospray ionization mass spectrometry. **Internacional Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 58, 2, p. 116-24, 2007.
- ALBUQUERQUE, R. J. M.; RODRIGUES, L. V.; VIANA, G. S. B. Análise clínica e morfológica da conjuntivite alérgica induzida por ovalbumina e tratada com chalcona em cobaias. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 19, n. 1, p. 43-68, 2004.
- ALMEIDA, A.C.; SOBRINHO, E.M; PINHO, L.; SOUZA, P.N.S.; MARTINS, E.R.; DUARTE, E.R.; SANTOS, H.O.; BRANDI, I.V.; CANGUSSU, A.S.; COSTA, J.P.R. Acute toxicity of leaf hydroalcoholic extracts of *Lippia sidoides*, *Myracrodruon urundeuva*, *Stryphnodendron adstringens* and of *Caryocar brasiliense* administered by intraperitoneal route. **Ciência Rural**, v. 40, n. 1, p. 200-203, 2010.
- ALVES VML, SÁ-BARRETO LCL, SOUZA GHB, CUNHA-FILHO MSS. Co-processed extracts of *Cassia angustifolia* and *Maytenus ilicifolia* for production of high load tablets. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, p. 510-517, 2011.
- ANG, L. F.; YAM, M. F.; FUNG, Y. T. T.; KIANG, P. K.; DARWIN, Y. HPLC Method for Simultaneous Quantitative Detection of Quercetin and Curcuminoids in Traditional Chinese Medicines. **Journal of pharmacopuncture**, v. 17, n. 4, p. 36, 2014.
- ARAGÃO, C. F. S.; SOUSA, F. S.; BARROS, A. C. S.; VERAS, J. W. E.; BARBOSA FILHO, J. M.; MACEDO, R. O. Aplicação da termogravimetria (TG) no controle de qualidade da milona (*Cissampelos sympodialis* Eichl) Menispermaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, p. 60-61, 2002.
- ARAÚJO, A.A.S.; MERCURI, L.P.; SEIXAS, S.R.S.; STORPIRTIS, S., MATOS, J.R. Determinação dos teores de umidade e cinzas de amostras comerciais de guaraná utilizando métodos convencionais e análise térmica. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, n. 2, p. 269-277, 2006.
- AUGUSTO, F.; ANDRADE, J. C.; CUSTÓDIO, R. Faixa Linear de Uma Curva de Calibração. Chemkeys, 2000. Disponível em: <<http://www.chemkeys.com>, acesso em: 20 Jan 2015.
- BABU, A.S.; KARKI, S.S. Anti-inflammatory activity of various extracts of roots of *Calotropis procera* against different inflammation models. **International Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v. 3, p. 191-194, 2011.

BACCARIN, T. Desenvolvimento e padronização de extrato seco de *Rapanea ferruginea* MEZ. (Mirsinaceae) obtido por *spray drying* e avaliação in vivo da atividade antinociceptiva. Dissertação (Mestrado), Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2010.

BANDEIRA, M. A. M.; MATOS, F. J. A.; BRAZ-FILHO, R. New chalconoid dimers from *Myracrodruon urundeuva*. **Natural Product Letters**, v. 4, n. 2, p. 113-120, 1994.

BANDEIRA, M.A.M. Contribuição ao conhecimento químico de plantas do nordeste, *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. (*Astronium urundeuva* engl), aroeira-do-sertão. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1993.

BANDEIRA, M.A.M. *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Aroeira-do-sertão): Constituintes químicos da planta em desenvolvimento e adulta. 2002. 174p. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2002.

BARROS NETO, B.; PIMENTEL, M. F.; ARAÚJO, M. C. U. Recomendações para calibração em química analítica - Parte I. Fundamentos e calibração com um componente (calibração univariada). **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 856-865, 2002.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e otimização de experimentos**. 2. ed. Campinas: Editora da UNICAMP, 1996. 299p.

BAŞ, D.; OYACI, İ. H. Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. **Journal of food engineering**, v. 78, n. 3, p. 836-845, 2007.

BATISTA, A.N.L.; COLOMBO, R.; PASCOLI, I.C.; TELES, H.L.; SILVA, G.H.; BONFIM, G.C.C.; BURGOS, R.C.R.; CAVALHEIRO, A.J.; BOLZANI, V.S.; SILVA, D.H.S.; REIMBERG, M.C.H. Development and validation of a HPLC method for standardization of herbal and commercial extracts of *Myrcia uniflora*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 3, p. 402-406, 2011.

BEZERRA, M. A.; SANTELLI, R.E.; OLIVEIRA, E.P.; VILLAR, L.S.; ESCALEIRA, L.A. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, v. 76, n. 5, p. 965-977, 2008.

BOOTS, A. W.; HAENEN, G. R. M. M.; BAST, A. Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. **European journal of pharmacology**, v. 585, n. 2, p. 325-337, 2008.

BOURSIER, B. Applications alimentaires des amidons modifiés. **industries alimentaires et agricoles**, v. 111, n. 9, p. 583-592, 1994.

BOX, G.E.P.; BEHNKEN, D.W. Some New Three Level Designs for the Study of Quantitative Variables. **Technometrics**, v. 2, n. 4, p. 455-475, 1960.

BOX, G.E.P.; HUNTER, W.G.; HUNTER, J.S. **Statistics for experimenters: an introduction to design, data analysis and model building**. 1. ed. New York: John Wiley & Sons, 1978. 653 p.

BRAGA, R. Plantas do nordeste, especialmente do Ceará. 3 ed. Fortaleza: Progresso, 1976.

BRASIL. **Farmacopéia Brasileira**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 5. ed. Brasília, FioCruz, 2010. 524 p.

BRASIL. Resolução - RDC nº 48 de 16 de março de 2004. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 18 mar. 2004.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Decreto n.º 5.813, de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, 23 jun. 2006.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Resolução – RE nº. 88 de 16 de março de 2004. Dispõe sobre a Lista de Referências Bibliográficas para Avaliação de Segurança e Eficácia de Fitoterápicos. **Diário Oficial da União**. Brasília, 18 mar. 2004.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Resolução – RE nº. 89 de 16 de março de 2004. Dispõe sobre a Lista de Registro Simplificado de Fitoterápicos. **Diário Oficial da União**. Brasília, 18 mar. 2004.

BRASIL. Resolução nº 90 de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o Guia para os Estudos de Toxicidade de Medicamentos Fitoterápicos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. **Diário Oficial da União**. Brasília, 18 mar. 2004.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária-ANVISA. Resolução-RDC nº 14, de 31 de março de 2010. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial da União**; Poder Executivo, 05 abr. 2010.

BRASIL. Resolução nº 1, de 29 de julho de 2005. Guia para a Realização de Estudos de Estabilidade. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Poder executivo, Brasília, DF, **Diário Oficial da União**, 01 ago. 2005.

BRASIL. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Poder executivo, Brasília, DF, **Diário Oficial da União**, 02 jun 2003.

BROADHEAD, J.; ROUAN, S.K.E.; RHODES, C.T. The spray drying of pharmaceuticals, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 1992, 18(11-12): 1169-206.

BUDAVARI, S. (Ed). *The Merck Index*. 12 ed. White House Station: Merck, 1996.

CALOU, I.; BANDEIRA, M. A.; AGUIAR-GALVÃO, W.; CERQUEIRA, G.; SIQUEIRA, R.; NEVES, K. R.; BRITO, G. A.; VIANA, G. Neuroprotective Properties of a Standardized Extract from *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. (Aroeira-Do-Sertão), as Evaluated by a Parkinson's Disease Model in Rats. **Parkinson's Disease**. v. 2014, 2014.

CAMPOS AM. Desenvolvimento de extratos secos nebulizados de *Ilex paraguariensis* *St. Hill. Aquifoliaceae (erva-mate)*. 1996, 149p. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1996.

CAMPOS, A.C.S. Estudo do uso do creme vaginal de aroeira do serão (*Myracrodruon. Urundeuva-All*) em pacientes atendidas em ambulatório de ginecologia de uma Unidade Básica de Saúde em Fortaleza. 2008. 91 p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

CARDOSO, N.Q. Desenvolvimento tecnológico de extratos vegetais padronizados a partir da *Lafoensia pacari* A. St.-Hill (Lythraceae). 2013. Dissertação (Mestrado), Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia 2013.

CARLINI, E. A.; DUARTE-AMEIDA, J.M.; RODRIGUES, E.; TABACH, R. Antiulcer effect of the pepper trees *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira-da-praia) and *Myracrodruon urundeuva* Allemão, Anacardiaceae (aroeira-do-sertão). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 2, p. 140-146, 2010.

CARLINI, E. A.; DUARTE-AMEIDA, J. M.; TABACH, R. Assessment of the Toxicity of the Brazilian Pepper Trees *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeirada- praia) and *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Aroeira-do-sertão). **Phytotherapy Research**, v. 27, n. 5, p. 692-698, 2013.

CARVALHO, E. L. S. Desenvolvimento de produtos secos nebulizados de *Maytenus ilicifolia* Martius ex Reissek – Celastraceae (espinheira-santa). 1997, 133p. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1997.

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

CARVALHO, C. M. G.; PRUDENTE, L.R.; PEREIRA, A. C.; DE PAULA, J.R.; BARA, M. T. F. Avaliação da qualidade de extratos vegetais. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 2, p. 53-62, 2007.

CARVALHO, P. E.; CARVALHO, P. E. **Espécies arbóreas brasileiras**. Brasília-DF: Embrapa, 2003. 1039p.

CAVALCANTE, A. R. S. M.; RODRIGUES, L. V.; MENEZES, D. B.; CUNHA, M. P. S. S; GOES, A. C. A. M. Análise tensional e morfológica da anastomose colônica na colite induzida por ácido acético a 10%, em ratos Wistar, tratados com extrato aquoso de aroeira-do-sertão a 10% (*Myracrodruon urundeuva* fr. all.). **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 20, n. 2, p. 180-186, 2005.

CECÍLIO, A. B.; FARIA, D. B.; OLIVEIRA, P.C.; CALDAS, S.; OLIVEIRA, D. A.; SOBRAL, M. E. G.; DUARTE, M. G. R.; MOREIRA, C. P. S.; SILVA, C. G.; ALMEIDA, V. L. Screening of Brazilian medicinal plants for antiviral activity against rotavirus. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 141, n. 3, p. 975-981, 2012.

Centro Nacional de Conservação da Flora (CNCFlora). Lista Vermelha. Disponível em <<http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/listavermelha>> Acesso em 15 de jan de 2017

CEREDA, M. P. **Propriedades gerais do amido** (Série Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas). Campinas: Fundação Cargill, 2002.

CHAVES, J.S.; COSTA, F.B. DA; FREITA, L. A. P. de. Development of enteric coated tablets from spray dried extract of feverfew (*Tanacetum parthenium* L.). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 3, p. 573-584, 2009.

CHOU, G.; XU, S.J.; LIU, D.; KOH, G.Y.; ZHANG, J.; LIU, Z. Quantitative and fingerprint analyses of chinese sweet tea plant (*Rubus suavissimus* S. Lee). **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 57, n. 3, p. 1076-1083, 2009.

CIOLA, R. **Fundamentos da Cromatografia a líquido de alto desempenho:HPLC**. São Paulo: Edgard Blücher, 1998

COIMBRA, R. **Manual de Fitoterapia**. 2. ed. Belém: CEJUP, 1994

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Introdução a métodos cromatográficos**. 4 ed. Campinas: Editora UNICAMP, 1990.

COLOMBO, R. Extração e Análise Cromatográfica (CLAE/UV E CLAE/EM) dos Flavonóides da Cana-deAçúcar (*Saccharum officinarum*). 2003. 166 p. Tese (Doutorado), Universidade de São Paulo, São Carlos, 2003.

CONCEIÇÃO, M. **As plantas medicinais no ano 2000**. 2. ed. São Paulo: TAO, 1982

CORDEIRO, D.S. Produção de extrato seco de *Maytenus ilicifolia* Martius Ex Reiss pelo Processo Leito de Jorro. 2000. 80p. Dissertação (Mestrado), Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 2000.

CORTÉS-ROJAS, D.F.; SOUZA, C. R. F.; OLIVEIRA, W.P. Optimization of spray drying conditions for production of *Bidens pilosa* L. dried extract. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 93, p. 366-376, 2015.

CORTÉS-ROJAS, D. F.; SOUZA, C. R. F.; OLIVEIRA, W. P. Assessment of stability of a spray dried extract from the medicinal plant *Bidens pilosa* L. **Journal of King Saud University-Engineering Sciences**, v. 28, n. 2, p. 141-146, 2016.

COSTA, E.M.; BARBOSA FILHO, J.M.; NASCIMENTO, T.G.; Macedo, R.O. Thermal characterization of the quercetin and rutin flavonoids. **Thermochimica Acta**, v. 392, p. 79-84, 2002.

COSTA, R. S.; NEGRÃO, C. A. B.; CAMELO, S. R. P.; RIBEIRO-COSTA, R. M.; BARBOSA, W. L. R.; COSTA, C. E. F.; SILVA JUNIOR, J. O. S. Investigation of thermal behavior of *Heliotropium indicum* L. lyophilized extract by TG and DSC. **Journal of thermal analysis and calorimetry**, v. 111, n. 3, p. 1959-1964, 2013.

COSTA, I.M. Estudo de Pré-formulação com o composto polifenólico quercetina. 2005. 192p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

CUNHA, A.M.; MENON, S.; MENON, R.; COUTO, A.G.; BÜRGER, C.; BIAVATTI, M.W. Hypoglycemic activity of dried extracts of *Bauhinia forficata* Link, **Phytochemistry**, v.17, n.1, p. 37-41, 2010.

D'MELLO, P.M.; JOSHI, U. J.; SHETGIRI, P. P.; DASGUPTA, T. K.; DARJI, K. K. A simple HPLC method for quantitation of quercetin in herbal extracts. **Journal of AOAC International**, v. 94, n. 1, p. 100-105, 2011.

DANTAS, J. D. P. Contribuição científica à medicina tradicional dos Tapebas do Ceará: *Astronium urundeuva* (Allemão) Engl. – (aroeira-do-sertão), Monografia de graduação do curso de química, Universidade Estadual do Ceará Fortaleza, 2003.

DE PAULA, I.C.; GONZÁLEZ ORTEGA, G.; BASSANI, V.L.; PETROVICK, P.R. Development of ointment formulations prepared with *Achyrocline satureioides* spray-dried extracts. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 24, p. 235-241, 1998.

DESCAMPS, N.; PALZER, S.; ZUERCHER, U. The amorphous state of spray-dried maltodextrin: sub-sub-Tg enthalpy relaxation and impact of temperature and water annealing, **Carbohydrate Research**, v. 244, n. 1, p. 85-90, 2009.

DI ROSA, M.; GIROUD, J. P.; WILLOUGHBY, D. A. Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. **The Journal of pathology**, v. 104, n. 1, p. 15-29, 1971.

DINIZ F.M.; MARTIN, A .M. Use of response surface methodology to describe the combined effects of pH, temperature and e/s ratio on the hydrolysis of dogfish (*Squalus acanthias*) muscle. **International journal of food science & technology**, v. 31, n. 5, p. 419-426, 1996.

ESCRIBANO-BAILÓN, M. T.; SANTOS-BUELGA, C.; RIVAS-GONZALO, J. C. Anthocyanins in cereals. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, n. 1, p. 129-141, 2004.

FANCO, S. L.; BUENO, J. H. F. Otimização de processo extrativo de própolis. **nfarmacológicas Farmacêuticas**, v. 11, n. 11/12, p. 48-51, 1999.

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

FARIAS, M.R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosman, G.; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 4. ed. Porto Alegre: UFSC, p. 263-288, 2004.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4.ed. São Paulo: Andrei, 1988. p. IV.7

FERREIRA, L.A.; LEITE J. P. V. Desenvolvimento de formulações fitoterápicas. In LEITE, J.P.V. **Fitoterapia: Bases científicas e tecnológicas**. Atheneu: São Paulo. p 205- 251. 2009.

FERREIRA, S. L. C.; BRUNS, R. E.; FERREIRA, H. S.; MATOS, G. D.; DAVID, J. M.; BRANDÃO, G. C.; SILVA, E. G. P.; PORTUGAL, L. A.; REIS, P. S.; SOUZA, A.S.; SANTOS, W.N.L. Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods, **Analytica Chimica Acta**, v. 597, n. 2, p. 179-186, 2007.

FIGURA, L. O. The physical modification of lactose and its thermoanalytical identification. **Thermochimica acta**, v. 222, n. 2, p. 187-194, 1993.

FLORENCE AT, ATTWOOD D. **Physicochemical Principles of Pharmacy**. London: Pharmaceutical Press (Php) 2006.

FONSECA, FN. Desenvolvimento tecnológico de fitoproducto a partir de *Justicia pectoralis* – chambá : obtenção do extrato seco padronizado (CLAE-DAD) e avaliação farmacológica. 2009. 131 p. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009. 131 p

FRANCIS, F.; SABU, A.; NAMPOOTHIRI, K.M.; RAMACHANDRAN, S.; GHOSH, S.; SZAKACS, G.; PANDEY, A. Use of response surface methodology for optimizing process parameters for the production of  $\alpha$ -amylase by *Aspergillus oryzae*, **Biochemical Engineering Journal**, v. 15, n. 2, p. 107-115, 2003.

FRANCO, E.A.P.; BARROS, R.F.M. Uso e diversidade de plantas medicinais no Quilombo Olho D'água dos Pires, Esperantina, Piauí. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v.8, n.3, p.78-88, 2006.

GAINO, A.P.S.C.; SILVA, A.M.; MORAES, M.A.; ALVES, P.F.; MORAES, M.L.T.; FREITAS, M.L.M.; SEBBENN, A.M. Understanding the effects of isolation on seed and pollen flow, spatial genetic structure and effective population size of the dioecious tropical tree species *Myracrodruon urundeuva*. **Conservation Genetics, Dordrecht**, v.11, p. 1631-1643, 2010.

GALLO, L.; LLABOT, J. M.; ALLEMANDI, D.; BUCALÁ, V.; PIÑA, J. 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-MEDIAVILLA, V.; CRESPO, I.; COLLADO, P. S.; ESTELLER, A.; SÁNCHEZ-CAMPOS, S.; TUÑÓN, M. J.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J. The anti-inflammatory flavonoids quercetin and kaemferol cause inhibition of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2 and reactive C protein, and down regulation of the nuclear factor kappaB pathway in Chang liver cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 557, n. 2–3, p. 221–229, 2007.

GATTO, M.; FALCOCCHIO, S.; GRIPPA, E.; MAZZANTI, G.; BATTINELLI, L.; NICOLOSI, G.; LAMBUSTA, D.; SASO, L. Antimicrobial and Anti-Lipase Activity of Quercetin and its C2-C16 3-O-Acyl-Esters. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 10, p. 269-272, 2002.

GAUDY, D.; PUECH, A.; JACOB, M. Rôle de l'adjuvant dans l'optimization de la production d'un extrait sec vegetal nébulisé: "cas de l'extrait de Noix Vomique". **Pharmaceutical Acta Helvetiae**. v. 66, p. 5-10, 1991.

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

GIRON, D.; GOLDBRONN, C. Use of DSC and TG for identification and quantification of the dosage form. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 48, n. 3, p. 473 – 483, 1997.

GONGA, F.; LIANG, Y. S.; XIEB, O. S.; CHAU, F. T. Information theory applied to chromatographic fingerprint of herbal medicine for quality control. **Journal of Chromatography A**, v. 1002, n.1, p. 25–40, 2003.

HARBORNE, J.B. Nature, distribution, and function of plant flavonoids, in *Plant Flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, Pharmacological, and Structure- Activity Relationships* (Cody V, Middleton E Jr and HARBORNE JB eds) Alan R. Liss, Incorporated: New York, p. 15-24, 1986.

HATAKEYAMA, T.; QUINN, F. X. **Thermal Analysis: fundamentals and applications to polymer science**. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, 1999.

HUBER, L. Validation of analytical methods: review and strategy. **LC-GC International**, v. 11, n.1. p. 96-105, 1998.

ICH Q1A(R2). Department of Health and Human Services. **Food and Drug Administration**. Center for Drug Evaluation Research. Guidance for industry: Q1A(R2) Stability Testing of New Drug Substances and Products. Rockville 2003.

ICH Q2B. Department of Health and Human Services. **Food and Drug Administration**. Center for Drug Evaluation Research. Guidance for industry: ICH Q2B Validation of analytical procedures: methodology. Rockville 1995.

Instituto Nacional do Meio Ambiente e dos Recursos naturais Renováveis (IBAMA). Portaria nº 83, de 26 de setembro de 1991. **Diário Oficial da União**. Brasília, 1991.

Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO); Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos, DOQ-CGCRE-008, 2003.

IONASHIRO, M. Giolito: **Fundamentos da Termogravimetria, Análise térmica diferencial e calorimetria exploratória diferencial**. Araraquara: Giz editorial 2004.

ISONO, Y.; ARAYA, G.; HOSHINO, A. Immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* for ethanol fermentation on  $\gamma$ -alumina particles using a spray-dryer. *Process Biochemistry*, 1995, 30(8):743-6,.

JANDÚ, J. J. B.; SILVA, L. C. N.; PEREIRA, A. P.C.; SOUZA, R. M.; SILVA JÚNIOR, C. A.; FIGUEIREDO, R. C. B. Q.; ARAÚJO, J. M.; CORREIA, M. T. S.; SILVA, M. V. *Myracrodruon urundeuva* bark: an antimicrobial, antioxidant and non-cytotoxic agent. **Journal of Medicinal Plants Research**, v.7, n. 8, p. 413-418, 2013.

JENKE, D. R. Chromatographic Method Validation: A Review of Current Practices and Procedures. Part II. Guidelines for Primary Validation Parameters. **Instrumentation science & technology**, v. 26, n. 1, p. 19-35, 1998.

KAHRAMAN, Ahmet et al. The antioxidative and antihistaminic properties of quercetin in ethanol-induced gastric lesions. **Toxicology**, v. 183, n. 1, p. 133-142, 2003.

KIBBE, A. H. **Pharmaceutical excipients**. 3 ed. London: American Pharmaceutical Association, 2000.

KLEEMANN, R.; VERSCHUREN, L.; MORRISON, M.; ZADELAAR, S.; VAN ERK, M. J.; WIELINGA, P. Y.; KOOISTRA, T. Anti-inflammatory, anti-proliferative and anti-atherosclerotic effects of quercetin in human in vitro and in vivo models. **Atherosclerosis** v. 218, n. 1, p. 44-52, 2011.

KLEIN, T.; LONGHINI, R.; BRUSCHI, M. L.; DE MELLO, J. C. P. Development of tablets containing semipurii ed extract of guaraná (*Paullinia cupana*). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 1, p. 186-193, 2013.

KOO, M.H.; PARK, Y.K. Investigation of flavonoid aglycones in propolis collected by two different varieties of bees in the same region. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 61, n. 2, p. 367-369, 1997.

LEITE, R. S.; MACEDO, R. O.; TORRES, S. M.; BATISTA, C. C. N.; BALTAZAR, L. D. O.; NETO, S. A. L.; SOUZA, F.S. 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.

LENAERTS, V.; MOUSSA, I.; DUMOULIN, Y.; MEBSOUT, F.; CHOUINARD, F.; SZABO, P.; MATEESCU, M.A.; CARTILIER, L.; MARCHESSAULT, R. Cross-linked high amylase starch for controlled release of drugs: recent advances. **Journal of controlled release**, v. 53, n. 1, p. 225-234, 1998.

LI, Junfang. Factorial designs. **Encyclopedia of Biopharmaceutical Statistics**. v. 1, p. 364-378, 2003.

LIMA, L. G. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para padronização dos extratos hidroalcoólicos de *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng e *Schinus terebinthifolius* Raddi. 2009. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2009.

LIST, P.H.; SCHMIDT, P.C. **Phytopharmaceutical Technology**. London: Heyden & Son Limited, 1989. 374p.

LONGHINI, R.; RAKSA, S.M.; OLIVEIRA, A.C.P.; SVIDZINSKI, T.I.E.; FANCO, S.L. Obtenção de própolis sob diferentes condições e avaliação de sua atividade antifúngica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 17, n. 3, p. 388-395, 2007.

LÓPEZ-POSADAS, R.; BALLESTER, I.; ABADÍA-MOLINA, A. C.; SUÁREZ, M. D.; ZARZUELO, A.; MARTÍNEZ-AUGUSTIN, O.; DE MEDINA, F. S. Effect of flavonoids on rat splenocytes, a structure-activity relationship study. **Biochemical pharmacology**, v. 76, n. 4, p. 495-506, 2008.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 5. ed. Nova Odessa: Plantarum, v. 1, p. 384, 2008.

LORENZI H, MATOS FJA. **Plantas medicinais no Brasil - nativas e exóticas**. 5. Ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. 544p

MACHADO, A. C. Caracterização do extrato de aroeira (*Myracrodruon urundeuva*) e seu efeito sobre a viabilidade de fibroblastos gengivais humanos. 2013. Tese (Doutorado), Universidade de São Paulo, Bauru, 2013.

MACHADO, A. R. M. C. Obtenção de produtos a partir das folhas de *Copaifera langsdorffii* Desf.: Otimização da extração e secagem em *spray dryer* utilizando planejamentos fatoriais. 2011. 137p. Dissertação (Mestrado), Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

MAHMOUD, T. S.; MARQUES, M. R.; PESSOA, C. Ó.; LOTUFO, L. V. C.; MAGALHÃES, H. I. F.; MORAES, M. O.; LIMA, D. P.; TININIS, A. G.; OLIVEIRA, J. E. *In vitro* cytotoxic activity of Brazilian middle west plant extracts. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 2011, 21(3):456-464.

MASTERS, K. **Spray Drying Handbook**. 4. ed. Londres: George Godwin. 1985.

MEDEIROS, A. C. D.; MEDEIROS, I. A.; MACEDO, R. O. Thermal studies of *Albizia inopinata* crude extract in the presence of cyclodextrin and Aerosil by TG and DSC coupled to the photovisual system. **Thermochimica acta**, v. 392, p. 93-98, 2002.

MENDONÇA, M. P.; LINS, L. V. (Orgs.). Lista vermelha das espécies ameaçadas de extinção da flora de Minas Gerais. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas, 2000. 157p.

MENEZES, M. A. S.; RAO, V. S. N.; FONTELES, M. C. Antiinflammatory activity of *Astronium urundeuva* Fr. All. Engl.: possible mechanisms involved. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 18, p. 861-864, 1985.

MIHRANYAN, A.; SVEN-BORJE, A.; EK, R. Cellulose powders. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 6, n. 11, p. 2-12, 2004.

MONTEIRO, J. M.; LINS NETO, E. M. F.; AMORIM, E. L. C.; STRATTMANN, R. R.; ARAÚJO, E. L.; ALBUQUERQUE, U. P. Teor de taninos em três espécies medicinais arbóreas simpátricas da caatinga. **Revista Árvore [online]**, v. 29, n. 6, p. 999-1005, 2005.

MOYANO, M. A.; BROUSSALIS, A. M. SEGALL, A. I. thermal analysis of lipoic acid and evaluation of the compatibility with excipients. **Jornal of thermal analysis calorimetry**. v. 99, n. 2, p.631-637, 2009.

MUTHUKALA, B.; SIVAKUMARI, K.; ASHOK, K. Antioxidant and anti-inflammatory potential of quercetin. **International Journal of Current Pharmaceutical Research**, v. 7, n. 3, p. 58-79, 2015.

MYERS, W. R. Response Surface Methodology. **Encyclopedia of Biopharmaceutical Statistics**. v. 1, p. 858-869, 2003.

NETTO, E. M.; SHUQAIR, N. S. M. S. A. Q.; BALBINO, E. E.; CARVALHO, A. C. Comentários sobre o Registro de Fitoterápicos/Comments on the Phytomedicines Register. **Revista Fitos Eletrônica**, v. 1, n. 03, p. 9-17, 2013. 2006.

NITIEMA, L.W.; SAVADOGO, A.; SIMPORE, J.; DIANOU, D.; TRAORE, A.S. In vitro antimicrobial activity of some phenolic compounds (coumarin and quercetin) against gastroenteritis bacterial strains. **Int J Microbiol Res**, v. 3, n. 3, p. 183-7, 2012.

NOBRE-JÚNIOR, H.V.; OLIVEIRA, R.A.; MAIA, F.D.; NOGUEIRA, M.A S.; MORAES, M.O.; BANDEIRA, M.A.M.; ANDRADE, G.M.; VIANA, G.S.B. Neuroprotective effects of chalcones from *Myracrodruon urundeuva* on 6-Hydroxydopamine-Induced cytotoxicity in rat mesencephalic cells. **Neurochemical Research**, v. 34, n. 6, p. 1066-1075, 2009.

NONHEBEL, G.; MOSS, A. A. H. **Drying of Solids in the Chemical Industry**. Londres: Butterworths, 1971. p. 253-263.

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.

OMS/ Organización Mundial de la Salud. Pautas para a avaliação de medicamentos herbarios. Ginebra, 1991. [www.who.it/em](http://www.who.it/em), acesso em 15 ago. 2016.

OSORIO, C.; ACEVEDO, B.; HILLEBRAND, S.; CARRIAZO, J.; WINTERHALTER, P.; MORALES, A. L. Microencapsulation by spray-drying of anthocyanin pigments from corozo (*Bactris guineensis*) fruit, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 11, p. 6977-6985, 2010.

OSORIO, C.; FORERO, D. P.; CARRIAZO, J. G.. Characterization and performance assessment of guava (*Psidium Guajava* L.) microencapsulates obtained by spray-drying, **Food Research International**, v. 44, n. 5, p. 1174-1181, 2011.

PALMA, S.; LUJÁN, C.; LLABOT, J. M.; BARBOZA, G.; MANZO, R. H.; ALLEMANDI, D. A. Design of *Peumus boldus* tablets by direct compression using a novel dry plant extract. **International journal of pharmaceuticals**, v. 233, n. 1, p. 191-198, 2002.

PEREIRA, C. A.; SCHNITZLER, E.; CARVALHO-FILHO, M. A. S. E. Estudo termoanalítico (TG, DTG, e DSC) dos cafés in natura e processados. **Publicatio UEPG: Ciências Exatas e da Terra, Agrárias e Engenharias**, v. 11, n. 01, p. 61-66, 2005.

PÉRTILE, R. Isolamento e elucidação estrutural de compostos polares de *Lippia alba* (Miller) N. E. Brown Ex Britt. & Wils. 2007. Dissertação (mestrado), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

PIMENTEL, M. F.; BARROS, N. B. Calibração: uma revisão para químicos analíticos. **Química Nova**, v. 19, n. 3, p. 268-277, 1996.

PINTO, V. Z.; VANIER, N. L.; KLEIN, B.; ZAVAREZE, E. R.; ELIAS, M.C. GUTKOSKI, L. C., et al. Physicochemical, crystallinity, pasting and thermal properties of heat-moisture-treated pinhão starch. **Starch-Stärke**, v. 64, n. 11, p. 855-863, 2012.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química nova**, v. 25, n. 1, p. 45-61, 2002.

RANKELL, A. S.; LIEBERMAN, HÁ.; SCHIFFMAN, R. F. Secagem. In: Lachman L, Lieberman HA, Kanig JL. **Teoria e prática na indústria farmacêutica**. Vol 1. Lisboa: Calouste Gulbenkian, 2001, p. 83-112.

RAO, V. S.; VIANA, G. S.; MENEZES, A. M. S.; GADELHA, M. G. Studies on the antiulcerogenic activity of *Astronium urundeuva* Engl. II. aqueous extract. **Brazilian Journal of Medical and Biology Research**, v. 20, n. 6, p. 803-805, 1987.

REMILI, H.; BOUSSARD, P.; DEVLEESCHOUWER, M. Microbiological quality of spray-dried pharmaceutical plants extracts. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 1, n. 5, p. 265-268, 1994.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação de Métodos Cromatográficos e eletroforéticos. **Química nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.

RODRIGUES, M. I.; KALIL, S. J.; MAUGERI, F. Planejamento fatorial e screening design como ferramenta para otimização de processos bioquímicos. In: Simpósio Nacional de Fermentação, 12, 1998, Uberlândia. Anais.

RODRIGUES, P.O.; CARDOSO, T.F.M.; SILVA, M.A.S.; MATOS, J.R. Aplicação de técnicas termoanalíticas na caracterização, determinação da pureza e cinética de degradação da zidovudina (AZT). **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 24, n. 3, p. 383-387, 2005.

ROQUE, A. A.; ROCHA, R. M.; LOIOLA, M. I. B. Uso e diversidade de plantas medicinais da Caatinga na comunidade rural de Laginhas, município de Caicó, Rio Grande do Norte (nordeste do Brasil). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 1, p. 31-42, 2010.

ROTELLI, A. E.; GUARDIA, T.; JUAREZ, A. O.; ROCHA, N. E.; PELZER, L. E. Comparative study of flavonoids in experimental models of inflammation. **Pharmacological research**, v. 48, n. 6, p. 601-606, 2003.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; OWEN, S. C. **Handbook of pharmaceutical excipientes**. 5a ed. Pharmaceutical Press, Landom/Chicago, 2006.

RUNHA, F. P.; CORDEIRO, D. S.; PEREIRA, C. A. M.; VILEGAS, J.; OLIVEIRA, W. P. Production of dry extracts of medicinal Brazilian plants by spouted bed process: development of the process and evaluation of thermal degradation during operation. **Food and bioproducts processing**, v. 79, n. 3, p. 160-168, 2001.

SÁ, R.A.; ARGOLO, A.C.C.; NAPOLEÃO, T.H.; GOMES, F.S.; SANTOS, N.D.L.; MELO, C.M.L.; ALBUQUERQUE, A. C.; XAVIER, H.S.; COELHO, L.C.B.B.; BIEBER, L.W.; PAIVA, P.M.G. Antioxidant, Fusarium growth inhibition and *Nasutitermes corniger* repellent activities of secondary metabolites from *Myracrodruon urundeuva* heartwood. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 63, n. 4, p. 470-477, 2009.

SAMPAIO, R. C. A.; COSTA, R.S.; SOUZA, C. R. F.; DUARTE JÚNIOR, RIBEIRO-COSTA, R. M.; COSTA, C. E. F.; OLIVEIRA, W. P.; CONVERTI, A.; SILVA JÚNIOR, J. O. C. Thermal characterization of *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B. Verl. dry extracts obtained by spray dryer. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 123, n. 3, p. 2469-2475, 2016.

SANGUINETTI, E. E. **Plantas que curam**. 2 ed. Porto alegre: Rigel, 1989

SANTIN, D. A.; LEITÃO FILHO, H. F. Restabelecimento e revisão taxonômica do gênero *Myracrodruon* Freire Allemão (Anacardiaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 14, n. 2, p. 133-145, 1991.

SANTOS, A. F. O.; BASÍLIO Jr, I. D.; SOUZA, F. S.; MEDEIROS, A. F. D.; PINTO, M. F.; DE SANTANA, D. P.; MACÊDO, R. O. Application of thermal analysis of binary mixtures with metformin. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 93, n. 2, p. 361-364, 2008.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P. R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G.; Mello, J. C. P.; Mentz, L. A.; Petrovick, P.R. (org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS / Editora da UFSC, 2007.

SHAW, F. V. Spray drying as an alternative granulation technique. In: Parikj DM. **Handbook of Pharmaceutical Granulation Technology**. Nova York: Marcel Dekker, p.75-96. 1997.

SILVA JÚNIOR, J. O. C.; VIEIRA, J. L. F.; BARBOSA, W. L. R.; PEREIRA, N.L. Caracterização físico-química do extrato fluido e seco por nebulização de *Symphytum officinale* L. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, (Supl.), p.671-677, 2006.

SILVA, R.M.F.; GOMES, T.C.B.L.; ALBUQUERQUE, M.M.; SILVA JUNIOR, J.O.C.; BARBOSA, W.L.R.; ROLIM NETO, P.J. Abordagem sobre os diferentes processos de secagem empregados na obtenção de extratos secos de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 1, p. 103-109, 2012.

SILVA, M. D. Estudo Farmacobotânico de Três Espécies Mediciniais da Caatinga em Pernambuco. 2008. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2008.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P.R. (org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS / Editora da UFSC, 2007.

SIMÕES, V. N. et al., Síntese, Caracterização e Estudo das Propriedades de um novo Complexo Mononuclear contendo quercetina e íon Ga(III). **Química Nova**, v. 36, n. 4, p. 495-501, 2013.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Principles of Instrumental Analysis**, 5ª ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.

SOARES, L.A. L. Obtenção de comprimidos contendo alto teor de produto seco por aspersão de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek - Celastraceae. Desenvolvimento tecnológico de produtos intermediários e final. 2002. Tese (Doutorado), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

SOBRATTEE, M. A.; NEERGHEEN, V.S.; LUXIMON-RAMMA, A.; ARUOMA, O.I.; BAHORUN, T. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 579, n. 1, p. 200-213, 2005.

SOUSA, J.N. Obtenção de extratos padronizados a partir das cascas de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Fabaceae) e avaliações biológicas *in vitro*. 2014. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2014.

SOUZA, S. M. C. Padronização de extratos vegetais: *Astronium urundeuva* (Anacardiaceae). 2012. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2012

SOUZA, S. M. C.; AQUINO, L. C. M.; JR, A. C. M.; BANDEIRA, M. A. M.; NOBRE, M. E. P.; VIANA, G. S. B., Antiinflammatory and antiulcer properties of tannins from *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Anacardiaceae) in Rodents. **Phytotherapy Research**, v. 21, n. 3, p. 220-225, 2007.

SOUZA-SARTORI, J.A.; SCALISE, C.; BAPTISTA, A.S.; LIMA, R.B.; AGUIAR, C.L. Parâmetros de influência na extração de compostos fenólicos de partes aéreas da cana-de-açúcar com atividade antioxidante total. *Bioscience Journal*. v. 29, n. 2, p. 297-307, 2013.

TAN, W. et al. Quercetin, a dietary-derived flavonoid, possesses antiangiogenic potential. **European journal of pharmacology**, v. 459, n. 2, p. 255-262, 2003.

TEIXEIRA, H.F. Avaliação da influência de adjuvantes farmacêuticos sobre as características físicas, químicas, tecnológicas e farmacológicas de extratos secos nebulizados de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. Compositae - Marcela, **Caderno de Farmácia**, v. 13, n. 2, p. 151-152, 1997.

THOMAS, M. J. K.; BARNES, J. D.; DENNEY, R. C.; MENDHAM, J. **Vogel: Análise Química Quantitativa**. LTC editor, 6 ed. Rio de Janeiro. 2002. p. 265-276.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; FAJGELJ, A.; WILLETTS, P.; WOOD, R. Harmonized guidelines for the use of recovery information in analytical measurement, ISO, IUPAC and AOAC International Technical report, **Pure Appl. Chem.**, v. 71, n. 2, p. 337-348, 1999.

TITA,B.; FULIAS, A.; BANDUR, G.; MARIAN, E.; TITA, D. Compatibility study between ketoprofen and pharmaceutical excipients used in solid dosage forms. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 56, p. 221-227, 2011.

UESU, N. Y.; PINEDA, E. A. G.; HECHENLEITNER, A. A. W. Microcrystalline cellulose from soybean husk: effects of solvents treatments on its properties as acetylsalicylic acid carrier, **International journal of pharmaceutics**, v. 206, n. 1, p. 85-96, 2000.

UNITED STATES PHARMACOPEIA CONVENTION; US Pharmacopeia 24, Validation of Compendial Methods, 1225, Rockville, 1999.

VALLADÃO, D.M.S.; IONASHIRO, M.; ZUANON NETTO, J. Determinação de fármacos diuréticos em associação por cromatografia em camada delgada e espectrofotometria. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 44-46, 2008.

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

VERMA, R. K.; GARG, S. Selection of excipients for extended release formulations of glipizide through drug-excipient compatibility testing, **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 38, n. 4, p. 633-644, 2005.

VESSMAN, J.; STEFAN, R. I.; STADEN, J. F. V.; DANZER, K.; LINDNER, W.; BURNS, D. T.; FAJGELJ, A.; MÜLLER, H. Selectivity in analytical chemistry. **Pure Appl. Chem.** v. 73, n. 3, p.1381–1386, 2001.

VIANA, G. S. B.; BANDEIRA, M. A. M.; MATOS, F. J. A. Analgesic and antiinflammatory effects of chalcones isolated from *Myracrodruon urundeuva* Allemão. **Phytomedicine**, 2003, 10:189-195.

VIANA, G. S. B.; BANDEIRA, M. A. M.; MOURA, L.C.; SOUZA FILHO, M.V.P.; MATOS FJA, RIBEIRO RA. Analgesic and antiinflammatory effects of the tannin fraction from *Myracrodruon urundeuva* Fr.All. **Phytotherapy Research**, v. 11, n. 2, p. 118-122, 1997.

VIANA, G. S. B.; MATOS, J. A.; BANDEIRA, M. A. M.; RAO, V. S. N. **Aroeira-do-sertão: estudo botânico, farmacognóstico, químico e farmacológico**. Fortaleza: UFC, 1995. 164 p.

VOLPATO, A. M. M. Avaliação do potencial antibacteriano de *Calendula officinalis* (Asteraceae) para seu emprego como fitoterápico. 2005, p. 137. Tese (Doutorado), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

WENDEL, S.; CELIK, M. Uma visão geral sobre o uso da tecnologia de spray-drying. **Pharmaceutical Technology**, v. 2, n. 2, p. 31-45, 1998.

WINTER, C. A.; RISLEY, E. A.; NUSS, G. W. Carrageenin-induced edemas in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. **Experimental Biology and Medicine**, v. 111, n. 3, p. 544-547, 1962.

WU, Y.; CUI, S.W.; TANG, J.; GU, X. Optimization of extraction process of crude polysaccharides from boat-fruited sterculia seeds by response surface methodology. **Food chemistry**, v. 105, n. 4, p. 1599-1605, 2007.

ZHANG, M.; SWARTS, S.G.; YIN, L.; LIU, C.; TIAN, Y.; CAO, Y.; SWARTS, M.; YANG, S.; ZHANG, S.B.; ZHANG, K.; et al. Antioxidant properties of quercetin. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 701, p. 283, 2011.

ZUANAZZI, J.A.S.; MONTANHA, J.A. 2007. Flavonóides, p. 577-614. In: Simões, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMAN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6a ed., Editora da UFRGS/Editora da UFSC, Porto Alegre/Florianópolis, RS/SC, Brasil. 2007.

**APÊNDICE**

## APÊNDICE 1 – Artigo publicado.



International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences

ISSN- 0975-1491

Vol 9, Issue 2, 2017

Original Article

### STANDARDIZATION AND STABILITY EVALUATION OF DRY EXTRACTS OF *MYRACRODRUON URUNDEUVA* ALLEMÃO OBTAINED BY SPRAY DRIER

RENATA DA SILVA LEITE<sup>a\*</sup>, VALMIR GOMES DE SOUZA<sup>b</sup>, AGNA HÉLIA DE OLIVEIRA<sup>b</sup>, JOSÉ VENÂNCIO CHAVES JÚNIOR<sup>b</sup>, ISLAINE DE SOUZA SALVADOR<sup>b</sup>, FABRICIO HAVY DANTAS DE ANDRADE<sup>b</sup>, RUI OLIVEIRA MACEDO<sup>b</sup>, FÁBIO SANTOS DE SOUZA<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil, <sup>b</sup>Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brazil  
Email: renataleitesp@yahoo.com.br

Received: 05 Sep 2016 Revised and Accepted: 21 Dec 2016

#### ABSTRACT

**Objective:** This study aimed to obtain standardised dry extracts of *Miracrodruon urundeuva* Allemão using spray-dryer and evaluate the stability of the extracts.

**Methods:** It evaluated the drying parameters: Proportion of colloidal silicon dioxide (CSD) (10, 15 and 20%), inlet temperature (160, 170 and 180 °C) and feed rate (4, 6 and 8 ml/min). The study of the accelerated stability of dry extract occurred in temperature of 40 °C (±2 °C) and relative humidity of 75% (±5%) for 6 mo. The anti-inflammatory activity of the dry extract was evaluated in Swiss mice by the paw edema method.

**Results:** Variations in drying conditions did not represent significant variations in yields of the process. The drying temperature and feed rate significantly influenced the concentration of quercetin ( $p \leq 0.05$ ). The increase in inlet temperature and feed flow promoted the increase of quercetin concentration in the extracts. The stability study showed that the concentration of quercetin in dry extract was stable over a period of 6 mo. The dry extract showed anti-inflammatory activity in mice orally.

**Conclusion:** A condition of 10% of colloidal silicon dioxide with an 180 °C inlet temperature and a feed rate of 8 ml/min was considered the most adequate for obtaining the extracts and the drying process resulted in stable dry extracts and the quercetin was a suitable biomarker for monitoring the process.

**Keywords:** *Miracrodruon urundeuva* Allemão, Dry extracts, Spray dryer, Stability

© 2016 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.2017v9i2.15065>

#### INTRODUCTION

The *Miracrodruon urundeuva* Allemão is an arboreal species of the Anacardiaceae family, which is native to Brazil but also found in Mexico, Argentina, Bolivia and Paraguay, that is used in folk medicine for its medicinal properties [1]. Studies using extracts from different parts of this plant have shown anti-ulcer activity [2-4], anti-inflammatory and wound healing properties [4, 5], antibacterial and antifungal properties [6], neuroprotective qualities [7] and cytotoxicity in cancer cells [8].

The study of an ethanolic extract of leaves of *M. urundeuva* showed a higher incidence of secondary metabolites in the species than those derived from phenolic acids [9]. Phytochemical studies of the stem and leaf showed the presence of tannins, flavonoids, mono and sesquiterpenes, triterpenes and steroids, condensed proanthocyanidins and leucoanthocyanidins and sugars [10, 11].

Quercetin is a flavonoid identified in *M. urundeuva* known to express pharmacological activity as an antioxidant, anti-inflammatory and antimicrobial, among others [12-16]. Thermoanalytical studies indicate that this compound is stable up to 315 °C when it starts the process of decomposition [17].

The development of standardised plant derivatives with defined chemical, physical, and technological characteristics is fundamental in the herbal industry and results in obtaining pharmaceutical forms with assured quality to ensure reproducibility in the preparation of a medicinal product and its therapeutic efficacy [18].

The use of dry extracts in the production of herbal medicines has been employed due to their greater chemical stability; physicochemical and microbiological characteristics; higher concentrations of active compounds; ease of patterning and

handling; and greater processing capacity in different pharmaceutical formulations than liquid extracts [19, 20].

Among the techniques successfully employed in the preparation of dry plant extracts is the nebulization by spray drying, which produces powders with defined characteristics, such as shape and particle size, and the rapid evaporation of the solvent reduces the process time and risk of changes of thermolabile products [21-24].

This study aimed to obtain standardised dry extracts of *Miracrodruon urundeuva* Allemão using spray drying and to evaluate the stability and anti-inflammatory activity of the dry extracts obtained.

#### MATERIALS AND METHODS

##### Plant material and chemicals

This study used leaves of *Miracrodruon urundeuva* Allemão (Anacardiaceae) collected from farms in Cacimbas and Caraúbas in the state of Paraíba, Brazil. Entire plants were collected during the flowering stage. A representative sample of this species is deposited in the Lauro Pires Xavier Herbarium of the Federal University of Paraíba (Registration no. NC240) and botanical identification was carried out by Professor Alecksandra Vieira Lacerda of the Federal University of Campina Grande. The plant material was dried at 50±2 °C for 96 h in a circulating air oven, reduced to a powder in a mechanical mill, and stored in sealed plastic bag. The hydroethanolic extract of the plant was obtained by the maceration at 25 °C of 2 kg of powdered leaves in 10l of ethanol/water solution 50% (v/v) for 120 h.

HPLC grade solvents were purchased from Tedia Co. (Phoenix, AZ-USA). The standard employed in the analyses was quercetin dehydrate CAS-117-39-5 (97% pure) that had been acquired by Merck, Brazil. The colloidal silicon dioxide (Henrifarma, Brazil) was used as a drying agent. Carrageenan (Sigma-Aldrich, Brazil) and

diclofenac sodium (Novartis, Brazil) were used in the study of the anti-inflammatory activity.

#### Spray-drying

The spray-drying process was performed in a laboratory-scale model SD-05 (Lab-Plant, Huddersfield, UK). The atomiser double pneumatic fluid nozzle with 1.2 mm opening hole operated with an airflow rate of 62 m<sup>3</sup>/h and a 2.0 bar of pressure. A 2<sup>3+1</sup>-factorial experimental design was used to assess the effect of spray-drying operating variables on yield and quercetin concentration on the

drier extract. Three factors at two levels were considered: (A) drying air inlet temperature (160, 170 and 180 °C), (B) the flow rate of the drying composition fed to the spray drying (4, 6 and 8 ml/min) and (C) the proportion of colloidal silicon dioxide (CSD) (10, 15 and 20%). Table 1 summarises the levels of operating variables.

The silicon dioxide was selected for the study because it is an adjuvant with a high surface area and thermal stability, it is a safe excipient when used in pharmaceuticals for oral and topical use, and it is widely used as a technological adjuvant in the drying of vegetable extracts by spray drying [25].

**Table 1: Experimental matrix according to 2<sup>3+1</sup> factorial design and studied responses. T: inlet temperature, F: feed rate, CSD: proportion of colloidal silicon dioxide**

Run	A	B	C	T (°C)	F (ml/min)	CSD (%)
1	1	-1	1	180	4	20
2	1	1	1	180	8	20
3	1	-1	-1	180	4	10
4	-1	1	-1	160	8	10
5	-1	1	1	160	8	20
6	1	1	-1	180	8	10
7	-1	-1	-1	160	4	10
8	-1	-1	1	160	4	20
9	0	0	0	170	6	15

T: inlet temperature, F: feed rate, CSD: proportion of colloidal silicon dioxide.

Run	A	B	C	T (°C)	F (ml/min)	P (%)
1	1	-1	1	180	4	20
2	1	1	1	180	8	20
3	1	-1	-1	180	4	10
4	-1	1	-1	160	8	10
5	-1	1	1	160	8	20
6	1	1	-1	180	8	10
7	-1	-1	-1	160	4	10
8	-1	-1	1	160	4	20
9	0	0	0	170	6	15

T: inlet temperature, F: feed rate, P: the proportion of CSD\*.

#### Quercetin content

The quercetin content was quantified by High-performance liquid chromatography (HPLC) according to the method previously validated. A calibration curve relating the peak area with quercetin concentration was built using linear regression analysis. The fitted equation ( $y = 56948x - 6354$ ) was linear over the range of 0.4 to 7.6 µg/ml presenting a  $R^2 > 0.999$ . Parameters of validation such as selectivity, linearity, detection and quantification limits (LOD and LOQ, respectively) and precision or relative standard deviation (RSD) were established [26, 27]. The LOD and LOQ were evaluated on the basis of the noise obtained with analysis of non-spiked blank samples for quercetin ( $n = 3$ ). LOD and LOQ were defined as the concentration of the analyte that produced a signal-to-noise ratio of 3 and 10, respectively [26]. For the total quercetin, the LOD and LOQ were estimated by the slope and mean standard deviation of quercetin concentrations used in the standard curve [27]. The LOD for the quercetin was 0.18 µg/ml, while LOQ was 0.56 µg/ml. Results of six parallel experiments indicated that precision or RSD were all <5%.

HPLC analyses were conducted in a Shimadzu liquid chromatography (Shimadzu, Kyoto, Japan) coupled with a photo diode array detector (PD-M20Avp Shimadzu), equipped with a Phenomenex (Torrance, California, USA) Luna C18 chromatographic column (4.6 mm×250 mm; 5 µm) operating at room temperature (40 °C). The mobile phase used was methanol/phosphoric acid 1% (47:53) (v/v) at a flow rate of 1.2 ml/min (isocratic flow), injection volume of 20 µl, a monitoring wavelength of 370 nm, and analysis time of 30 min. The experiments were conducted in triplicate. Data analyses were conducted in the Class-VP version 6.14 SP1 Shimadzu software.

Samples of 300 mg of dried extracts were dissolved in 5.0 ml of 1:1 (v/v) ethanol: water, and stirred with a magnetic stirrer for 10 min. Then 1 ml of hexane was added to a 1 ml sample of extract and

centrifuged for 10 min. The hexane phase was ruled out and 500 µl of the resulting extract was added to 9 ml of dichloromethane and centrifuged for 10 min. Finally, 4 ml of this phase was evaporated and reconstituted in 2 ml of methanol and filtered before injection into the HPLC.

#### Determination of the drying process yield

Process yield (PY, % w/w), or powder recovery, was calculated immediately after the drying experiments based on the ratio of the powder mass (dry basis) collected in the flask (W) to the portion of the extract feed mass (WE) that was equivalent to the solid content of CSD added by Equation (1).

$$PY (\%) = \frac{W(g)}{WE(g)} \cdot 100 \dots (1)$$

#### Statistical analysis

The data were analyzed with the aid of the Statistic 7.0 software program (Statsoft Inc., Tulsa, OK, EUA). The results were expressed as mean±SD and coefficient of variation. The means were compared using ANOVA associated with response surface methodology. Statistical significance was established through a p-value, of which values lower than 0.05 indicate that the factor impact is significant with at least 95% confidence [28].

#### Accelerated stability study

The stability testing of the dry extract of *M. urundeuva* obtained in the best drying condition was conducted under a temperature of 40 °C (±2 °C), a relative humidity of 75% (±5%), and controlled by a Tecnal, B. O. D. TE-371 climate chamber (João Pessoa, Brazil) for 6 mo (29). Nine samples with approximately 3g of dried product were placed in hermetic PVC-Aluminum sachets. Quercetin analyses in three samples of the extract were performed at 0, 3 and 6 mo.

### Anti-inflammatory activity

The anti-inflammatory activity of the dry extract of *M. urundeuva* (ES) obtained in the best drying condition was assessed in male Swiss mice (32±5g) using the carrageenan-induced paw edema model [30]. Paw edema was induced by injecting 0.1 ml of 1% (w/v) carrageenan suspended in either saline into sub-plantar tissues of the left hind paw of each mouse. Mice were divided into four groups, each consisting of six animals that received orally the ES dissolved in water by gavage at doses equivalent to 500 mg/kg and 2000 mg/kg of the dried vegetable drugs carefully adjusted to the quantity of dry extract, either saline and diclofenac sodium (10 mg/kg) as standard reference. After one hour, a volume of 0.1 ml of carrageenan (1% w/v) was applied in the subplantar region of the right hind paw of the animals to induce edema. The paw thickness was measured before injecting the carrageenan and after 1, 2, 3, and 4h using vernier caliper. This project was approved by the Ethics Committee on Animal Research of the Federal University of Paraíba (UFPB)

(Protocol No. 0207/10) and all the animals used were from the Vivarium of the Center for Biotechnology of the UFPB. The anti-inflammatory activity was calculated as the percentage inhibition of the edema in the animals treated with extract under test in comparison to the carrageenan control group using Equation (2).

$$PY (\%) = \frac{T_0 - T_t}{T_0} \cdot 100 \dots (2)$$

Where  $T_t$  is the paw thickness of mice given the test extract at a corresponding time and  $T_0$  is the paw thickness of mice of the control group at the same time.

### RESULTS

#### Evaluation of the drying parameters

Table 2 shows the results of the  $2^{3+1}$  factorial experimental design that involved the following variables: the drying air inlet temperature, the flow rate of the drying composition fed to the spray drying, and the proportion of CSD.

Table 2: Evaluation of the drying parameters in dry extracts of *M. urundeuva* obtained by spray drier

Drying parameters (CSD/inlet temperature/feed rate)	Process yield (%)*	Quercetin ( $\mu\text{g/ml}$ )*
20% 160 °C 8 ml/min	37.9±0.06	20.1±0.4
20% 160 °C 4 ml/min	37.1±0.04	19.8±0.2
20% 180 °C 8 ml/min	41.2±0.06	20.8±0.2
15% 170 °C 6 ml/min	39.5±0.08	21.4±1.1
10% 180 °C 4 ml/min	40.9±0.03	23.3±1.4
20% 180 °C 4 ml/min	40.9±0.04	20.8±1.0
10% 180 °C 8 ml/min	39.1±0.07	23.0±0.7
10% 160 °C 4 ml/min	42.7±0.06	23.2±0.5
10% 160 °C 8 ml/min	44.5±0.06	21.7±0.4

\* Values represent the mean±Standard deviation ( $n = 3/\text{group}$ ). CSD: proportion of colloidal silicon dioxide.

Statistical analyses were performed by ANOVA and multiple linear regression using the response surface methodology to evaluate the effect of the factors on the process yield and concentration of quercetin in dry extracts of *M. urundeuva*. A significance value of  $p < 0.05$  was established and values lower than this were ignored. A summary of the main effects and their significance values are provided in table 3.

Fig. 1 shows the response surface of quercetin concentration in the dried extract of *M. urundeuva* as a function of the extract feed rate and inlet temperature, which are important factors in the drying process that directly influence product characteristics.

Assessing the degree of influence of these factors can help achieve greater efficiency in the drying process.

Table 3: Summary of significance (ANOVA) of the effect of the independent variables on the responses analysed in factorial design when obtaining dry extracts

Independent variables	P-value	
	Process yield	Quercetin content
Inlet Temperature	0.464907	0.000340
Feed rate	0.767776	0.006605
CSD	0.367157	0.207443
Inlet Temperature*Flow rate	0.470684	0.000285
Inlet Temperature*CSD	0.685150	0.000035
Feed rate*CSD	0.301538	0.263401
Inlet Temperature*Feed rate*CSD	0.797260	0.010428

CSD: proportion of colloidal silicon dioxide.

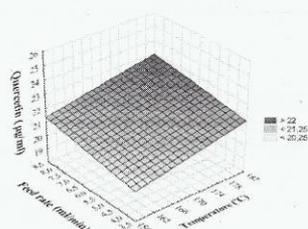


Fig. 1: Response surface of quercetin concentration in *M. urundeuva* dried extract as a function of the extract feed rate and inlet temperature

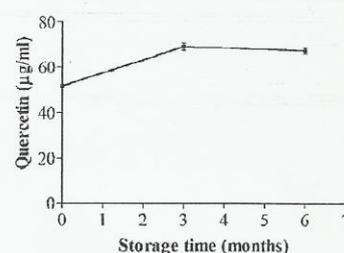


Fig. 2: Concentration of quercetin in spray dried extract stored during the stability test ( $n = 3/\text{group}$ )

**Accelerated stability study**

Fig. 2 shows the concentrations of quercetin in extract samples stored at 40 °C ( $\pm 2$  °C) and 75% ( $\pm 5\%$ ) during the stability testing period of 6 mo.

**Anti-inflammatory activity**

Table 4 shows the results of the anti-inflammatory effect of the dry extract of *M. urundeuva* (DEMU) administered by oral route in mice evaluated by the method of paw edema induced by carrageenan.

**Table 4: Effect of dry extracts of *M. urundeuva* in the paw edema induced by carrageenan in mice**

Time (h)	Difference between the right and left paws (mm)				Inhibition (%)		
	CG 1%	DICLO 10 mg/kg	ES 500 mg/kg	ES 2000 mg/kg	DICLO 10 mg/kg	DEMU 500 mg/kg	DEMU 2000 mg/kg
0	0.1+0.2	0.0+0.1	0.0+0.1	0.0+0.1	-	-	-
1	1.4+0.2	0.8+0.4***	0.8+0.2***	0.4+0.4***	46.4	49.0	69.0
2	1.6+0.3	0.7+0.2***	0.7+0.3**	1.2+0.5***	59.8	60.2	26.8
3	1.2+0.3	0.6+0.2**	0.6+0.3***	1.0+0.3***	53.4	37.8	20.5
4	1.4+0.3	0.6+0.2**	0.6+0.3***	1.1+0.3***	59.3	43.9	16.0

Values represent the mean of difference of paw measure  $\pm$  Standard deviation (n = 6/group). Statistically different from the control group, \*\* p<0.01, \*\*\*P<0.001 (ANOVA followed by Student Newman-Keuls test). DEMU: Dry extract of *M. urundeuva*, DICLO: Diclofenac sodium, CG: carrageenan.

**DISCUSSION****Evaluation of the drying parameters**

According to table 2, the results of the 2<sup>3+1</sup> factorial experimental design involving the variables drying air inlet temperature, flow rate of the drying composition fed to the spray drying, and the proportion of CSD showed that variations in these drying parameters did not result in major changes in process yield or the quercetin levels in dry extracts, but evaluating the effect and significance of these factors on the process yield and concentration of quercetin, statistical analyses were performed by ANOVA and multiple linear regression using the response surface methodology.

As shown in table 3, the independent variables (drying temperature, feed rate and proportion of CSD) did not significantly affect the process yield (p>0.05). However, the drying temperature and feed rate significantly influenced the concentration of quercetin (p<0.05). The analysis of the response surface of the quercetin concentration data in dry extracts showed that as the temperature was increased in association with an increase in the feed rate of input material, the concentration of quercetin also increased (fig. 1).

This indicated that at a temperature of 180 °C and a feed rate of 8 ml/min resulted in an increase in drying efficiency. During the process of drying plant extracts, the increase in temperature generally reduces the surface tension and viscosity of the input material, facilitating the formation of droplets and resulting in higher quality products [31, 32]. Proper adjustment of the feed speed enables the droplets to evaporate before they come into contact with the walls of the drying chamber, preventing the accumulation of material on the chamber walls [33, 34]. Secondary interactions were also observed between the inlet temperature and the CSD (p<0.05), which may have occurred because the temperature variable displayed high significance and the proportion of CSD reacted, making this interaction significant. This was also found upon evaluating the tertiary interaction of the three factors that were significant (p<0.05) due to the significant variables drying temperature and feed rate [35].

The increase of temperature and feed rate favored the concentration of quercetin in dry extracts, while the proportion of CSD had no significant influence, so the extract obtained with a 10% proportion of CSD, 180 °C inlet temperature and 8 ml/min feed rate was chosen to perform the accelerated stability study and evaluation of anti-inflammatory activity.

**Accelerated stability study**

An accelerated stability study was performed to better characterise the dry extract of *M. urundeuva* and monitor quercetin markers for a longer period of time. The stability of pharmaceutical products is essential for assessing the maintenance of quality and efficiency of products during the period and conditions storage, especially of plant products that are more susceptible to physical, chemical and microbiological changes.

Fig. 2 showed the concentrations of quercetin in extract samples stored at 40 °C ( $\pm 2$  °C) and 75% ( $\pm 5\%$ ) during the stability testing period of 6 mo. There was an increase in the value of the concentration of quercetin after 3 mo (69.2  $\mu$ g/ml) compared to the initial concentration (51.5  $\mu$ g/ml), though this remained stable (67.4  $\mu$ g/ml) after 6 mo. This may have occurred due to the evaporation of volatile components present in the extract and moisture loss resulting in increased concentration of quercetin [36].

Thus this study indicated that the drying process by spray dryer resulted in stable extracts dried relative to the preservation of their chemical constituents and the quercetin showed stable physical and chemical characteristics, making it a suitable biomarker for monitoring the studied processes.

**Anti-inflammatory activity**

Table 4 showed the results of the anti-inflammatory effect of the dry extract of *M. urundeuva* (ES) administered by oral route in mice evaluated by the method of paw edema induced by carrageenan. The inhibitions of the paw edemas were significantly different between the groups of diclofenac sodium and the groups that were administered two dosages of the extracts (p<0.05). At a dose of 500 mg/kg, the highest percentage of inhibition of edema was observed at 2 h, while the highest percentage of inhibition of edema was observed at one hour for a dose of 2000 mg/kg. Carrageenan is an inflammatory agent that elicits the inflammatory process and hence the formation of edema through the release of histamine, serotonin, bradykinin, and prostaglandins [3, 37-39]. Thus it is possible that compounds present in the *M. urundeuva* extract interfere with the inflammatory process mediated by these substances. Several studies have demonstrated the anti-inflammatory activity of extracts of *M. urundeuva* [3, 40-42]. This study showed the drying process by spray drier maintained chemical constituents of the extract responsible for anti-inflammatory activities of the plant.

**CONCLUSION**

The spray dryer technique proved to be adequate in obtaining dry extracts of *M. urundeuva* and variations in the proportion of CSD, inlet temperature, and the feed rate showed no significant variations in the drying process yield. Statistically, the study found positive a contribution to the inlet temperature and the feed rate over the concentration of quercetin on the responses analyzed, so that a 10% proportion of CSD, a 180 °C inlet temperature and an 8 ml/min feed rate was considered the most suitable condition for obtaining the dry extracts of *M. urundeuva*.

The dried extracts showed anti-inflammatory activity and the stability study indicated that the drying process by spray drying resulted in dry extracts with stable chemical constituents. In addition, the biomarker quercetin was stable during the drying process and satisfactory for monitoring and providing quality control of *M. urundeuva* extracts in the development of herbal products with this plant.

## ACKNOWLEDGEMENT

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

## CONFLICT OF INTERESTS

Declared none

## REFERENCES

- Santin DA, Leitão Filho HF. Restabelecimento e revisão taxonômica do gênero *Myracrodruon* Freire Allemão (Anacardiaceae). Revista Brasileira de Botânica 1991; 14:133-45.
- Rao VS, Viana GS, Menezes AMS, Gadelha MG. Studies on the antiulcerogenic activity of *Astronium urundeuva* Engl. II. aqueous extract. Braz J Med Biol Res 1987;20:803-5.
- Souza SMC, Aquino LCM, Jr ACM, Bandeira MAM, Nobre MEP, Viana GSB. Antiinflammatory and antitumor properties of tannins from *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Anacardiaceae) in rodents. Phytother Res 2007;21:220-5.
- Carlini EA, Duarte-Ameida JM, Rodrigues E, Tabach R. Antitumor effect of the pepper trees *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira-da-praia) and *Myracrodruon urundeuva* allemão, anacardiaceae (aroeira-do-sertão). Rev Bras Farmacogn 2010;20:140-6.
- Viana GSB, Bandeira MAM, Moura LC, Souza Filho MVP, Matos FJA, Ribeiro RA. Analgesic and antiinflammatory effects of the tannin fraction from *Myracrodruon urundeuva* Fr. All Phytoter Res 1997;11:118-22.
- Sá RA, Argolo ACC, Napoleão TH, Gomes FS, Santos NDL, Melo CML, et al. Antioxidant, fusarium growth inhibition and nasutitermes corniger repellent activities of secondary metabolites from *Myracrodruon urundeuva* heartwood. Int Dech Monog 2009;63:470-7.
- Nobre-Júnior HV, Oliveira RA, Maia FD, Nogueira MAS, Moraes MO, Bandeira MAM, et al. Neuroprotective effects of chalcones from *Myracrodruon urundeuva* on 6-Hydroxydopamine-induced cytotoxicity in rat mesencephalic cells. Neurochem Res 2009;34:1066-75.
- Mahmoud TS, Marques MR, Pessoa CÔ, Lotufo LVC, Magalhães HIF, Moraes MO, et al. *In vitro* cytotoxic activity of Brazilian Middle West plant extracts. Rev Bras Farmacogn 2011;21:456-64.
- Souza SMC. Padronização de extratos vegetais: *Astronium urundeuva* (Anacardiaceae). Dissertação de mestrado, Universidade Estadual Paulista, Araraquara; 2012.
- Monteiro JM, Lins Neto EMF, Amorim ELC, Strattmann RR, Araújo EL, Albuquerque UP. Teor de taninos em três espécies medicinais arbóreas simpátricas da caatinga. Rev Arvore 2005;29:999-1005.
- Silva MD. Estudo farmacobotânico de três espécies medicinais da caatinga em pernambuco. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife; 2008.
- Muthukala B, Sivakumari K, Ashok K. Antioxidant and anti-inflammatory potential of quercetin. Int J Curr Pharm Res 2015;7:758-79.
- Kleemann R, Verschuren L, Morrison M, Zadelaar S, van Erk MJ, Wielinga PY, et al. Anti-inflammatory, anti-proliferative and anti-atherosclerotic effects of quercetin in human *in vitro* and *in vivo* models. Atherosclerosis 2011;218:44-52.
- Anitha T. Medicinal plants used in skin protection. Asian J Pharm Clin Res 2012;5:35-8.
- Rattanachaikunsopon P, Phumkhaichorn P. Contents and antibacterial activity of flavonoids extracted from leaves of *Psidium guajava*. J Med Plants Res 2010;4:393-6.
- Jandú JJB, Silva LCN, Pereira APC, Souza RM, Silva Júnior CA, Figueiredo RCBQ, et al. *Myracrodruon urundeuva* bark: an antimicrobial, antioxidant and non-cytotoxic agent. J Med Plants Res 2013;7:413-8.
- Simões VN, Favarin LRV, Cabeza NA, Oliveira TD, Fiorucci AR, Stropa JM, et al. Síntese, caracterização e estudo das propriedades de um novo complexo mononuclear contendo quercetina e ion Ga(III). Quim Nova 2013;36:495-501.
- Aguado MI, Núñez MB, Dudik HN, Bela A, Raisman JS, Sansberro P. Diseño de comprimidos de extrato de *Aloysia polystachya* por compresión directa. Latt Am J Pharm 2006;25:225-30.
- Carvalho ACB, Balbino EE, Maciel A, Perfeito JPS. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. Rev Bras Farmacogn 2008;18:314-9.
- Oliveira OW, Petrovick PR. Secagem por aspersão (*spray drying*) de extratos vegetais: bases e aplicações. Rev Bras Farmacogn 2010;20:641-50.
- Broadhead J, Rouan SKE, Rhodes CT. The spray drying of pharmaceuticals. Drug Dev Ind Pharm 1992;18:1169-206.
- Teixeira HF. Avaliação da influência de adjuvantes farmacêuticos sobre as características físicas, químicas, tecnológicas e farmacológicas de extratos secos nebulizados de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. Compositae-Marcela. Caderno de Farmacia 1997;13:151-2.
- Cunha AM, Menon S, Menon R, Couto AG, Bürger C, Biavatti MW. Hypoglycemic activity of dried extracts of *Bauhinia forficata* Link. Phytomedicine 2010;17:37-41.
- Gallo L, Llabot JM, Allemandi D, Bucalá V, Piña J. Influence of spray-drying operating conditions on *Rhamnus purshiana* (Cáscara sagrada) extract powder physical properties. Powder Technol 2011;208:205-14.
- Rowe RC, Sheskey PJ, Owen SC. Handbook of pharmaceutical excipients. London/Chicago: Pharmaceutical Press; 2006.
- American Chemical Society (ACS). Subcommittee on Environmental Analytical Chemistry. Guidelines for data acquisition and data quality evaluation in environmental chemistry. Anal Chem 1980;52:2242-9.
- ICH Q2B. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation Research. Guidance for industry: ICH Q2B Validation of analytical procedures: methodology. Rockville; 1995.
- Anderson MJ, Whitcomb PJ. DOE Simplified. Practical Tools for Effective Experimentation. Seconded. Productivity Press: New York; 2007.
- ICH Q1A R2. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation Research. Guidance for industry: Q1A (R2) Stability Testing of New Drug Substances and Products. Rockville; 2003.
- Winter CA, Risley EA, Nuss GW. Carrageenin-induced edemas in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. Proc Soc Exp Biol Med 1962;111:544-7.
- Cortés-Rojas DF, Souza CRF, Oliveira WP. Optimisation of spray drying conditions for production of *Bidens pilosa* L. dried extract. Chem Eng Res Des 2015;93:366-76.
- Soares LAL. Obtenção de comprimidos contendo alto teor de produto seco por aspersão de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek-Celastraceae. Desenvolvimento tecnológico de produtos intermediários e final. Tese de doutorado, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, Porto Alegre; 2002.
- Masters K. Spray Drying Handbook. Londres: George Godwin; 1985.
- Rankell AS, Lieberman HÁ, Schiffman RF. Secagem. In: Lachman L, Lieberman HA, Kanig JL. Teoria e prática na indústria farmacêutica. Lisboa: Calouste Gulbenkian; 2001. p. 83-112.
- Cardoso NQ. Desenvolvimento tecnológico de extratos vegetais padronizados a partir da *Lafoesia pacari* A. St-Hill (Lythraceae). Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, UFG, Goiânia; 2013.
- Florence AT, Attwood D. Physicochemical Principles of Pharmacy. London: Pharmaceutical Press (PhP); 2006.
- Di Rosa M, Giroud JP, Willoughby DA. Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. J Pathol 1971;104:15-28.
- Niazi J, Gupta V, Chakarborty P, Kumar P. Antiinflammatory and antipyretic activity of *Aletris moluccana* leaves. Asian J Pharm Clin Res 2010;3:35-7.
- Babu AS, Karki SS. Anti-inflammatory activity of various extracts of roots of *Calotropis procera* against different inflammation models. Int J Pharm Pharm Sci 2011;3:191-4.

Leite et al.

Int J Pharm Pharm Sci, Vol 9, Issue 2, 154-159

40. Bandeira MAM, Matos FJA, Braz-Filho R. New chalconoid dimers from *Myracrodruon urundeuva*. Nat Prod Lett 1994;4:113-20.
41. Viana GSB, Bandeira MAM, Matos FJA. Analgesic and antiinflammatory effects of chalcones isolated from *Myracrodruon urundeuva* Allemão. Phytomedicine 2003;10:189-95.
42. Viana GSB, Bandeira MAM, Moura LC, Souza Filho MVP, Matos FJA, Ribeiro RA. Analgesic and antiinflammatory effects of the tannin fraction from *Myracrodruon urundeuva* Fr. All Phitoter Res 1997;11:118-22.

**How to cite this article**

- Renata Da Silva Leite, Valmir Gomes De Souza, Agna Hélia De Oliveira, José Venâncio Chaves Júnior, Islaine De Souza Salvador, Fabrício Havy Dantas De Andrade, Rui Oliveira Macedo, Fábio Santos De Souza. Standardisation and stability evaluation of dry extracts of *Myracrodruon urundeuva* allemão obtained by a spray drier. Int J Pharm Pharm Sci 2017;9(2):154-159.