



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

SANDRA MIRANDA ARARUNA

**DESENVOLVIMENTO E PADRONIZAÇÃO (HPLC-DAD) DO EXTRATO SECO
POR SPRAY-DRYER DE *Amburana cearensis* A. C. SMITH (CUMARU)**

**FORTALEZA
2008**

SANDRA MIRANDA ARARUNA

**DESENVOLVIMENTO E PADRONIZAÇÃO (HPLC-DAD) DO EXTRATO SECO
POR SPRAY-DRYER DE *Amburana cearensis* A. C. SMITH (CUMARU)**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas

Orientadora – Profa. Dra. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal

**FORTALEZA
2008**

A685d Araruna, Sandra Miranda.
Desenvolvimento e Padronização do extrato seco
por Spray dryer de **Amburana cearensis** A. C. Smith
(cumaru) / Sandra Miranda Araruna-
Fortaleza, 2008
xxxf:il

Orientador: Profa. Dra. Kalyne Almeida Moreira
Leal

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará.
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas,
Fortaleza-Ce, 2008

1. Fitoterapia. 2. *Torresea cearensis* 3. Tecnologia
farmacêutica I. Leal, Luzia Kalyne Almeida Moreira
(orient.) II. Título

CDD:615.321

SANDRA MIRANDA ARARUNA

**DESENVOLVIMENTO E PADRONIZAÇÃO (HPLC-DAD) DO EXTRATO SECO
POR SPRAY-DRYER DE *Amburana cearensis* A. C. SMITH (CUMARU)**

Esta dissertação foi submetida como parte dos requisitos necessários á obtenção do GRAU DE MESTRE em Ciências Farmacêuticas, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca Setorial da referida Universidade.

A citação de qualquer trecho desta dissertação é permitida, desde que seja feita de acordo com as normas da ética científica.

Aprovada em 26 / 07 / 2008

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal

Profa. Dra. Glauce Socorro de Barros Viana

Profa. Dra. Maria Goretti Rodrigues de Queiroz

A Deus, que é fonte infinita em minha vida.

Ao meu pai (*in memorium*), minha mãe, meus irmãos, familiares e amigos
companheiros de todas as horas.

AGRADECIMENTOS

Seria difícil encontrar palavras que pudessem expressar o carinho, a gratidão e a amizade que encontrei em todos os momentos desta jornada, mas espero que elas possam representar um pouco do muito que tenho a agradecer à tantas pessoas maravilhosas.

A Profa. Dra. Kalyne Leal, pela orientação, apoio e dedicação, mas acima de tudo pela amizade e exemplo de profissional.

A Profa Célia Praça... a quem devo muito desta conquista, pela enorme apoio, pela amizade e carinho.

A Profa. Dra. Silvia Freitas pela colaboração nas análises estatísticas;

Aos Professores do Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pelos ensinamentos e contribuições científicas no decorrer da minha formação.

As Funcionárias da secretaria de Pós-Graduação, Graça e Raimundinha, pela ajuda e atenção.

Aos Funcionários da Farmácia-Escola e do CEDEFAR, pelo convívio agradável e as gentilezas;

Ao apoio, amizade e companheirismo compartilhados pelos mestrandos do curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas-UFC e bolsistas do Laboratório de Farmacognosia-UFC: Amanda, Noé Fonseca, Rebeca, Vlândia Queiroz, Ana Cláudia, Nadja, Alex, Eduardo, Sâmia, Renata, Luciana, Afonso, Jean, Felipe, Taiana, Diego.

Ao Laboratório Central de Saúde Pública do Estado do Ceará – LACEN e a Importadora Cearense Ltda- IMPORTEC, na pessoa de seus Dirigentes, por

acreditar na importância da minha capacitação profissional e permitir a minha liberação das atividades profissionais durante o período necessário para desenvolver as atividades acadêmicas, meu muito obrigada e gratidão.

Aos meus colegas de trabalho do LACEN e da IMPORTEC pela paciência, motivação e apoio.

Os meus amigos e minhas amigas pelo carinho, incentivo nos momentos críticos ocorridos durante a realização deste curso.

Ao meu namorado, Claudio Lima, pelo carinho, incentivo e companheirismo.

A minha família pela minha formação profissional e principalmente por respeitar e acreditar nas minhas decisões.

A todos aqueles que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

DESENVOLVIMENTO, PADRONIZAÇÃO (CLAE-DAD) E AVALIAÇÃO PRÉ-CLÍNICA DO EXTRATO SECO POR SPRAY-DRYER DE AMBURANA CEARENSIS A. C. SMITH (CUMARU). Aluna: Sandra Miranda Araruna. Orientador: Profa. Dra. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Departamento de Farmácia. Universidade Federal do Ceará.

Nas últimas décadas a produção de fitoterápicos tem explorado novas possibilidades tecnológicas como a produção de extratos secos padronizados. Isso decorre das vantagens apresentadas desses produtos em relação às soluções extrativas. A casca do caule de *Amburana cearensis* (cumaru, Fabaceae) é uma árvore amplamente utilizada nas práticas caseiras da medicina popular nordestina indicado no tratamento da asma. A planta tem sido utilizada como matéria-prima ativa na produção do xarope de cumaru por Programas Públicos de Fitoterapia e indústria Farmacêutica. O objetivo do presente trabalho foi realizar o desenvolvimento e controle das etapas inerentes à produção do extrato seco padronizado de *Amburana cearensis*, bem como investigar seus efeitos tóxicos pré-clínicos. Para tanto, foi desenvolvido selecionado o método de secagem da planta (droga vegetal) monitorado pela determinação de parâmetros, como teor de umidade e de marcadores (cumarina e amburosídio A) determinados por CLAE-DAD. No desenvolvimento do método extrativo, foram investigadas a influência de algumas variáveis sobre o processo (tempo de maceração/percolação, volume de extração e % de etanol em água). O teor de marcadores (resposta) foi usado como critério de avaliação. A análise estatística, incluindo análise de superfície da resposta mostrou que a medida que o teor de etanol (20, 60 e 100% em água) aumenta, aumenta o teor de marcadores nos extratos, enquanto o tempo mostrou uma influência sutil no processo. O volume de extração apresentou um efeito inverso ao observado para o teor de etanol. Assim, o método extrativo selecionado obtido por maceração/percolação a temperatura ambiente compreendeu: solução extratora: Etanol a 100%; volume de extração: 200 mL e tempo de extração: 24h). As melhores condições de secagem do extrato de cumaru foram a temperatura de entrada de

95°C e 25 % de dióxido de silício, resultando num rendimento de 40 %. A avaliação toxicológica pré-clínica preliminar *in vivo* – teste hipocrático, mostrou que o extrato seco padronizado de cumaru (Cumarina: $123,0 \pm 0,08$ mg/g extrato; amburosídeo A: $496,8 \pm 0,29$ mg/g) possui uma baixa toxicidade, porém mostrou uma citotoxicidade nas concentrações de 50, 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$ em neutrófilo humano mensurada através da atividade da enzima lactato desidrogenase. Os resultados obtidos no presente estudo permitiram o desenvolvimento de métodos de produção, além de parâmetros analíticos que podem ser aplicados desde no controle de qualidade da droga vegetal à produtos derivados como o extrato seco de *A. cearensis*. Além disso, a avaliação toxicológica pré-clínica permitiu uma visão preliminar do grau de segurança pré-clínica do produto.

UNITERMOS: *Amburana cearensis*, Cumaru, Fabaceae, CLAE, *Spray dryer*

ABSTRACT

DEVELOPMENT, PADRONIZAÇÃO (HPLC-DAD) TOXICOLOGICAL AND EVALUATION OF PRE-CLINICAL EXTRATO DRY BY SPRAY FOR DRYER *Amburana cearensis* A. C. Smith (CUMARU). Student: Sandra Miranda Araruna. Advisor: Profa. Dr. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal. The Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Department of Pharmacy. Federal University of Ceara.

In recent decades the production of phytotherapy has explored new technological possibilities as the production of standardized extracts dried. This stems from the advantages offered these products for solutions extrativas. The bark of the stem of *Amburana cearensis* (cumaru, Fabaceae) is a tree widely used in home practice of medicine popular northeastern indicated for the treatment of asthma. The plant has been used as feedstock in the production of active syrup cumaru by Public Programs of Phytotherapy and pharmaceutical industry. The purpose of this study was the development and control of the steps involved in the production of dry extract standardized *Amburana cearensis* and investigate its pre-clinical toxicity. For both, was selected developed the method of drying of the (drug plant) monitored by the determination of parameters such as moisture content and labels (coumarin and amburosidio A) determined by HPLC-DAD. In developing the method extractive, shape investigated the influence of some variables on the process (of maceration time / percolation, and volume of extraction% ethanol in water). The content of labels (response) was used as a criterion for evaluation. The statistical analysis, including analysis of the surface of the response showed that the extent that the content of ethanol (20, 60 and 100% in water) increases, increases the level of markers in the extracts, while the time showed a subtle influence in the process. The volume of extraction had an effect opposite to that observed for the content of ethanol. Thus, the method selected extractive obtained by macerating / percolation at room temperature understood: extractor solution: Ethanol 100%; volume of extraction: 200 mL and time of extraction: 24h). The best conditions for drying the extrtao of cumaru were the temperature of entry of 95 ° C and 25% of silicon dioxide, resulting in a yield of 40%. The toxicological evaluation preliminary pre-clinical in vivo - hipocrático test

showed that the dry extract standardized cumaru (Coumarin: 123.0 ± 0.08 mg / g extract; amburosídeo A: 496.8 ± 0.29 mg / g) has a low toxicity, but showed a cytotoxicity at concentrations of 50, 100 and 200 μ g / ml in human neutrophil measured by the activity of the enzyme lactate dehydrogenase. The results of this study enabled the development of production methods, and analytical parameters that can be applied from the quality control of drugs to plant products such as dried extract of *A. cearenis*. Moreover, the toxicological evaluation pre-clinical allowed a preliminary overview of the degree of pre-clinical safety of the product.

UNITERMOS: *Amburana cearenis*, Cumaru, Fabaceae, HPLC, *Spray dryer*

LISTA DE TABELAS

TABELAS		PAGINA
TABELA 5.1	Equipamentos.....	51
TABELA 5.2	Adjuvantes Farmacêuticos, Reagentes e Substâncias Químicas de Referência.....	51
TABELA 6.1	Objetivos e métodos empregados para a padronização da droga vegetal, solução extrativa e extrato seco por <i>Spray dryer</i> e toxicidade pré-clínica da <i>Amburana cearensis</i>	52
TABELA 6.2	Planejamento experimental obtido pelo delineamento fatorial 2 ³ acrescido de 1 repetição na combinação central, para obtenção dos extratos de cumaru.....	57
TABELA 6.3	Delineamento experimental de secagem do extrato hidroalcoólico de <i>A. cearensis</i>	60
TABELA 6.5	Condições Operacionais para secagem por <i>Spray dryer</i>	62
TABELA 8.1	Determinação da umidade da droga vegetal (%) em diferentes tempo de secagem nas estufa de secagem com e sem circulação de ar pelo método gravimétrico e analisador de umidade infra-vermelho.....	66
TABELA 8.2	Concentrações de cumarina e amburosídio A determinadas nos extratos de cumaru por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	94
TABELA 8.3	Análise de variância da concentração de cumarina nos extratos de cumaru obtido sob diferentes condições (variáveis: teor de etanol – EtOH em água, tempo de maceração - T e volume de extração - V).....	95
TABELA 8.4	Análise de variância da concentração de amburosídio A nos extratos de cumaru obtido sob diferentes condições (variáveis: teor de etanol – EtOH em água, tempo de maceração - T e volume de extração - V).....	95
TABELA 8.5	Análise comparativa da solução extrativa etanólica de <i>A. cearensis</i>	96
TABELA 8.6	Concentração de cumarina e amburosídio A na solução extrativa, tintura e xarope de cumaru determinada por CLAE-DAD.....	98

TABELA 8.7	Condições Operacionais padronizada para secagem do extrato hidroalcoólico de <i>A. cearensis</i> por <i>Spray dryer</i>	104
TABELA 8.8	Resultados obtidos do planejamento experimental para estudo dos adjuvantes avaliados para a produção do extrato seco de cumaru por <i>Spray dryer</i>	104
TABELA 8.9	Rendimento da do extrato hidroalcoólico de <i>A. cearensis</i> pelo processo de secagem por <i>Spray dryer</i>	105
TABELA 8.10	Caracterização tecnológica do extrato seco por <i>Spray dryer</i> padronizado.....	107

LISTA DE FIGURAS

FIGURAS

PAGINA

FIGURA 2.1	<i>Amburana cearensis</i> A. C. Smith (CUMURU).....	24
FIGURA 2.2	Metabólitos secundários obtidos das cascas do caule de <i>A. cearensis</i>	26
FIGURA 6.1	Diagrama de esquematização do processo extrativo da <i>Amburana cearensis</i>	58
FIGURA 6.2	Fotografia do MSD 1.0 (Labmaq) e seus sistemas principais	61
FIGURA 8.1	Análise comparativa das condições de secagem da droga vegetal em estufa de secagem com circulação de ar e sem circulação de ar monitorando o teor dos marcadores Amburosídeo A (AMB A) e Cumarina (CUM).....	67
FIGURA 8.2	Granulometria da casca do caule de <i>Amburana cearensis</i> seca e pulverizada – droga vegetal.....	69
FIGURA 8.3	Gráfico de superfície de resposta do teor de cumarina em função do volume de extração e % etanol. Tempo de maceração de 24 horas.....	73
FIGURA 8.4	Gráfico de superfície de resposta do teor de cumarina em função do volume de extração e % etanol. Tempo de maceração de 48 horas.....	74
FIGURA 8.5	Gráfico de superfície de resposta do teor de cumarina em função do volume de extração e % etanol. Tempo de maceração de 72 horas.....	75
FIGURA 8.6	Gráfico de superfície de resposta do teor de cumarina em função do tempo de extração e % etanol. Volume de extração: 200 mL.....	76
FIGURA 8.7	Gráfico de superfície de resposta do teor de cumarina em função do tempo de extração e % etanol. Volume de extração: 400 mL.....	77
FIGURA 8.8	Gráfico de superfície de resposta do teor de cumarina em função do tempo de extração e % etanol. Volume de extração: 600 mL.....	78
FIGURA 8.9	Gráfico de superfície de resposta do teor de cumarina em função do tempo de extração e volume de extração. Etanol:	79

	20% em água.....	
FIGURA 8.10	Gráfico de superfície de resposta do teor de cumarina em função do tempo de extração e volume de extração. Etanol: 60% em água.....	80
FIGURA 8.11	Gráfico de superfície de resposta do teor de cumarina em função do tempo de extração e volume de extração. Etanol: 100% em água.....	81
FIGURA 8.12	Gráfico de superfície de resposta do teor de cumarina em função de: A- volume de extração e teor alcoólico, B- tempo de extração e teor alcoólico e C- volume e tempo de extração.....	82
FIGURA 8.13	Gráfico de superfície de resposta do teor de amburosídio A em função do volume de extração e % etanol. Tempo de extração de 24 horas.....	83
FIGURA 8.14	Gráfico de superfície de resposta do teor de amburosídio A em função do volume de extração e teor alcoólico. Tempo de extração de 48horas.....	84
FIGURA 8.15	Gráfico de superfície de resposta do teor de amburosídio A em função do volume de extração e teor alcoólico. Tempo de extração de 72 horas.....	85
FIGURA 8.16	Gráfico de superfície de resposta do teor de amburosídio A em função do tempo de extração e teor alcoólico. Volume de extração: 200 mL.....	87
FIGURA 8.17	Gráfico de superfície de resposta do teor de amburosídio A em função do tempo de extração e teor alcoólico. Volume de extração: 400 mL.....	88
FIGURA 8.18	Gráfico de superfície de resposta do teor de amburosídio A em função do tempo de extração e teor alcoólico. Volume de extração: 600 mL.....	89
FIGURA 8.19	Gráfico de superfície de resposta do teor de amburosídio A em função do tempo e do volume de extração.....	90
FIGURA 8.20	Gráfico de superfície de resposta do teor de amburosídio A em função do tempo e do volume de extração.....	91
FIGURA 8.21	Gráfico de superfície de resposta do teor de amburosídio A	92

	em função de: A- volume de extração e teor alcoólico, B- tempo de extração e teor alcoólico e C- volume e tempo de extração.....	
FIGURA 8.22	A. Cromatograma dos marcadores e B. Cromatograma do extrato de cumaru obtidos por CLAE-DAD.....	97
FIGURA 8.23	Aspecto obtido após secagem na estufa/1h com extrato alcoólico e Dióxido de silício.....	100
FIGURA 8.24	Aspecto obtido após secagem na estufa/1h com extrato alcoólico e Amido.....	100
FIGURA 8.25	Aspecto obtido após secagem na estufa/1h com extrato alcoólico e Celulose.....	101
FIGURA 8.26	Aspecto obtido após secagem na estufa/1h com extrato alcoólico e Polivinilpirrolidona (PVP-K30).....	101
FIGURA 8.27	Avaliação do teor do Amburosídeo A (Amb A) e da Cumarina após secagem por <i>Spray dryer</i> com adjuvante dióxido de silício nos percentuais 25, 50, 75 e 100% em relação ao teor de resíduo sólido.....	105
FIGURA 8.28	Comparação do rendimento obtido do Extrato seco de Cumaru por <i>Spray dryer</i> com adjuvante dióxido de silício nos percentuais 25, 50, 75 e 100% em relação ao teor de resíduo sólido.....	106
FIGURA 8.29	Aspecto macroscópico do extrato seco de <i>A. cearensis</i>	107
FIGURA 8.30	Avaliação da citotoxicidade do extrato seco padronizado de cumaru (ESPC) em neutrófilos isolados do sangue humano através da determinação da atividade da lactato desidrogenase (LDH). Os valores representam a média \pm EPM. * $p < 0,05$ (ANOVA, Tukey).....	110

SUMARIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	23
2.1	<i>Amburana cearensis</i>	23
2.1.1	Aspecto Etnofarmacológico, Fitoquímico e Farmacológicos da <i>Amburana cearensis</i>	23
2.1.2	Composição Fitoquímica da <i>Amburana cearensis</i>	26
2.2	PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE FITOTERÁPICOS	29
2.2.1	Produção e controle de qualidade de fitoterápicos	32
2.2.2	A importância da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência –CLAE	34
2.3	TECNOLOGIAS DE PRODUTOS NATURAIS DE ORIGEM VEGETAL	35
2.3.1	Extratos vegetais	35
2.3.2	Extratos secos vegetais	38
2.3.3	Secagem em <i>Spray-dryer</i> (ou secagem por atomização)	42
2.4	APLICAÇÃO DO PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS NA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA	44
3	JUSTIFICATIVA	46
4	OBJETIVOS	48
4.1	OBJETIVO GERAL	48
4.1.1	Objetivos específicos	48
5	MATERIAIS	49
5.1	MÉTODOS	53
5.1.1	Desenvolvimento de método de preparação e caracterização da droga vegetal	54
5.1.1.1	Secagem do Material Vegetal	54
5.1.1.2	Análise granulométrica do pó	54
5.1.1.3	Determinação de água em drogas vegetais	54
5.1.1.4	Fração de cinzas totais	55

5.1.1.5	Determinação do Índice de Intumescência	55
5.1.1.6	Desenvolvimento, avaliação e seleção o método de produção da solução extrativa	56
5.1.1.7	Processo Extrativo	56
5.1.1.8	Preparação e análise cromatográfica das soluções extrativas	56
5.1.1.9	Determinação do Teor de Resíduo Seco	56
5.1.1.10	Determinação do pH	57
5.1.1.11	Determinação da Densidade	58
5.1.1.12	Determinação do Teor de Cumarina e Amburosídio A por CLAE-DAD	58
5.1.1.13	Produção, avaliação e seleção do método de secagem do extrato de <i>A. cearensis</i> por <i>Spray dryer</i>	58
5.1.1.14	Procedimento de secagem do extrato de <i>Amburana cearensis</i> e caracterização físico-química	59
5.1.1.15	Caracterização do extrato seco de <i>Amburana cearensis</i>	63
5.2	ESTUDO TOXICOLÓGICO PRÉ-CLÍNICO DO EXTRATO SECO POR <i>SPRAY DRYER</i> DE <i>Amburana cearensis</i>	64
6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	64
7	RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
7.1	DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA DROGA VEGETAL - CASCA DO CAULE DE CUMARU	65
7.2	DESENVOLVIMENTO, AVALIAÇÃO E SELEÇÃO DO MÉTODO DE PRODUÇÃO DO EXTRATO PADRONIZADO DE CUMARU	71
7.3	PRODUÇÃO, AVALIAÇÃO E SELEÇÃO DO MÉTODO DE SECAGEM DO EXTRATO PADRONIZADO DE CUMARU	100
7.4	TOXICIDADE PRÉ-CLÍNICA DO EXTRATO SECO PADRONIZADO DE CUMARU	107
8	CONCLUSÃO	112
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	114

1. INTRODUÇÃO

Há milhares de anos, o homem vem utilizando os recursos da flora no tratamento de diversas patologias. Foi através da observação e da experimentação pelos povos primitivos que as propriedades terapêuticas de determinadas plantas foram sendo descobertas e propagadas de geração em geração, fazendo parte da cultura popular. Há relatos, por exemplo, do uso de plantas com finalidades terapêuticas por volta de 3.000 a.C. na obra *Pen Ts'ao* do chinês Shen Nung (KO, 1999; TYLER, 1996). No ano 78 d.C., o botânico grego Pedânios Dioscórides descreveu cerca de 600 plantas medicinais, além de produtos minerais e animais no tratado *De Matéria Medica*. No século XVI, o médico suíço Philippus Aureolus, conhecido como Paracelsus (1493-1541), formulou a “Teoria das Assinaturas”, baseada no provérbio latim *similia similibus curantur*, “semelhante cura semelhante”. Com esta teoria acreditava-se que a forma, a cor, o sabor e o odor das plantas estavam relacionados com as suas propriedades terapêuticas, podendo dar indícios de seu uso clínico. Algumas destas plantas passaram a fazer parte das farmacopéias alopáticas e homeopáticas a partir do século XIX, quando se começou a investigar suas bases terapêuticas (ELVIN-LEWIS, 2001).

O isolamento da morfina da *Papaver somniferum* em 1803 pelo farmacêutico Friedrich Wilhelm Adam Sertürner, marcou o início do processo de extração de princípios ativos de plantas. A partir de então, outras substâncias foram isoladas, como por exemplo, a quinina e a quinidina obtidas da *Cinchona* spp, em 1819, e a atropina da *Atropa belladonna*, em 1831, que passaram a ser utilizadas em substituição aos extratos vegetais (SCHULZ, HÄNSEL, TYLER, 1998; TYLER 1996).

Assim, a produção de fármacos via síntese química, o crescimento do poder econômico das indústrias farmacêuticas e a ausência de comprovações científicas de eficácia das substâncias de origem vegetal aliada às dificuldades de controle químico, físico-químico, farmacológico e toxicológico dos extratos vegetais até então utilizados, impulsionaram a substituição destes por fármacos sintéticos (RATES, 2001).

Após a década de 1960, observou-se, então, um desinteresse da indústria farmacêutica e dos institutos de pesquisa pela busca de novas substâncias de

origem vegetal, por se acreditar que já haviam sido isoladas as principais substâncias ativas das drogas vegetais conhecidas, bem como já haviam sido realizadas todas as possíveis modificações químicas de interesse destas substâncias (SCHENCKEL, GOSMAN, PETROVICK, 1999).

Entretanto, a partir dos anos 1980, os avanços técnicos e o desenvolvimento de novos métodos de isolamento de substâncias ativas a partir de fontes naturais, permitiram maior rapidez na identificação de substâncias em amostras complexas como os extratos vegetais, ressurgindo o interesse pela pesquisa destas substâncias como protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos.

Atualmente, os fitoterápicos são amplamente utilizados em diversos países. Na África, por exemplo, 80% da população depende do uso destes medicamentos, os quais representam alternativas frente ao alto custo dos fármacos sintéticos. O mercado mundial de medicamentos fitoterápicos é de US\$ 43 bilhões por ano. Somente nos Estados Unidos da América, este mercado representa US\$ 5 bilhões por ano, sendo o setor de mais rápido crescimento no mercado farmacêutico norte-americano (ASCHWANDEN, 2001). Estima-se que cerca de 60% dos fármacos com atividades antitumorais e antimicrobianas, já comercializados ou em fase de pesquisa clínica, sejam de origem natural (SHU, 1998).

Diante da grande importância dos medicamentos fitoterápicos, vários países da Europa estão intensificando esforços para unificar a legislação referente aos medicamentos fitoterápicos, amplamente comercializados nestes países (em especial na Alemanha e França). Por outro lado, nos Estados Unidos, as preparações à base de plantas são classificadas como suplementos nutricionais, não sendo necessário submeter dados de segurança e eficácia ao *Food and Drug Administration* (FDA) para a comercialização destes produtos.

No Brasil, a legislação para medicamentos fitoterápicos vem sofrendo modificações nos últimos anos. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) vem elaborando normas para a regulamentação destes medicamentos, desde a Portaria nº 6 de 1995, que estabeleceu prazos para que as indústrias farmacêuticas apresentassem dados de eficácia e segurança dos medicamentos fitoterápicos, passando pela RDC nº 17 de 2000, e a Resolução RDC nº 48 de 16 de março de

2004, atualmente em vigor, que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos, (Brasil, 2004).

Esta preocupação das autoridades regulatórias com a normatização dos medicamentos fitoterápicos propicia a avaliação de aspectos importantes, como a eficácia e segurança do uso destes medicamentos. O uso tradicional de diversas plantas medicinais baseados em conhecimentos populares, aliado à crença de que, por ser natural não causa reações adversas, fez com que poucas plantas medicinais fossem avaliadas através de estudos pré-clínicos e clínicos, a fim de comprovar sua eficácia e segurança, (Brasil, 2000).

Além disto, sabe-se que muitas plantas medicinais apresentam substâncias que podem desencadear reações adversas, seja por seus próprios componentes, seja pela presença de contaminantes ou adulterantes presentes nas preparações fitoterápicas, exigindo um rigoroso controle de qualidade desde o cultivo, coleta da planta, extração de seus constituintes, até a elaboração do medicamento, (Brasil, 2000).

Neste contexto inúmeros estudos com plantas medicinais que ocorrem na região Nordeste, do Brasil vem sendo realizados, em particular algumas empregadas como matéria-prima vegetal ativa por Programas de Fitoterapia Públicos ou Indústrias Farmacêuticas como a *Amburana cearensis*, visando o desenvolvimento e a produção de produto fitoterápico baseado nos avanços tecnológicos como o uso do *Spray dryer* na fase de secagem do extrato vegetal e a cromatografia líquida de alta eficiência na determinação do teor de princípio ativo e identificação de marcadores químicos.

2. REFERENCIAL TEORICO

2.1. *Amburana cearensis*

2.1.1. Aspectos Etnofarmacológico e Farmacológicos da *Amburana cearensis*

Amburana cearensis A.C. Smith (sin. *Torresea cearensis* Fr. All) (Figura 2.1) pertence à família Leguminosae Papilionoideae (Fabaceae), é uma árvore de caule ereto, que chega a atingir 15 metros de altura, sendo ao lado da *A. acreana* os únicos representantes do gênero. Popularmente, é conhecida por diversas designações, como imburana-de-cheiro, cerejeira e cumaru. Esta última denominação, a mais famosa delas, freqüentemente provoca confusões com outra leguminosa homônima chamada *Dipteryx odorata*, ambas ricas em cumarina. Já o termo imburana costuma provocar iguais equívocos na identificação, por se referir também à *Commiphora leptophloeos* (Burseraceae), conhecida comumente como imburana-de-espinho (MAIA,2004).

Embora considerada nativa do sertão nordestino, a ocorrência de *A. cearensis* pode ser observada na América do Sul (do Peru à Argentina), (CARVALHO,1994), apresentando-se como uma árvore frondosa, com flores brancas, vagem achatada e casca do caule vermelho-pardacenta cujo agradável odor é conferido pela cumarina. Suas sementes são pretas, aladas e exalam forte cheiro de cumarina (semelhante à baunilha), (CORRÊA,1984). No Nordeste, o período de floração ocorre no início da estação seca, entre maio e julho, e a frutificação se dá de agosto a outubro.

Sob o ponto de vista econômico, *A. cearensis* apresenta inestimável importância comercial dada suas várias aplicações, sendo largamente empregada na carpintaria e perfumaria. Comercializada com o nome de cerejeira-do-nordeste, sua madeira é utilizada na fabricação de móveis, portas, janelas e caixotaria, devido à reconhecida durabilidade. As sementes servem como aromatizantes e repelentes de insetos para roupas e estantes, podendo também ser utilizadas na fabricação de um pó fino, designadas rapé-de-imburana, empregado para induzir espirros no tratamento de “estalecido” (congestão nasal por acúmulo de secreção), (MAIA,2004).

Na medicina popular, as cascas do caule são tradicionalmente utilizadas na preparação de “lambedôs” caseiros para tratamento de doenças respiratórias, como gripe, resfriado, bronquite e asma. Industrialmente, a forma farmacêutica disponível

é o xarope de cumaru, produzido pelo Programa Farmácias Vivas, Farmácia-Escola/UFC e por algumas empresas privadas. Ensaio farmacológico pré-clínico demonstraram atividades antiinflamatória, broncodilatadora e analgésica para o extrato hidroalcoólico, tendo sido possível ainda atribuir os efeitos observados à cumarina e à fração flavonoídica, (LEAL,1997 e 2003)

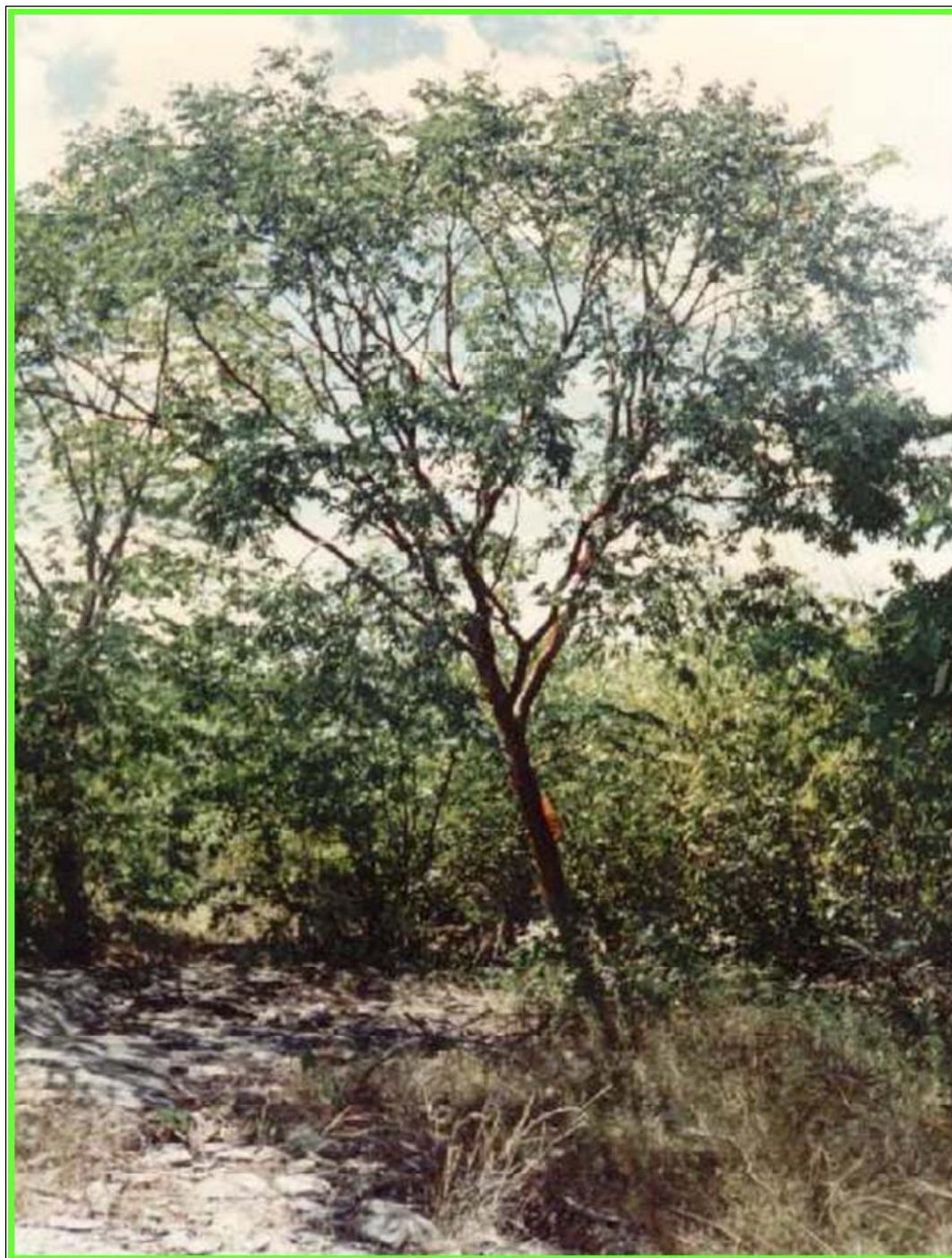


Figura 2.1 – *Amburana cearensis* A.C. Smith (sin. *Torresea cearensis* Fr. All) A. G. Leal; E. R. Silveira; LORENZI & MATOS, 2002)

2.1.2. Composição Fitoquímica da *Amburana cearensis*

Estudos fitoquímicos das sementes de *Amburana cearensis* relevou que possuem aproximadamente 23% de óleo fixo constituído principalmente do glicerídeo dos ácidos: palmítico (18,6%), linoléico (7,1%) oléico (53,1%) e esteárico (8,0%), além de 4% de cumarina e um pouco de umbeliferona (SOUSA et. al., 1991; MORS & RIZZINI, 2000).

Das cascas do caule da planta coletada no município de Quixeramobim-CE, foram isoladas várias substâncias incluindo cumarina (1,2 benzopirona), isocampferídeo (5,7- dihidroxi-2-(4-hidrofenil)-3-metoxi), fisetina (3,5,3',4'-tetrahidroxiflavona), alfalona (6-hidroxi-4'-7-dimetoxiisoflavona) e o glucosídeo fenólico, amburosídeo A (4-(O-β-D- glucopiranosil)-hidroxi-7-(3" –metoxi-4"-hidroxi-benzoil)-benzilálcool) (Figura 2.2) (CANUTO,2006).

Pesquisas científicas com plantas medicinais têm demonstrado que o Extrato Hidroalcolico de *Amburana cearensis* possui na sua composição química um composto em grande quantidade denominado cumarina (1,2 benzopirona) que é responsável pela atividade antinoceptiva, broncodilatadora e antiinflamatório da planta, (LEAL et al, 1997:2000). Além da cumarina outros compostos estão presentes, tais como o ácido protocatecuíco, isocampferídeo (5,7- dihidroxi-2-(4-hidrofenil)-3-metoxi), campferol, amburosídeo A e B (4-(O-β-D- glucopiranosil)-hidroxi-7-(3" –metoxi-4"-hidroxi-benzoil)-benzil álcool) isolados da casca do caule da *Amburana cearensis*.

As cumarinas foram isoladas a primeira vez em 1820 por Vogel, membro da Royal Academy of Science em Munique. Vogel associou o odor doce e agradável das sementes do cumaru, com o cheiro das flores do trevo (*Melilotus officinalis*), e ele conseguiu isolar, em ambos, a cumarina, em forma de cristais

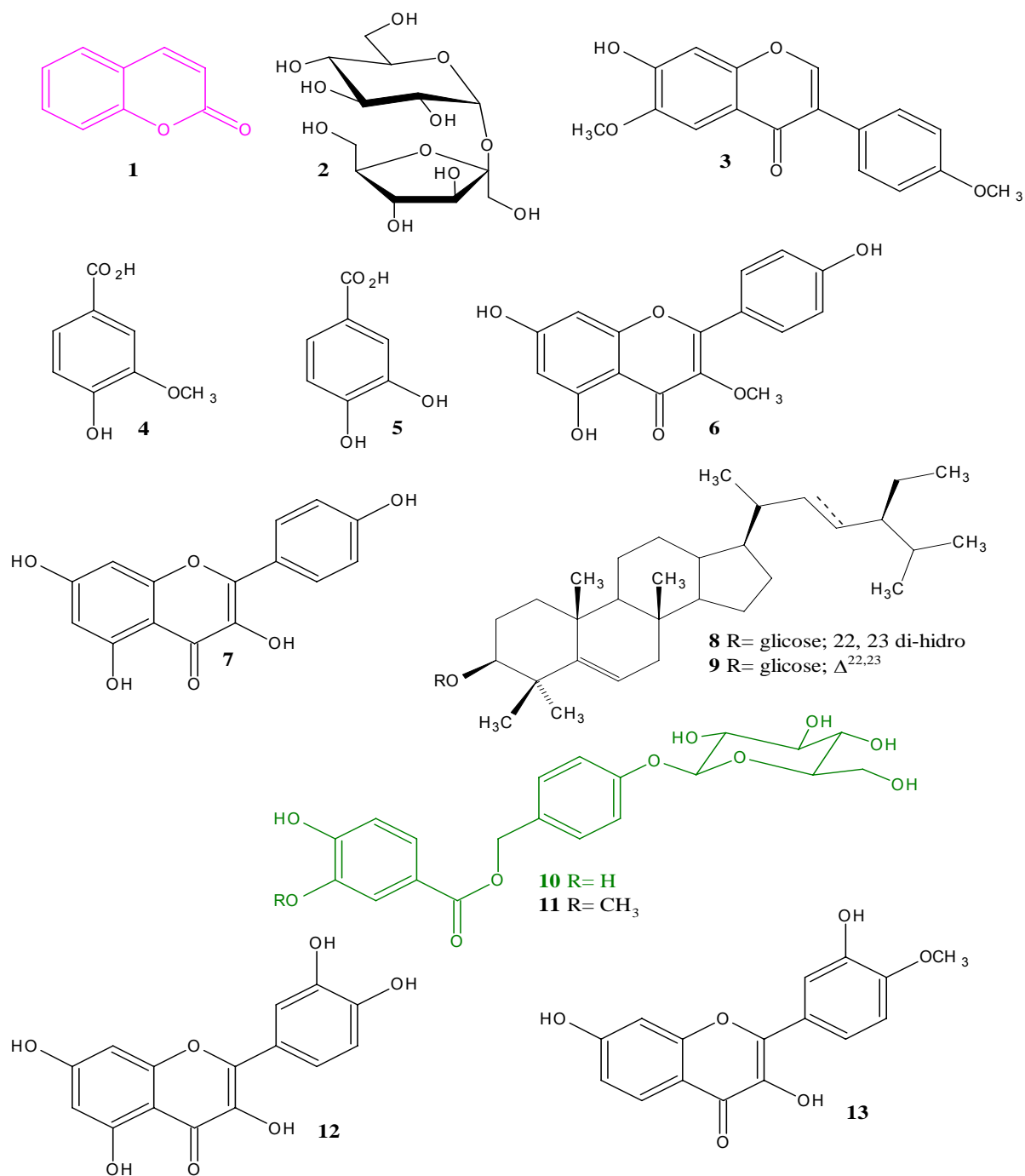


Figura 2.2. Metabólitos secundários obtidos das cascas do caule de *A. cearensis*. **1.** cumarina , **2.** sacarose, **3.** afroomsina, **4.** ácido vanílico , **5.** ácido protocatecuico, **6.** isocampferídio, **7.** campferol, **8.** β -sitosterol glicosilado, **9.** estigmasterol glicosilado, **10.** amburosídeo A, **11.** amburosídeo B, **12.** quercetina, **13.** 4'-metoxifisetina.

brancos, idênticos, mas em muito menor quantidade nas flores do trevo (LEITE *et al.*, 1992). Atualmente, mais de 800 cumarinas já foram identificadas, isoladas e caracterizadas, distribuídas por várias espécies e famílias de plantas (PEREIRA *et al.*, 1992 *apud* CELEGHINI, 2001).

As cumarinas são uma série de compostos que possuem em comum um anel aromático fundido em um anel de lactonas condensado. São divididas em quatro subgrupos: as hidroxí ou metoxi cumarinas, as cumarinas isoprenílicas, as piranocumarinas e as furanocumarinas. A maioria das cumarinas possuem propriedades farmacológicas, sendo utilizadas em diversas áreas da medicina. As hidroxícumarinas são utilizadas como anticoagulantes orais. Sua propriedade anticoagulante é exercida de forma indireta, através da inibição da síntese dos fatores de coagulação dependentes da vitamina K. Elas inibem também a síntese da proteína C e S, que são inibidores fisiológicos da coagulação. Podem ser encontradas no cravo doce. As furanocumarinas ou psoralenos, como o psoraleno, o bergapteno e xantotoxino são compostos foto sensibilizadores usados no tratamento da psoríase, do vitiligo e outras doenças de pele (CARDOSO *et al.*, 2002). Estão presentes na figueira e na hera de São João. Algumas piranocumarinas, como as isoladas de plantas da espécie *Calophyllum* inibem a replicação do HIV-1, formando uma nova classe de compostos que combatem o vírus da Aids (KASHMAN *et al.*, 1992 *apud* DHARMARATNE *et al.*, 1998).

A cumarina é extensivamente utilizada na medicina popular devido as suas propriedades antiinflamatórias. A cumarina é um princípio ativo natural existente em diversas plantas como o guaco, a emburana, o agrião, a ipeca, o cumaru, o carapiá, a canela, a chicória, entre outras, e em frutas como o morango, a cereja, a framboesa e o damasco. Possui um odor forte e característico de baunilha. É utilizada como fixador de perfumes, aditivo em tintas e *spray*, aromatizantes de alimentos, além de possuir propriedades antibióticas, bronco dilatadora, antiinflamatória, analgésica e também ser utilizada em tratamentos contra o câncer.

O ácido protocatecuíco é um composto fenólico largamente distribuído em muitas espécies de plantas. Sua ocorrência foi confirmada em muitas espécies, dentre elas *Hibiscus sadariffa* e *Sebastiania brasiliensis* (TSENG *et al.*, 2000;

PENNA et al., 2001). Estudos prévios tem demonstrado que este composto possui forte atividade antioxidante e antitumoral, induziu apoptose em células leucêmicas humana (TSENG et al., 2000), efeito hepatoprotetor em ratos com hepatotoxicidade induzida por terc-butil-hidroxiperoxido (LIU et al, 2002), e exibiu atividade anticarcinogênica em vários modelos animais (HIROSE et al., 1995).

O Campferol é um dos muitos flavonóides estudados e mundialmente distribuído em plantas (MIDDLETON Jr et al., 2000). Este flavonóide mostrou forte atividade antioxidante em vários modelos animais estudados e fraca citotoxicidade em linhagens de células humanas (COS et al., 2001).

O Isocampferídeo é o 3-metoxil derivado do Campferídeo presente em diferentes espécies vegetais (AHMED et al., 1994; BANSKOTA et al., 2000A). Estudos farmacológicos demonstraram que o isocampferídeo teve efeito citotóxico nas células cancerígenas 26-L5 do colón de murino (BANSKOTA et al., 2000b).

O Amburosídeo A e B, compostos glicosídicos fenólicos, foi primeiramente isolado da *Amburana cearensis* e in vitro foi avaliada a atividade antimalárica, antiprotozoária, antifúngica e antibacteriana, demonstrando moderada atividade antimalárica e antiprotozoária (BRAVO et al., 1999).

2.2. PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE FITOTERÁPICOS

O desenvolvimento de fitoterápicos inclui várias etapas e envolve um processo interdisciplinar, multidisciplinar e interinstitucional. As áreas de conhecimento envolvidas vão desde a antropologia botânica, botânica, agronomia, ecologia, química, fitoquímica, farmacologia, toxicologia, biotecnologia, química orgânica até a tecnologia farmacêutica.

A pesquisa tem início pelo levantamento em literatura científica e catálogos internacionais nas áreas específicas do referido conhecimento, seguindo em paralelo a pesquisa etnobotânica, a qual trata da observação do uso popular de plantas nas diferentes culturas (CAMARGO, 1999). Pode-se também selecionar uma planta por meio de pesquisa quimiotaxonômica (onde o aspecto morfológico pode revelar a presença de determinados grupos químicos que tenham atividade

farmacológica). Seqüencialmente, coleta-se um espécime da planta, prepara-se uma exsicata e faz-se a identificação botânica e o registro em um museu ou herbário. (DI STASI, 1996; MIGUEL & MIGUEL, 1999; SIMÕES et al., 2001).

A seguir remete-se o vegetal aos estudos botânicos, que têm como objetivo a identificação inequívoca de uma espécie vegetal, por meio da análise de características anatômicas, procurando destacar aquelas consideradas peculiares de uma determinada espécie e que, em última instância, estejam presentes na matéria-prima vegetal. Da mesma forma, é importante o estabelecimento de características botânicas comparativas que permitam detectar, no controle de qualidade, a presença de uma ou mais espécies adulterantes.

Quanto ao encaminhamento aos estudos agrônômicos; objetiva-se à produção abundante e homogênea de matéria-prima, preservando, ao mesmo tempo, a espécie e a biodiversidade. Os principais aspectos a serem investigados visam à otimização da produção de biomassa e de constituintes ativos, por meio de estudos edafo-climáticos, de micropropagação, inter-relações ecológicas, densidade de plantio, de melhoramento genético da espécie, além dos aspectos sanitários de manejo e beneficiamento da espécie (DALLACOSTA & MIGUEL, 2001; SCHEFER, 1992).

Os estudos fitoquímicos compreendem as etapas de isolamento, elucidação estrutural e identificação dos constituintes mais importantes do vegetal, principalmente de substâncias originárias do metabolismo secundário, responsáveis, ou não, pela ação biológica. Esses conhecimentos permitem identificar a espécie vegetal, conjuntamente com ensaios de atividade biológica, analisar e caracterizar frações ou substâncias bioativas. Ressalta-se ainda a importância para o desenvolvimento de fitoterápicos do estabelecimento de marcadores químicos, que são indispensáveis para o planejamento e monitoramento das ações de transformação tecnológicas aliado a estudos de estabilidade dos produtos intermediário e final. Para isso, o conhecimento da estrutura química tem especial relevância no caso de substâncias facilmente degradáveis por fatores tais como luz, calor e solventes, atrelados ao processo tecnológico (MIGUEL, 1999).

A avaliação da atividade biológica inclui a investigação da atividade farmacológica e toxicológica das substâncias isoladas, de frações obtidas ou extratos totais da droga vegetal. A necessidade de constatar e verificar a atividade biológica de uma planta e dos produtos derivados pode ser abordada sob dois pontos de vista. O primeiro, é investigar uma seqüência de aspectos, iniciando pela seleção das ações farmacológicas atribuídas à planta. Seleciona-se a atividade farmacológica específica a ser explorada, identificando-se o farmacógeno, e quais respectivas substâncias podem apresentar a atividade farmacológica propriamente dita. Seqüencialmente identifica-se a concentração e potência da substância ativa em questão, buscando inclusive a presença ou não de substâncias tóxicas na fração de interesse (MIGUEL, 1999).

O segundo diz respeito ao estabelecimento de estratégias de desenvolvimento tecnológico, no qual a sua validação exige a conservação da composição química e, sobretudo, da atividade farmacológica a ser explorada (MIGUEL, 1999).

O conhecimento dos aspectos de atividade biológica do vegetal é requisito essencial para a transformação da planta medicinal no produto fitoterápico, havendo também interesse em estudos de desenvolvimento de metodologias analíticas.

Esses métodos permitem a avaliação da qualidade do produto fitoterápico, promovem a garantia da constância da ação terapêutica, a segurança de utilização, sendo a eles atribuídas funções diferenciadas.

Nesta ótica destaca-se a avaliação do teor de substância ou grupo de substâncias ativas e do perfil qualitativo dos constituintes químicos de interesse, presentes na matéria-prima vegetal, produtos intermediários e produto final; por meio de métodos espectrofotométricos, cromatográficos, físicos, físico-químicos ou químicos, devendo possuir especificidade, exatidão, precisão e tempo de rotina analítica, viabilizando-se que o mesmo possa ser utilizado em estudos de estabilidade, permitindo, inclusive, a detecção de produtos oriundos da degradação das substâncias ativas ou dos marcadores químicos.

Inclui-se a avaliação das características físicas e físico-químicas dos produtos tecnologicamente transformados, em razão de que estas características podem

interferir sobre o perfil biofarmacêutico do produto fitoterápico. Além disso, a utilização de métodos analíticos visando à quantificação de substâncias ativas ou de referência bem como de aspectos relativos à forma farmacêutica são essenciais para a obtenção da homogeneidade dos lotes de produção.

2.2.1. Produção e controle de qualidade de fitoterápicos

A produção de fitoterápicos pressupõe que estudos de desenvolvimento tenham sido realizados anteriormente, estando os procedimentos e etapas de processamento devidamente estabelecido. Cumprindo esse quesito, a obtenção de produtos fitoterápicos, quer seja em escala oficial, hospitalar ou industrial, requer conhecimentos e habilidades específicas dos três pontos do ciclo de produção de medicamentos. Tais conhecimentos e habilidades devem relacionar-se, objetivando a produção de produtos farmacêuticos adequados, de acordo com os conceitos atuais de qualidade, que são o nível de satisfação do produtor e usuário do medicamento e o cumprimento de requisitos pré-fixados que conduzam à sua total adequabilidade ao fim a que se destinam. Portanto, o conhecimento do que se pretende fazer deve ser aliado às normas que permitam alcançar o objetivo traçado, para alcançar a qualidade total, (SIMÕES et al,2001).

De acordo com o tipo de matéria-prima, deverão ser delineados os controles de qualidade e tomados os cuidados de conservação e manipulação.

O conhecimento dos adjuvantes empregados deverá abranger, em primeiro lugar, as especificações adequadas de conservação e manipulação.

A especificação correta do material de embalagem primária pressupõe, por sua vez, o completo domínio do material a ser acondicionado e da composição dos continentes. A sua reatividade, representada pela capacidade de absorver substâncias, de ser permeável a gases ou vapores no sentido do ambiente ou do interior da embalagem ou de ceder componentes para o produto, pode comprometer a qualidade do produto final, (SIMÕES et al,2001).

Na produção de produtos fitoterápicos, grande atenção deve ser dada no planejamento das áreas à preservação da qualidade físico-química e microbiológica,

quer da matéria-prima ativa, quer dos produtos intermediários e final, (SIMÕES et al,2001).

A validação dos equipamentos, aqui entendida como o conjunto das ações que procuram verificar o correto funcionamento dos mesmos, e a manutenção preventiva complementam as atitudes necessárias de conformidade às boas práticas de produção, (SIMÕES et al,1999).

Nesta perspectiva se estabelece a montagem do Procedimento Operacional Padrão (POP), o qual deve fixar os parâmetros de operação a serem mantidos e determinar as técnicas de controle de qualidade a serem executadas.

A obtenção de formas farmacêuticas derivadas de matéria-prima vegetal necessita de um planejamento inicial, com a finalidade de planejar o manejo da matéria-prima vegetal e demais adjuvantes de acordo com as especificações dos mesmos, além da determinação seqüencial das ações de transformação e monitoramento dos pontos e metodologias de controle mais apropriados, (SIMÕES et al,2001).

Normalmente o produto intermediário que inicia o processamento da forma farmacêutica classificasse como preparação complexa, trata-se de um produto oriundo da transformação da planta ou do farmacógeno. Dependendo da disponibilidade de mercado, a matéria-prima pode ser um extrato ou produto derivado, contendo adjuvantes farmacêuticos ou não. Este requer uma série de operações de transformação.

A transformação do material vegetal para um produto tecnicamente elaborado, que pode ser intermediário ou acabado, implica a utilização de operações de transformação tecnológica.

A complexidade do processo e o número de operações envolvidas estão determinados pelo grau de transformação tecnológica requerido, que pode ser mínimo, como é o caso de pós e drogas rasuradas destinados à preparação de chás; ou bem maior, quando o objetivo é obter frações purificadas ou fórmulas sólidas revestidas. Para cada uma das etapas do processo tecnológico, a escolha de uma operação específica é determinada pelas características físicas e físico-

químicas do produto a ser obtido, pela natureza da matéria-prima a ser transformada e pelo volume de produção exigido, (SIMÕES et al,2001).

A garantia de qualidade do material vegetal a ser processado é fundamental na preparação de fitoterápicos, devendo considerar-se aspectos botânicos, químicos, farmacológicos e de pureza. Por esse motivo, além do teor de substância ativa e intensidade das atividades farmacológica e toxicológica, outros aspectos de qualidade a serem avaliados são a carga microbiana, contaminação química por metais pesados, pesticidas e outros defensivos agrícolas, e presença de matéria estranha, como terra, areia, partes vegetais, insetos e pequenos vertebrados ou de produtos oriundos destes (BRASIL, 2000).

2.2.2. A importância da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma técnica de separação fundamentada na distribuição dos componentes de uma mistura entre duas fases imiscíveis, a fase móvel, líquida, e a fase estacionária, contida em uma coluna. As separações são alcançadas por partição, adsorção, troca iônica, exclusão por tamanho ou interações estereoquímicas, dependendo do tipo de fase estacionária utilizada. A CLAE apresenta vantagens sobre a cromatografia à gás para a análises de combinações orgânicas. Amostras não voláteis e termolábeis são, preferencialmente, analisadas por CLAE. A maioria das análises farmacêuticas está baseada no método de separação por partição e devem ocorrer em tempo curto de análise. Vários fatores químicos e físico-químicos influenciam na separação cromatográfica, esses dependem da natureza química das substâncias a serem separadas, da composição e fluxo da fase móvel, da composição e área superficial da fase estacionária, (F. Bras. IV. ED.,2000).

O equipamento utilizado consiste em um reservatório que contém a fase móvel, uma bomba com a finalidade de impelir a fase móvel pelo sistema cromatográfico, um injetor para introduzir a amostra no sistema, uma coluna cromatográfica, um detector e um dispositivo de captura de dados, como um computador, integrador ou registrador. Além de receber e enviar informações para o

detector, computadores são utilizados para controlar todo o sistema cromatográfico, proporcionando maior operacionalidade e logística, (F. Bras. IV. ED.,2000).

Para a maioria das análises farmacêuticas, a separação é alcançada por partição dos componentes, presentes na solução a ser analisada, entre as fases móvel e estacionária. Sistemas que consistem de fases estacionárias polares e fases móveis apolares são definidos como cromatografia em fase normal, enquanto o oposto, fases móveis polares e fases estacionárias apolares, são denominados de cromatografia em fase reversa. A finalidade de uma substância pela fase estacionária e, conseqüentemente, seu tempo de retenção na coluna, é controlado pela polaridade da fase móvel, (F. Bras. IV. ED.,2000).

As fases estacionárias utilizadas em cromatografia em fase reversa consistem, tipicamente, de uma molécula orgânica quimicamente ligada à sílica ou outros suportes, como grafita porosa.

Os detectores mais frequentemente utilizados em cromatografia líquida de alta eficiência são os espectrofotométricos. Tais detectores consistem de uma célula de fluxo localizada no término da coluna cromatográfica. A radiação ultravioleta passa, constantemente, pela célula de fluxo e é recebida no detector. Com o sistema em funcionamento, as substâncias são eluídas da coluna, passam pela célula de fluxo e absorvem a radiação, resultando em alterações mensuráveis no nível de energia. Esses detectores podem apresentar comprimento de onda fixo, variável ou múltiplo, (F. Bras. IV. ED.,2000).

Os detectores denominados de arranjo de diodos (DAD), são detectores de comprimento de onda múltiplo. Nestes, a radiação ultravioleta é transmitida através da célula de fluxo, absorvida pela amostra e então separada em seus componentes originais, que são detectores, individualmente, pelo detector de fotodiodos, registrando dados de absorvância em toda a faixa do espectro do ultravioleta e visível e, adicionalmente, os espectros de cada pico registrado no cromatograma.

2.3. TECNOLOGIAS DE PRODUTOS NATURAIS DE ORIGEM VEGETAL

2.3.1. Extratos Vegetais

Os extratos vegetais são preparações farmacêuticas líquidas ou em pó produzido a partir da extração dos princípios ativos das drogas vegetais por diversas técnicas, como a maceração, percolação dentre outras. Essa operação farmacêutica tem o objetivo de extrair e concentrar as substâncias presentes em baixas concentrações, desenvolver formulações para diversas afecções, aumentar o prazo de validade e conservação de algumas drogas e propiciar à separação dos ativos efetivamente envolvidos nos efeitos terapêuticos, retirando-se ou minimizando-se a presença de compostos indesejáveis, (SCHENKEL EP *et al* , 2002)

De acordo com a composição química da planta (particularmente a solubilidade dos ativos presentes), utilizam-se diversos solventes, mas principalmente misturas de água e álcool, bem como outros solventes como acetato de etila, acetona, etc.

A mistura da planta com esses solventes ocorre por métodos também diversos, mas os principais são a maceração e percolação (técnicas em que o solvente fica em contato estático ou dinâmico com a planta) e a turbólise (emprego de um equipamento tipo um liquidificador industrial, que pulveriza as partes vegetais e lava os conteúdos celulares). Ao final de tempos diversos (desde 30 minutos até vários dias de extração), obtém-se o extrato líquido que pode ser o objetivo final da extração, geralmente chamado *tintura* (concentração de 10 ou 20%) ou também *extrato fluido* (concentração de 100%), (SCHENKEL EP *et al* , 2002)

Como as possibilidades de extração são diversas, surge o problema: resultam produtos distintos em qualidade e concentração de ativos, levando a diferentes preços finais bem como a resultados terapêuticos igualmente variáveis. Por isso faz-se necessária a padronização dos extratos, de modo a fornecer dados sobre ativos em miligramas e dessa forma orientar-se a prescrição e a utilização pelos pacientes, (SCHENKEL EP *et al* , 2002)

As padronizações dos extratos são feitas obedecendo a critérios, como a relação droga-extrato, que significa o quanto em peso foi inicialmente utilizado da planta seca para fornecer que quantidade de extrato seco. Normalmente, uma planta seca após extração e filtração fornece um extrato líquido que, se levado a resíduo

por evaporação, fornece uma quantidade de pó (sem adição de excipientes) na proporção de cerca de 30%, havendo casos em que a variação vai de 5-50% segundo a solubilidade dos ativos, (SCHENKEL EP *et al* , 2002)

No caso dos 30%, a relação droga extrato é de 3:1 representando que foram necessários 3 quilos da planta seca para fornecer 1 quilo do extrato em pó; para a planta que fornece 50% de resíduo, a proporção é de 2:1 e no caso da planta com 5% a proporção é dez vezes maior, portanto de 20:1.

Como quase sempre ocorre adição de excipientes com objetivos de permitir que o processo industrial ocorra facilmente e diminuir a absorção de umidade do ambiente pelo extrato seco, essas proporções diminuem um pouco mas sempre representam a concentração do extrato de modo geral. Cuidados precisam ser tomados, pois há casos absurdos no mercado de extratos 1:2, isto é, de 1 quilo de planta obteve-se, após extração e filtração da polpa da planta, 2 quilos de extrato seco. Isso representa quase uma “multiplicação dos pães” para usar uma linguagem bíblica, evidenciando um extrato no qual os ativos (geralmente na proporção de 30% do quilo inicial) estão diluídos em 170% de excipiente gerando um extrato quase ‘homeopático’ de tão pequenas são as concentrações de ativos disponíveis, (SCHENKEL EP *et al* , 2002)

A outra forma de padronização envolve o doseamento químico das substâncias químicas relacionadas aos efeitos terapêuticos, geralmente simbolizados em uma substância biologicamente ativa ou grupo químico que ocorrem na formulação de maneira mais expressiva em quantidade ou potência farmacológica. Essas poucas substâncias são também chamadas de *marcadores*, geralmente os próprios princípios ativos ou, no caso de não se conhecer exatamente qual é o ativo, a que ocorre em maior abundância na planta, (SCHENKEL EP *et al* , 2002).

Embora esta seja a técnica mais aceita atualmente e a melhor em termos de garantia da eficácia dos produtos, há algumas dificuldades para sua efetivação. Em primeiro, por carecer de padrões isolados e puros, comercialmente disponíveis e que possam ser utilizados rotineiramente em controle de qualidade; e em segundo lugar, há várias plantas que embora conhecidas e estudadas, ainda não receberam

pesquisas para isolar e identificar seus ativos principais ou, por outro lado, tais substâncias isoladas não estão disponíveis comercialmente, dificultando ou mesmo inviabilizando o doseamento por marcador. Situam-se nesse grupo plantas como o guaco, a espinheira-santa ou a catuaba vermelha, sendo praticados em alternativa ao doseamento dos marcadores, os doseamentos dos grupos químicos gerais como taninos, flavonóides ou cumarinas, (SCHENKEL EP and *et al* , 2002).

2.3.2. Extratos Vegetais Secos

Nas últimas décadas, a produção de produtos fitoterápicos tem explorado novas possibilidades tecnológicas para a obtenção de extratos secos. Isso decorre das vantagens apresentadas pelos extratos secos, quando comparados à soluções extrativas. A secagem é uma operação farmacêutica usada na remoção de um líquido de um material por aplicação do calor o que se consegue por transferência de um líquido a partir de uma superfície para uma fase gasosa instaurada (LACHMAN et al, 2001).

O processo de secagem na indústria farmacêutica é usado para diferentes finalidades na produção de medicamentos. Por exemplo, visando a obtenção de grânulos que podem ser dispensados nessa forma ou usados em comprimidos ou cápsulas, no processamento de materiais, na secagem por aspersão ou na preparação de extratos pulverulentos.

Na obtenção de produtos secos utiliza-se na indústria farmacêutica diversos sistemas de tratamento dos sólidos, dentre estes comentaremos o que foi utilizado nesta pesquisa a secagem por *Spray-dryer* ou atomização ou nebulização e o processo de secagem por liofilização.

O processo de secagem por atomização consiste na transformação de um fluxo bombeável (solução, suspensão, pasta ou lama) em produto seco por um único processo de secagem (MASTERS, 1985). A vaporização da água acontece a partir da formação de uma corrente líquida em pequenas gotas (atomização) que entram em contato com uma quantidade de ar quente suficiente para suprir o calor latente de vaporização. O calor fornecido para o ar de secagem pode vir da queima de

algum combustível ou de outras formas (KING; KIECKBUSCH; GREENWALD, 1984). O tempo de residência do material dentro do equipamento geralmente é curto, normalmente de 3 a 30 segundos (DITTMAN; COOK, 1981).

Três são os tipos básicos de atomizadores: os bicos de pressão (bico atomizador), duplo fluido e o atomizador centrífugo. No *atomizador de pressão*, o extrato hidroalcoólico da droga vegetal é bombeado para o bico atomizador a altas pressões, e é obrigado passar por um orifício de diâmetro muito pequeno. As pressões neste tipo de bico são da ordem de 100 a 600 kgf/cm². Desta maneira, obrigatoriamente faz-se necessário o uso de bombas especiais de alta pressão e materiais resistentes à abrasão para construção do bico. Do ponto de vista energético, os atomizadores de pressão são, via de regra, os mais econômicos dos três. Os bicos de pressão tem em geral capacidades para até 100 litros/hora, sendo necessário a combinação de mais de um bico para secadores com vazões de alimentação maiores que este valor (FILKOVÁ et al, 1995).

No *atomizador duplo fluido*, ou pneumático, a pressão necessária para pulverizar o extrato é geralmente menor do que usada para o sistema de bico de pressão. Neste sistema atomizador, o material líquido é rompido pelo cisalhamento gerado pela diferença de velocidades entre ele e um outro fluido, geralmente o ar. Este é o sistema com maior demanda energética dentre os três, no entanto é largamente utilizado devido à sua grande versatilidade, alto controle de tamanho e uniformidade de gotículas. Um único bico pode atingir vazões de até 1.000 litros/hora, e podem ser usadas cabeças com combinações de vários bicos pneumáticos para vazões maiores. Permitem ampla faixa de tamanhos de partícula para amplas faixas de vazões, por isto são os mais usados em equipamentos de laboratório (FILKOVÁ et al, 1995).

O *atomizador centrífugo*, ou *disco rotativo*, é basicamente um disco que gira na extremidade de um eixo, e onde é injetado o material líquido que se acelera radialmente, pulverizando o extrato vegetal na câmara de secagem. Há inúmeras variantes do projeto do disco que proporcionam ampla faixa de tamanhos de gotículas. Outro fator importante no controle de tamanho é a velocidade de rotação (FILKOVÁ et al, 1995).

Em relação ao sentido de movimentação dos materiais no interior do *Spray dryer*, os modos possíveis são o co-corrente, contra-corrente e misto. Estas variantes de operação são explicadas a seguir:

Ciclo co-corrente: o material líquido pulverizado e o ar de secagem têm mesmo sentido de corrente dentro do equipamento. Em geral, alimentação e ar entram por cima, de maneira que ambos também saem pela parte de baixo do secador.

Ciclo contra-corrente: o material líquido e o ar de secagem têm sentidos de escoamento opostos dentro da câmara. A alimentação de líquido é realizada por cima, mas a entrada do ar é feita pela parte inferior do equipamento, enquanto a saída do produto é por baixo e a do ar por cima.

Ciclo misto: o material é atomizado em direção ascendente, enquanto o ar é alimentado por cima, tendo circulação totalmente descendente dentro da câmara. Isto significa que o material atomizado inicia movimentação ascendente, mas altera seu sentido para descendente sob arraste do ar. Ambos saem do equipamento pela parte inferior.

O secador por nebulização também permite sua associação direta com outros métodos de secagem ou pós-secagem, como a granulação e/ou aglomeração. Por instantaneização, após a secagem no *Spray dryer* o material é aglomerado em um leito fluidizado.

Algumas variantes do *Spray dryer* utilizados na indústria farmacêutica e alimentícia são o Spray-Fluidizado, o qual é indicado para produção de material granulado dispersível. Dependendo da aplicação, alguns em pó necessitam de solubilização maior e mais rápida. Este pode ser obtido num equipamento unificado de *Spray dryer* e leito-fluidizado, que são os chamados *Spray-Fluidizados* e o *Spray chilling* ou *Spray congealing* este é um processo indicado na produção de microcápsulas ou dispersões sólidas de substâncias ativas com o emprego de materiais lipídicos. O diluente ou material lipídico é liquefeito por aquecimento (fusão), misturado com o ativo e atomizado em uma câmara com passagem de ar resfriado. As gotículas de material liquefeito solidificam-se por resfriamento, formando as microcápsulas ou dispersões sólidas. É muito interessante para

processamento de materiais sensíveis à presença de água, por sofrerem hidrólise, e que não apresentem sensibilidade à temperatura, (MASTERS et al, 1979).

As aplicações dos *Spray-dryers* são vastas. Alguns exemplos são:

- Farmacêutica: para essa classe de produtos o processo de secagem por *Spray-dryer* é particularmente interessante em virtude do tempo de contato curto na zona quente do secador. Além disso, a película de água na gota líquida protege os sólidos (temperatura de bulbo úmido) das temperaturas elevadas do gás. Aplicações: fabricação de antibióticos e derivados, vacinas, vitaminas, fármacos em geral.
- Cerâmica: Argilas para aplicações diversas e especiais.
- Química orgânica: Ácidos, sais orgânicos, compostos nitrogenados, plásticos, resinas, catalisadores e corantes, fertilizantes, pesticidas, inseticidas, detergentes em geral, taninos naturais e sintéticos, etc.
- Química inorgânica: Compostos de alumínio, bário, boro, cromo, cloro, enxofre, flúor, iodo, magnésio, hidróxidos e óxidos em geral.
- Outra operação importante e de cunho geral é a microencapsulação, que tem ganhado grande destaque ultimamente nas indústrias alimentícia e farmacêutica.

Microencapsulação: é a inclusão da substância ativa em uma matriz sólida de polímero formando uma microesfera. A microencapsulação tem aplicações em produtos como óleos essenciais, herbicidas, inseticidas, paraticidas, armadilhas biológicas, biopesticidas, fármacos, produtos alimentícios, suplementos minerais, aromas, fragrâncias, aditivos naturais entre outros. A microencapsulação preserva a substância ativa de intempéries, evita perdas nutricionais, inibe reações com outros agentes, mascara cor e sabores, aumenta a vida útil na prateleira, reduz o risco de toxicidade na manipulação de produtos, evita a contaminação, etc.(COUTO et al, 2000).

Outra técnica de secagem empregada pela indústria farmacêutica é a *liofilização* que é um processo que se caracteriza pela retirada da água do material sem submetê-lo a altas temperaturas. No processo de liofilização, o extrato vegetal é congelado a temperaturas de -40 °C e colocado em câmaras de alto vácuo. Com o

aumento progressivo da temperatura e a manutenção da condição de baixíssima pressão (vácuo), atinge-se a temperatura necessária para obter a saída da água do extrato vegetal por sublimação. Dessa forma, o extrato não é exposto a altas temperaturas e conseqüentemente se reduz o risco de degradação. O produto liofilizado, em base seca, possui características químicas e farmacológicas equivalentes ao produto *in natura*, (SOKHANSANJ et al, 1995). Porém, em comparação com o *Spray dryer*, a liofilização tem custos de investimento e operacional muitas vezes maior, sendo sempre recomendável verificar a aplicabilidade do *Spray* e este deve ser sempre preferido caso não haja implicações de qualidade no produto secado. Outra vantagem do *Spray* frente ao liofilizador é a produtividade, a qual é sempre muito superior na secagem por nebulização (FILKOVÁ, et al, 1995)

2.3.3. Secagem em *Spray-dryer* (ou secagem por atomização)

Segundo MATERS, 1991, no desenvolvimento de fitoterápicos, os extratos secos revelam-se especial interesse para a indústria farmacêutica devido a vantagens que os mesmos oferecem, quando comparadas às formas farmacêuticas líquidas ou semi-sólidas: maior estabilidade, maior facilidade de manipulação, características que refletem no produto final como precisão das doses, eficácia terapêutica e segurança de utilização. Entre as técnicas para obtenção de extratos secos, destaca-se a nebulização, que é a secagem de líquidos, em suspensão ou solução por pulverização em pequenas gotículas numa câmara de secagem munida de ar quente circulante, obtendo-se produtos pulverulentos.

No desenvolvimento tecnológico de fitoterápicos, entre as técnicas de secagem de soluções extrativas vegetais, a nebulização ou *Spray-drying* destaca-se pela sua versatilidade, rapidez e preservação da qualidade original da matéria-prima vegetal (MATERS, 1990). A importância da nebulização também está relacionada às características de aplicação apresentadas pelo produto manipulado nebulizado, tais como a manipulação mais simples que a dos extratos moles, maior controle das características tecnológicas, maior estabilidade e uma melhor adequação da dose

empregada (MASTERS, 1979). Como produto intermediário, os extratos nebulizados podem ser utilizados na preparação de comprimidos, cápsulas, granulados, pomadas e outras formas farmacêuticas.

Os secadores por atomização diferem da maioria dos secadores pelo fato de que usam materiais fluidos, tais como soluções, magnas e pastas finas. O fluido é disperso como gotas finas numa corrente de gás quente onde se evaporam rapidamente antes de atingirem a parede da câmara de secagem. O produto seco, em pó fino, é transportado por uma corrente de gás caindo por gravidade num sistema coletor. O pó obtido por esta tecnologia é particularmente apreciado devido à sua alta fluidez, sendo que esta propriedade pode ser atribuída à forma esférica das partículas obtidas. (REMILI et al, 1994).

Embora o processo *Spray-dryer*, seja uma tecnologia cara necessita de altos investimentos em instalação e operações, muitas são as razões pelas quais a mesma é amplamente utilizada (WENDEL, 1998). Essas razões incluem a produção de materiais com propriedades físicas desejadas, a capacidade de processar diferentes tipos de matérias-primas e a flexibilidade da operação. Opera em temperaturas de gás de entrada relativamente baixas com eficiência similar a outros tipos de secagem direta, sendo que o produto obtido, apresenta características homogêneas (ISONO et al, 1995). O tempo de residência do material no interior da câmara de secagem é relativamente pequeno, o que torna esse equipamento adequado para a secagem de produtos termossensíveis, como os extratos vegetais. Esse processo é muito empregado na secagem de inúmeros produtos farmacêuticos, químicos, alimentícios. Sua aplicação mais freqüente é na transformação de líquidos em pós por apenas uma etapa de processamento, (MASTERS, 1979).

Uma vantagem do processo *Spray-dryer* é que a secagem ocorre em condições assépticas evitando possíveis contaminações durante o processamento, podendo-se assumir que uma contaminação bacteriana final procede essencialmente da planta original ou após o processamento, pela manipulação humana.

A maioria dos equipamentos de secagem faz medidas da temperatura, vazão de alimentação, da vazão e da umidade do gás de entrada. Medidas da umidade do ar de exaustão podem ser usadas em vários tipos de análises para prever e melhorar a eficiência do processo de secagem incluindo balanços de massa, balanço de energia, análise higroscópicas, análises estatísticas e ou simulação do processo.

Segundo TIMBERS *et al.*,(1997) medidas de umidade relativa do ar do processo são uma variável significante no controle do secador. Medidas de umidade absoluta são um indicador independente do processo de secagem por que não estão diretamente correlacionadas à temperatura, uma variável de controle comum. Análises do processo ou produto, combinado com testes paramétricos preliminares podem fazer com que a medida da umidade do ar seja um efetivo instrumento no controle dessa operação.

Alguns produtos termossensíveis requerem atenção especial no projeto e operação do equipamento. Estudos realizados por ETZEL *et al* (1996) mostram que enzimas sofrem inativação térmica durante o processo de secagem, problema que pode ser minimizado pela redução na granulometria das gotas atomizadas e pela utilização de baixos teores de sólidos na solução e baixas temperaturas do ar de saída. Esses autores investigaram a influência da temperatura do ar de saída nas propriedades do pó e o efeito da atomização na atividade da enzima fosfatase alcalina do leite.

Extratos de *Amaranthus betacyanin* foram secos em *Spray-dryer* por CAI *et al.*, (2000) usando uma série de maltodextrinas e amidos como adjuvantes. Analisaram a influência da temperatura de ar de entrada-saída e a concentração de sólidos da solução de alimentação nas características finais do produto. Constataram que elevadas temperaturas do ar de entrada-saída causaram grande perda de betacianina (pigmento) durante a secagem, afetando levemente a estabilidade durante a armazenagem do produto. Por outro lado CASADEBAIG *et al.*, (1996) avaliaram dois adjuvantes tecnológicos, a goma arábica e o aerosil 200 na preparação de extratos secos de *Fraxinus excelsior* por *Spray dryer*, e observaram que a presença de adjuvantes tecnológicos no produto seco fez com que seu tempo

de validade fosse aumentado. Além disso, o processo de secagem não modificou as substâncias ativas presentes nos extratos.

2.4. APLICAÇÃO DO PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS NA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA

O planejamento experimental, também denominado delineamento experimental, representa um conjunto de ensaios estabelecido com critérios científicos e estatísticos, com o objetivo de determinar a influência de diversas variáveis nos resultados de um dado sistema ou processo. Esse objetivo maior pode ser dividido em outros objetivos de acordo com o propósito dos ensaios: determinar quais variáveis são mais influentes nos resultados; atribuir valores às variáveis influentes de modo a otimizar os resultados; atribuir valores às variáveis influentes de modo a minimizar a variabilidade dos resultados e, atribuir valores às variáveis influentes de modo a minimizar a influência de variáveis incontroláveis;

A seguir, destacam-se alguns benefícios da utilização das técnicas estatísticas de planejamento experimental: redução do número de ensaios sem prejuízo da qualidade da informação; estudo simultâneo de diversas variáveis, separando seus efeitos; determinação da confiabilidade dos resultados; realização da pesquisa em etapas, num processo iterativo de acréscimo de novos ensaios; seleção das variáveis que influem num processo com número reduzido de ensaios; representação do processo estudado através de expressões matemáticas; elaboração de conclusões a partir de resultados qualitativos.

O uso do planejamento de experimentos na indústria farmacêutica, não é uma ferramenta apenas para a otimização de resultados e a redução da variabilidade dos processos, mas, também, para aumentar o conhecimento sobre processos críticos, (SILVA et al, 2007).

Todos os processos que tenham impacto potencial na qualidade do produto devem ser previamente validados. A validação consiste na comprovação da constância dos resultados obtidos sob controle de determinadas condições de entrada. Para garantir a robustez dos processos analisados, a validação precisa, por seu turno, seguir processos sistematicamente determinados. Conforme já

estabelecido por ALEXANDER (2000), BOOKER (2003), WEESE (1998) e outros, se as técnicas de planejamento e otimização de experimentos são incorporadas nos procedimentos de validação, podem gerar melhor conhecimento do processo e propiciar a exploração de toda sua potencialidade.

Validar processos é estabelecer evidências documentadas que assegurem que um processo específico irá consistentemente fabricar um produto de acordo com especificações e características de qualidade pré-determinadas. A estrutura do Planejamento de Experimentos atende plenamente a estas condições. Basta documentar a execução de todas as etapas previstas e comparar o nível de qualidade atingida na composição de parâmetros recomendados ao final do experimento com aquele que se deseja alcançar. Esta comparação pode utilizar um ou mais dos indicadores de qualidade conhecidos.

Qualquer processo farmacêutico que tenha no mínimo dois parâmetros, como temperatura, velocidade ou tempo, para os quais se possa determinar um valor mínimo e um valor máximo, assim como uma resposta igualmente mensurável, com limites de especificação determinados, é passível de ser estudado mediante o uso do planejamento experimental. É preciso escolher as faixas de valores dos fatores. Em geral, se determinam dois níveis de trabalho, um correspondendo ao valor mínimo e outro ao valor máximo. É, também, freqüente o uso de três níveis, quando a esses dois níveis se acrescenta um valor intermediário.

3. JUSTIFICATIVA

Amburana cearensis silvestre (cumaru) é uma árvore amplamente utilizada nas práticas caseiras da medicina popular nordestina e faz parte de Programas Públicos de Fitoterapia, onde formulações farmacêuticas, como o xarope de cumaru, produzido a partir da casca do caule da planta, é indicado no tratamento da asma (MATOS, 2000; 1998). Vários estudos (LEAL et al., 1995; 1997; 2000; 2003; 2006; CANUTO et al., 2004; 2006) têm mostrado a natureza química, a baixa toxicidade bem como as atividades antinociceptiva, antiinflamatória e relaxante muscular do extrato hidroalcoólico (não padronizado) ou constituintes químicos (cumarina, isocampferídio e amburosídio A) do cumaru silvestre. Na avaliação clínica (Fase I, piloto) do xarope de cumaru não foram evidenciados sinais de toxicidade (SAMPAIO et al., 2000). Atualmente, a formulação farmacêutica que emprega o cumaru como matéria-prima ativa (extrato hidroalcoólico não padronizado) é restringida ao xarope, que muitas vezes apresenta oscilações consideradas na sua qualidade.

A produção de fitoterápicos envolve várias etapas tecnológicas, inseridas num ciclo, que tem início na qualificação da matéria-prima vegetal, passando pelas operações de transformação até a forma farmacêutica final. Durante todos os passos, os parâmetros de qualidade e procedimentos de preparação devem ser bem definidos considerando a complexidade do material vegetal (SONAGLIO et al., 2000). Nas últimas décadas a produção de fitoterápicos tem explorado novas possibilidades tecnológicas para a obtenção de extratos vegetais, como o extrato seco que possui algumas vantagens em relação ao extrato líquido (De PAULA, 1996, TEIXEIRA, 1996). O extrato seco é considerado tecnologicamente viável para fins de produção em larga escala, devido a sua estabilidade química, física e microbiológica, além da facilidade de padronização dos princípios ativos (CORDEIRO, 2000).

Dessa forma, no sentido de contribuirmos para a validação do uso terapêutico do cumaru no tratamento da asma leve a moderada, ou seja, no desenvolvimento de um fitoterápico com garantias da qualidade, segurança e eficácia terapêutica, propomos a realização do presente projeto, que envolve a obtenção de informações

técnicas relevantes desde a preparação da droga vegetal ao desenvolvimento de processos de produção do extrato seco padronizado (CLAE-DAD), além de avaliação toxicológica preliminar. Assim, o presente estudo certamente mostrará possibilidades de novas tecnologias a ser empregada com sucesso na produção de formulações farmacêuticas com emprego do extrato seco padronizado do cumaru como matéria-prima ativa.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

- Realizar o desenvolvimento e controle das etapas inerentes à produção do extrato seco de *Amburana cearensis*, bem como investigar seus efeitos tóxicos pré-clínicos.

4.1.1. Objetivos específicos

- Desenvolver o método de preparação da casca do caule seco do Cumaru (droga vegetal), monitorado através de ensaios físico-químicos de controle de qualidade do cumaru.
- Desenvolver o processo de produção da solução extrativa, monitorado pelo teor de marcadores (cumarina e amburosídeo A) determinado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de arranjo diodo (CLAE-DAD).
- Realizar, avaliar e selecionar o método de secagem do extrato de cumaru por *Spray dryer*.
- Realizar análise cromatográfica (CLAE-DAD) comparativa do extrato seco, da tintura (produto intermediário do xarope) e do xarope de cumaru.
- Avaliar os efeitos tóxicos do extrato seco padronizado de cumaru em neutrófilo humano.

5. MATERIAIS

Esse projeto foi aprovado pela Comissão de Ética e Pesquisa Animal – CEPA da Universidade Federal do Ceará, protocolo N° 067/07, segundo os princípios éticos adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

- **Material botânico:** As cascas do caule de *Amburana cearensis* foram coletadas na fazenda São Vicente, na cidade de Quixeramobim, Ceará. Exsitas (n° 837 e 847) da espécie estão registradas no Herbário Prisco Bezerra, Departamento de Biologia, UFC.
1. **Animais.** Os experimentos foram realizados utilizando-se camundongos albinos (*Mus musculus*) variedade Swiss-Wester (25 a 30g) de ambos os sexos provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará. Os animais foram divididos em grupos e mantidos aproximadamente durante uma semana na sala de tratamento em períodos de claro/escuro de 12 horas para ambientação e aclimatação. Aos animais foram fornecidas água e ração *ad libitum*.
 2. **Sangue humano.** As amostras de sangue foram doadas pelo Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará – Hemoce.
 3. **Composição das soluções**
 - 4.

Tampão HBSS (Solução Salina de Hanks)

Composição	Quantidade (mM)	Empresa
CaCl ₂	1,2	Reagen
MgSO ₄	0,4	Reagen
Na ₂ HPO ₄	0,42	Reagen
KCl	5,4	Reagen
Glicose	5,5	Reagen
NaCl	136	Reagen
Água destilada q.s.p.	1,0 L	UFC

pH=7,

Tampão HBSS modificado

Composição	Quantidade (mM)	Empresa
Na ₂ HPO ₄	0,42	Reagen
KCl	5,4	Reagen
Glicose	5,5	Reagen
NaCl	136	Reagen
Água destilada q.s.p.	1,0 L	UFC

pH=7,4

Tampão HBSS modificado concentrado

Composição	Quantidade	Empresa
Na ₂ HPO ₄	4,2 mM	Reagen
KCl	54,0 mM	Reagen
Glicose	55,0 mM	Reagen
NaCl	1,36 M	Reagen
Água destilada q.s.p.	1,0 L	UFC

pH=7,0

Tabela. 5.1 Equipamentos utilizados no desenvolvimento da pesquisa

Equipamento	Marca e Nacionalidade
Sistema HPLC constituído de: 1 módulo de separação, 2996 photodiode array detector, software empower, coluna: x terra RP18 5u, 250x4,6mm.	Waters, USA
Secador mini <i>spray-dryer</i>	Labmaq, Brasil
Estufa de secagem com circulação de ar	Lawes, Brasil
Analizador de umidade infravermelho	Gehaka, Brasil
Balança analítica	Mettler-Toledo, Suíça
Balança semi-analítica	Toledo, Suíça
Máquina de triturar casca	Trapp, Brasil
Percolador	Permutation, Brasil
Agitador magnético	Tecnal, Brasil
Agitador mecânico	Tecnal, Brasil
Sistema de filtração à vácuo	Millipore, Usa
Banho ultrassônico	Unique, Brasil
Termohigrometro	Inconterm, Brasil
Produtest- granulometria	Telastem, Brasil
Câmara fotográfica digital	Sony, China

Tabela 5.2 Adjuvantes Farmacêuticos, Reagentes e Substâncias Químicas de Referência utilizados no desenvolvimento da pesquisa

Adjuvante farmacêutico, reagente e substância química de referência	MARCA
Metanol grau HPLC	J. T. Baker, USA
Acetonitrila grau HPLC	J.T Baker, USA
Trietilamina ps	Merck, Alemanha
Dioxido de silício (aerosil)	Allchemistry, Brasil
Maltodextrina	Allchemistry, Brasil
Amido de milho	Allchemistry, Brasil
Polivinilpirrolidona - PVK-30	Allchemistry, Brasil
Celulose microcristalina	Allchemistry, Brasil
Cumarina	Sigma-aldrich, USA
Amburosídeo A	Deptº de química /UFC
Tetrahidrofurano grau HPLC	J.T.Baker, USA
Acetonitrila grau HPLC	J.T. Baker, USA
Ácido fosfórico PA	Vetec, Brasil
Metanol grau HPLC	J.T. Baker, USA
Álcool absoluto comercial	Santa cruz, Brasil

5.1 MÉTODOS

Na tabela a seguir estão descritos em capítulos todas as etapas que foram previstas para realização do presente estudo.

Tabela 6.1 Objetivos e métodos empregados no desenvolvimento, padronização e avaliação pré-clínica do extrato seco de *Amburana cearensis*

Objetivo	Métodos
Desenvolver o método de preparação e caracterizar a droga vegetal	<ul style="list-style-type: none"> • Determinação da perda por dessecação/Determinação do teor de umidade • Determinação cinzas totais • Análise granulométrica • Índice de intumescência
Desenvolver, avaliar e selecionar o método de produção do extrato líquido	<ul style="list-style-type: none"> • Delineamento fatorial – modelo de 1ª ordem, para estudo do processo extrativo • Produção e doseamento de cumarina e amburosídeo A (marcadores) no extrato de cumaru por CLAE-DAD • Determinação do pH • Determinação do resíduo seco • Determinação da densidade
Produzir, avaliar e selecionar o método de secagem do extrato	<ul style="list-style-type: none"> • Secagem por spray-dryer • Determinação da densidade aparente • Determinação da densidade de compactação • Determinação do fator de Hausner
Avaliar a toxicidade do extrato seco	<ul style="list-style-type: none"> • Teste hipocrático em ratos • Avaliar a citotoxicidade em neutrófilo humano

5.1.1. Desenvolvimento de método de preparação e caracterização da droga vegetal

5.1.1.1. Secagem do material vegetal

Para cominuição das cascas do caule foi empregado o moinho de facas. O processo de secagem do material vegetal realizado em estufa com e sem circulação de ar sob temperatura de $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, por diferentes períodos de tempo (12, 24, 48 e 48h). Nos intervalos de tempo relacionados foram coletadas amostras para caracterização: determinação da perda por dessecação, determinação do teor de umidade, determinação cinzas totais, análise granulométrica e índice de intumescência.

5.1.1.2. Análise granulométrica do pó

A análise granulométrica foi desenvolvida segundo metodologia descrita pela F. Bras. IV Ed. (1988). A determinação da granulometria da droga vegetal triturada (100g) foi realizada com auxílio do aparelho PRODUTEST, composto por um sistema de seis tamises com malhas de 1400, 710, 355, 250, 180 e 125 μm . Após 20 min de agitação mecânica em movimentos horizontais e rotativos, foram pesadas as porções de droga retidas sobre cada tamis e pesada. Essa operação foi realizada em triplicata e o resultado foi expresso em porcentagem de droga retida em cada tamis. A classificação do pó quanto à tenuidade foi de acordo com a F. BRAS. IV (1988): grosso, moderado grosso, semi-fino, fino e finíssimo.

5.1.1.3. Determinação de água em drogas vegetais

Perda por Dessecação (F. BRAS. IV 1988) Exatamente 3,0 g da matéria-prima vegetal seca e moída, foram transferidos para cápsulas de porcelana previamente taradas e colocadas em estufa de secagem a $105^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 5h. Após resfriamento à temperatura ambiente em dessecador foi realizada a pesagem da cápsula e material vegetal. A operação foi repetida até quando duas pesagens sucessivas não diferiram entre si por mais de 5 mg. As análises foram realizadas em

triplicata e a porcentagem de água calculada em relação à massa inicial da droga utilizando-se a equação abaixo:

$$TU = (M_F/M_I) \times 100$$

Sendo:

TCT: Teor de umidade (%)

M_F: Massa final da amostra

M_I: Massa inicial da amostra

Determinação de água através de analisador de Umidade

Para a realização das análises foi utilizado o analisador de umidade da marca GEHAKA, modelo IV2000. Neste analisador a fonte de aquecimento é uma lâmpada de halogênio (400 W) e a sensibilidade da balança é de 0,001 g. Os parâmetros de análise empregados foram: a) massa das amostras: 3,00 g; b) temperatura de análise: 105°C; c) término da análise: perda menor que 1 mg em 120 e 140 segundos; e) Intervalo entre as análises: 60 min (BORGES et al., 2005).

5.1.1.4. Cinzas totais (F. BRAS. IV 2000)

Visa determinar a porcentagem de materiais inorgânicos adulterantes presentes na amostra, como areia, terra ou pedras. A droga vegetal (2,0g) pulverizada foi pesada em balança analítica, diretamente em cadinhos previamente calcinados, resfriados e pesados. As amostras em triplicata foram distribuídas uniformemente nos cadinhos e incineradas até eliminação total do carvão, inicialmente na chama e depois em mufla a 450°C. Após resfriamento em dessecador o resíduo inorgânico foi pesado. A porcentagem de cinzas totais foi calculada utilizando-se a equação abaixo.

$$TCT = (M_F/M_I) \times 100$$

Sendo:

TCT: Teor de cinzas totais (%)

M_F : Massa final da amostra

M_i : Massa inicial da amostra

5.1.1.5. Determinação do Índice de Intumescência (Farm. Bras. IV Ed. 2000)

Em uma proveta com tampa esmerilhada foi adicionado exatamente 1 g da droga vegetal pulverizada e acrescido 25 ml de água destilada. O sistema foi submetido à agitação mecânica com o aparelho de ultrassom por 10 min, durante a primeira hora foi realizadas as agitações com intervalos de 10 minutos. Após 3 horas de repouso à temperatura ambiente foi determinado em triplicata o índice de intumescência de acordo com a equação abaixo.

$$IT = V_F - V_i$$

Sendo:

IT: Índice de intumescência

V_F : Volume final da droga após adição de água (mL)

V_i : Volume inicial (mL)

5.1.1.6. Desenvolvimento, avaliação e seleção o método de produção da solução extrativa

5.1.1.7. Processo extrativo

Para o desenvolvimento do método extrativo a partir das cascas do caule do cumaru foi utilizado um delineamento ortogonal de 1ª ordem (MONTGOMERY, 2005), para $k=3$ fatores (Concentração de Etanol, tempo de maceração e volume de extração); empregado para o ajuste de superfície de resposta de primeiro grau, no qual o modelo de interesse é dado por:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \varepsilon \quad (1)$$

sendo $\beta_0, \beta_1, \beta_2$ e β_3 os parâmetros de primeiro grau do modelo de regressão, ε um componente aleatório e Y a variável resposta de interesse (teor dos princípios

ativos/marcadores: cumarina e amburosídio A). A propriedade de ortogonalidade garante uma melhor precisão na estimação dos parâmetros do modelo (1).

Para o ajuste do modelo (1) foi necessário a realização de 9 ensaios, provenientes de um fatorial 2^k (8 pontos) acrescido de 1 repetição nas combinações centrais. Cada ensaio foi realizado em triplicata. Os fatores foram avaliados nos seguintes níveis:

i. Concentração etanol (°GL):

Limite inferior: 20 (-1)

Limite superior: 100 (+1)

Ponto central: 60 (0)

ii. Quanto ao tempo de maceração (h):

Limite inferior: 24 (-1)

Limite superior: 72 (+1)

Ponto central: 48 (0)

iii. Quanto ao volume de extração (mL):

Limite inferior: 200 (-1)

Limite superior: 600 (+1)

Ponto central: 400 (0)

Tabela 6.2. Planejamento experimental obtido pelo delineamento fatorial 2^3 acrescido de 1 repetição na combinação central, para obtenção dos extratos de cumaru.

Extrato	Etanol (%)	Tempo de maceração (h)	Volume de extração (mL)
1	-1	-1	-1
2	-1	-1	+1
3	-1	+1	-1
4	+1	-1	-1
5	-1	+1	+1
6	+1	-1	+1
7	+1	+1	-1
8	+1	+1	+1
9	0	0	0

A diluição do etanol, quando necessário, foi realizada em água.

5.1.1.8. Preparação e análise cromatográfica das soluções extrativas

Os extratos foram preparados a partir 200g de casca de cumaru de acordo com condições de ensaio conforme descrito na Tabela 6.2. e Figura 6.1.

Pretende-se com o presente estudo obter um produto com um maior teor possível de marcadores, preferencialmente obtido num curto espaço de tempo e baixo custo.

5.1.1.9. Determinação do Teor de Resíduo Seco (F. BRAS. IV, 2000)

Uma amostra de aproximadamente 1,0 g foi adicionada em placa de petri previamente tarada, e mantida em estufa a $105^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ até peso constante. O peso do resíduo foi calculado em relação ao volume do extrato. A análise foi realizada em triplicata.

Tomou-se a precaução para que o extrato estivesse distribuído de forma uniforme em uma fina película na placa, evitando o endurecimento superficial do material, o que poderia impedir a secagem em seu interior.

5.1.1.10. Determinação do pH

Para determinação do pH das soluções extrativas, 10,0 mL de cada solução em teste foi analisada em potenciômetro calibrado com solução Tampão de Fosfato e Acetato, pH 7,0 e 4,0, respectivamente, à 25°C.

5.1.1.11. Determinação da Densidade (F. BRAS. IV, 2000) A densidade das soluções extrativas em teste foi determinada com auxílio de um picnômetro a 25°C. Os resultados foram expressos em g/mL e referem-se a média de três repetições.

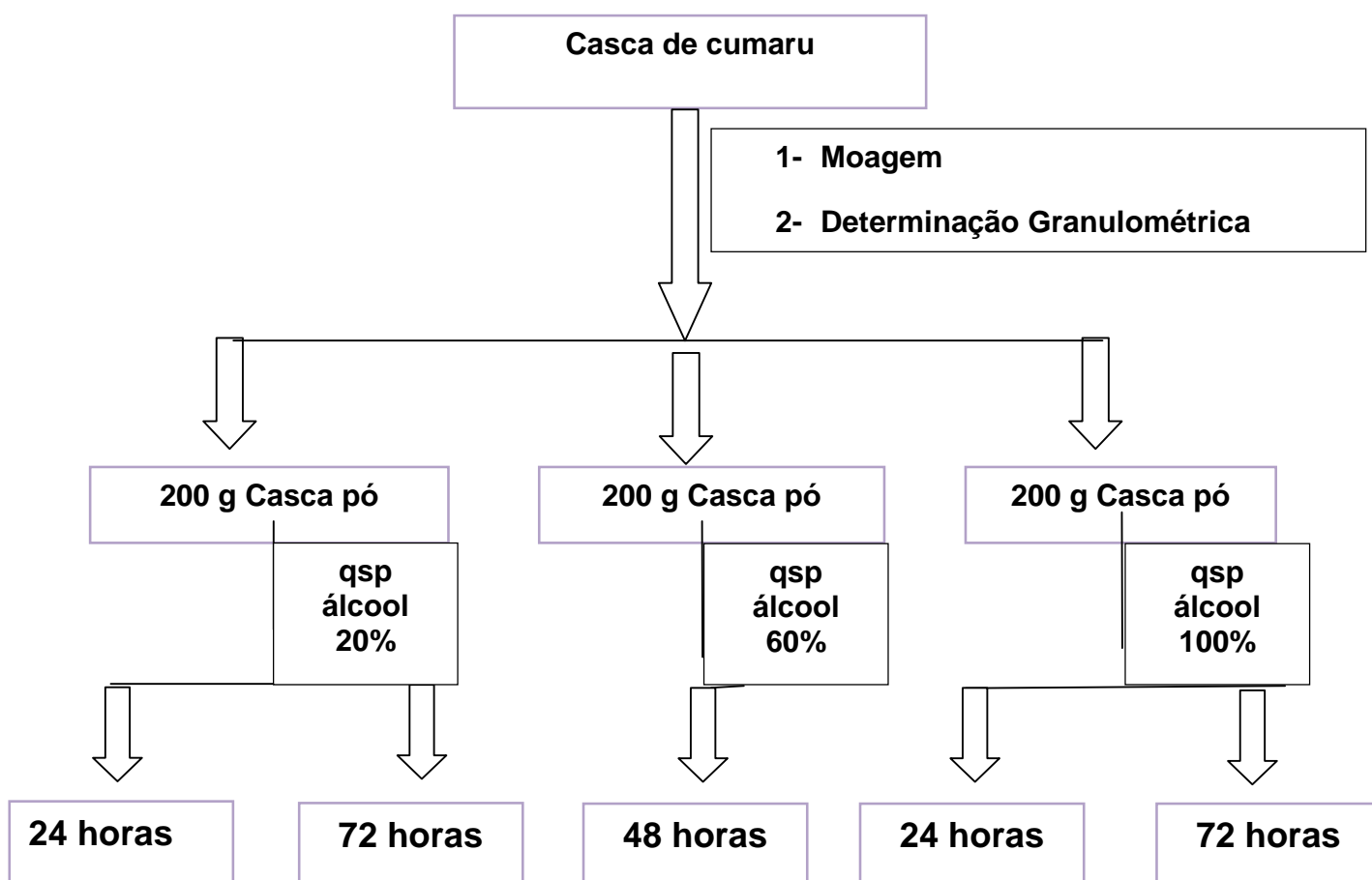


Figura 6.1 Diagrama de esquematização do processo extrativo da *Amburana cearensis* baseado no delineamento fatorial 2^3 descrito na Tabela 6.2, visando estabelecer a padronização das condições de maceração/percolação para produção do extrato hidroalcoólico oriundo da casca do caule de cumaru após ter sido triturada e determinada a granulometria.

5.1.1.12. Determinação do Teor de Cumarina e Amburosídio A por CLAE-DAD

O método analítico empregado foi o desenvolvido anteriormente por CANUTO (2006) e recentemente revalidado pelo nosso laboratório (LEAL et al., 2007) conforme orientações da ANVISA (RE-899, 2003). Além das soluções extrativas em teste foram analisadas também a tintura de cumaru (produto intermediário na formulação do cumaru, Laboratório A) e o xarope de cumaru (Laboratório A). Os resultados foram expressos em mg/mL e referem-se a média de três determinações.

Para a caracterização da droga vegetal os resultados foram expressos em mg/g de casca, enquanto para a solução extrativa e extrato seco os resultados foram expressos em mg/ml e mg/g de extrato, respectivamente.

5.1.1.13. Produção, avaliação e seleção do método de secagem do extrato de *A. cearensis* por *Spray dryer*

Na indústria farmacêutica o uso adequado de adjuvantes tecnológicos durante a secagem de extratos vegetais representa um importante passo para a garantia da estabilidade e qualidade desses produtos. Isso, devido ao fato de que os adjuvantes podem mudar e conseqüentemente influenciar na biodisponibilidade do(s) princípio(s) ativo(s) presentes nos extratos (SOUZA, 2000).

Inicialmente foi realizada uma avaliação preliminar de secagem em estufa do extrato adicionado de alguns adjuvantes comumente utilizados no processo de secagem por *Spray dryer*, tais como: maltodextrina, celulose microcristalina, amido de milho, polivinilpirrolidona (PVK-30) e dióxido de silício. As dispersões foram agitadas durante 15 minutos em agitador magnético (Tecnal) e transferidas para placas de Petri de modo a formar uma fina camada sobre a superfície da mesma, sendo, em seguida, mantidas em estufa a 60 °C por 1 hora. Os materiais secos foram avaliados quanto ao aspecto e a aderência à superfície da placa. Foi selecionado um (01) adjuvante para o estudo de secagem. Após seleção do excipiente para ser incorporado.

Ao extrato de cumaru, será investigada a sua proporção no extrato versus o rendimento

Segundo Montgomery (2004) os experimentos planejados são uma poderosa ferramenta para melhoria de processo onde o resultado depende de diversas variáveis ou da combinação destas. O sucesso de um planejamento de experimentos dependerá em grande parte da forma com que este é estruturado e como será realizado, entender claramente quais são os objetivos de realizar um experimento é necessário antes de qualquer ação para executá-lo.

Os métodos de planejamento experimental podem ser usados para indicar essas variáveis influentes no processo. O planejamento experimental é uma ferramenta de engenharia criticamente importante para melhorar um processo de fabricação. Tem, também, aplicação extensiva no desenvolvimento de novos processos. A aplicação dessas técnicas no desenvolvimento do processo pode resultar em:

1. Produção melhorada
2. Variabilidade reduzida e conformidade mais próxima do nominal
3. Tempo de desenvolvimento reduzido
4. Custos totais reduzidos

O extrato alcoólico foi inicialmente concentrado à 50% em estufa de secagem com circulação de ar na temperatura de 35°C/4h. Posteriormente foi adicionado o adjuvante tecnológico aerosil e secagem por *Spray dryer* com adição de aerosil e agitação constante, na Tabela 6.3.

Tabela 6.3 Delineamento experimental de secagem do extrato hidroalcoólico de *A. cearensis*

Ensaio	Excipiente (%)*
1	25
2	50
3	75
4	100

*Proporção de excipiente incorporado ao extrato líquido para secagem por *Spray dryer*

5.1.1.14. Procedimento de secagem do extrato de *Amburana cearensis* e caracterização físico-química.

Para estudo de secagem foi utilizado o equipamento modelo MSD 1.0 fabricado pela LABMAQ do Brasil (Figura 6.2), constituído de um sistema de alimentação, aspersor do tipo rotatório, sistema de aquecimento, câmara de secagem, duto condutor, ciclone, recipiente de coleta e ducto de exaustão. A alimentação da solução extrativa foi realizada de forma automática, isto é, com controle automático do fluxo de alimentação pela bomba peristáltica, em função da temperatura de entrada e de saída do ar. A dispersão foi realizada pelo aspersor



Figura 6.2. Fotografia do MSD 1.0 (Labmaq) e seus sistemas principais: 1) Chave geral 2) Controle do aquecimento; 3) Controle de bombeamento de líquido; 4) Câmara de secagem 5) Separador de pó seco 6) indicador de temperatura de saída do produto e 7) Frasco coletor do pó seco.

Com base em ensaios preliminares as condições iniciais de secagem empregadas na produção do extrato seco estão descritas na Tabela 6.5.

Tabela 6.5. Condições operacionais para secagem por *Spray dryer*

Parâmetros	Dados experimentais*
Temperatura de saída do ar de secagem (° C)	52
Temperatura de entrada do ar de secagem (° C)	95
Fluxo de alimentação (mL/min)	16,66
Fluxo de ar (L/min)	40

*Resultados obtidos na etapa preliminar de padronização das condições de secagem do extrato.

5.1.1.15 Caracterização do extrato seco de *Amburana cearensis*

Densidade aparente

A uma proveta de 5 mL, previamente pesada, foi adicionada uma amostra de 1 g de pó. A densidade aparente constitui-se na relação entre o volume e a massa de pó adicionada à proveta.

Densidade de compactação

Uma massa de 1 g do pó foi adicionado a uma proveta de 5 mL. A proveta, acoplada a um sistema de agitação de peneiras (PRODUTEST, Brasil) foi submetida à vibração intermediária (nível 4) por 1 minuto e em agitação máxima por 1 minuto até peso constante, ou diferença inferior à 5 mg entre duas pesagens consecutivas. A densidade de compactação é dada pela relação entre o volume ocupado pelo pó após a compactação e a massa de pó adicionada à proveta.

Fator de Hausner

O fator de Hausner consiste no quociente entre as densidades de compactação e aparente do material avaliado. Os materiais cujo fator de Hausner for inferior á 1,25 são facilmente compressíveis.

Determinação do teor de cumarina e amburosídio A no extrato seco por CLAE-DAD. O método analítico empregado foi conforme descrito anteriormente no item 5.1.1.12

5.1. TOXICIDADE AGUDA DO EXTRATO SECO PADRONIZADO DE *Amburana cearensis*.

Avaliação dos efeitos gerais - teste hipocrático. camundongos foram divididos em grupos de 6 animais. Cada grupo foi submetido ao tratamento com extrato com dose única de 250, 500 e 1000 mg/kg, administrada por via oral num volume de 10 mL/Kg. Os demais grupos foram tratados com o veículo de dissolução do extrato (Tween 80 a 4%) (controle) ou solução salina. Os animais foram observados 15, 30, 60, 120 minutos após o tratamento e a cada 24 horas durante 3 dias. Dentre os sinais investigados estão incluídos: alteração da motilidade, frequência respiratória, alteração na cor da urina, diarreia, analgesia, contorção abdominal, movimentos estereotipados, catatonia, piloereção, tremor, convulsão, sedação e morte.

Avaliação da citotoxicidade. Vários ensaios *in vitro* podem ser empregados na avaliação da potencial citotoxicidade de substâncias químicas. Esses ensaios necessitam de pequenas quantidades de substância teste e vários parâmetros podem ser determinados desde a contagem direta de células às medidas da integridade da membrana como através da atividade da enzima lactato desidrogenase - LDH. A determinação da atividade da LDH foi mensurada segundo orientações do fabricante (LABTEST).

6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A resposta, ou seja, as concentrações de cumarina e de amburosídio A em função das variáveis investigadas na produção do extrato de cumaru foram avaliadas e os dados ajustados ao modelo do gráfico de superfície de resposta e contorno bidimensional. Foi utilizado um delineamento ortogonal de 1ª ordem. Esses delineamentos são bastante flexíveis, possibilitando ao pesquisador, para um número determinado de fatores, escolher entre várias alternativas, a que mais lhe convém: dependendo do valor de *a* escolhido é possível obter-se ortogonalidade. A

ortogonalidade propicia a estimação independente para os coeficientes do modelo. Dependendo do número de pontos centrais e feita uma distribuição conveniente, é possível dividir o delineamento em dois, três ou mais blocos, ortogonalmente, sem perder as características atrás mencionadas e também com auxílio do software estatístico R. Os resultados obtidos no presente estudo incluindo avaliação pré-clínica, foram analisados pela análise de variância (ANOVA) pelo teste “t” de Student. seguido pelo teste de Tukey As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $P < 0,05$.

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente estudo foi dividido em quatro partes: 1) Desenvolvimento do método de preparação e caracterização da droga vegetal - casca do caule de cumaru; 2) Desenvolvimento, avaliação e seleção do método de produção do extrato padronizado de cumaru; 3) Produção, avaliação e seleção do método de secagem do extrato padronizado de cumaru e 4) Avaliação da toxicidade pré-clínica do extrato seco padronizado de cumaru.

8.1. Desenvolvimento do método de preparação e caracterização da droga vegetal - casca do caule de cumaru

O desenvolvimento de um fitoterápico, assim como todo medicamento, requer um rigoroso controle de qualidade desde o momento de seu planejamento contemplando, também, todas as etapas de produção, a fim de garantir a sua segurança farmacológica e eficácia terapêutica. A constituição química dos produtos de origem vegetal, bem como as características da matéria-prima, depende de fatores como cultivo, época de colheita, condições climáticas, além de fatores tecnológicos relacionados ao processo empregado na transformação da matéria-prima vegetal *in natura* em uma forma farmacêutica final. Assim, é imprescindível o desenvolvimento de método de produção desses produtos com rigoroso controle das etapas envolvidas, através do estabelecimento de parâmetros de qualidade (LIST e SCHMIDT, 1989; FARIAS, 2003).

A etapa de produção e caracterização da droga vegetal, definida como planta medicinal ou suas partes, após processos de coleta, estabilização e/ou secagem, podendo ser íntegra, rasurada, triturada ou pulverizada (RE 48 - ANVISA, 2004), é um requisito necessário para a padronização de fitoterápicos.

Quando nos referimos a plantas oficiais, como àquelas descritas em farmacopéias ou compêndios oficiais, existem monografias definindo critérios de autenticidade, pureza e teor de marcadores. Contudo, quando nos referimos a espécies vegetais nativas da região Nordeste que são utilizadas pela medicina tradicional, são poucas ou inexistentes monografias definindo critérios de qualidade da matéria-prima vegetal. Nesse contexto, podemos relacionar *Amburana cearensis*, espécie já submetida anteriormente (CANUTO, 2002; CANUTO & SILVEIRA, 2006; CANUTO, 2007) tanto a estudos químicos, quanto toxicológico e farmacológico pré-clínico (LEAL, 1995; LEAL, 2006; LEAL et al., 2000; 2006; 2008) que suportam seu potencial como matéria-prima para produção de fitoterápico indicado no tratamento da asma leve a moderada num futuro próximo.

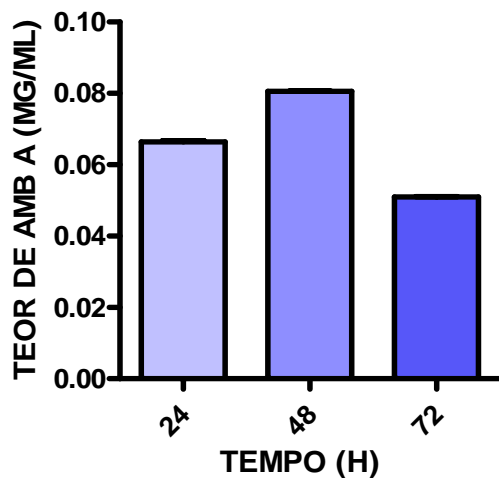
A secagem é o tipo de tratamento mais comumente realizado com matérias-primas vegetais, pois além de diminuir o seu teor de água, ela facilita a sua conservação considerando que porcentagens elevadas de água facilitam a ação de fungos, bactérias e enzimas sobre os constituintes químicos da planta. (OLIVEIRA et al, 1998). A secagem da casca do caule do cumaru em estufa com circulação de ar durante diferentes períodos de tempo (12 – 72 h) mostrou que a partir de 48 h o nível de umidade presente na droga ficou em torno de 8 % (Tabela 8.1). Assim, as condições de produção para a produção da casca de cumaru seca (droga vegetal), compreendeu a secagem em estufa com circulação de ar durante 48 h, isso considerando que o teor de umidade encontrado nessas condições está dentro do limite (8 a 14 %) permitido para drogas vegetais constituídas de casca (OLIVEIRA et al, 1998; FARIAS, 2003; F. BRAS. IV, 1998). O teor de umidade da casca de cumaru fresca determinado foi de $39,52 \pm 0,23\%$.

Tabela 8.1- Determinação da umidade da droga vegetal (%) em diferentes tempo de secagem nas estufa de secagem com e sem circulação de ar pelo método gravimétrico e analisador de umidade infra-vermelho.

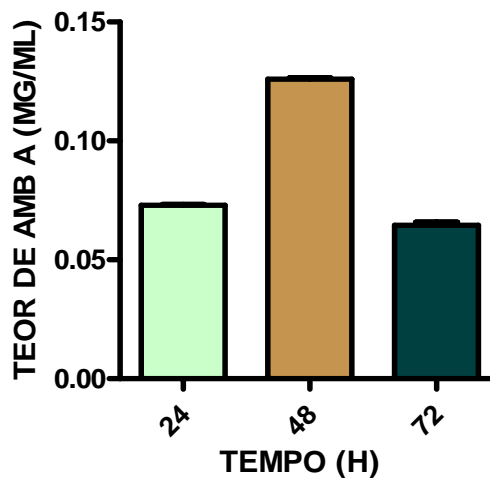
Tempo de secagem (horas)	% de umidade estufa s/ circulação de ar	% de umidade estufa c/ circulação de ar
12	39,3± 0,26 (0,67)	39,4± 0,40 (1,02)
24	11,44± 0,13 (1,14)	11,14± 0,10 (0,40)
48	8,82± 0,05 (0,54)	8,23± 0,08 (0,92)
72	8,61± 0,10 (1,17)	,46± 0,07 (0,89)

Os valores representam a média ± DP. Análises foram realizadas em triplicata.

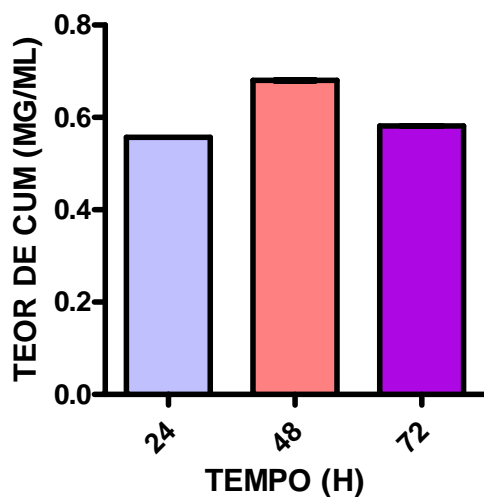
O doseamento realizado para a avaliação do teor dos marcadores Amburosídeo A e Cumarina para avaliação da melhor condição de secagem da droga vegetal, para fins de padronização da secagem mostrou que a condição de secagem na estufa com circulação de ar por um período de 48 horas foi a ideal tendo em vista que as concentrações do Amburosídeo A e cumarina foram superiores em relação as demais condições (Figura 8.1).



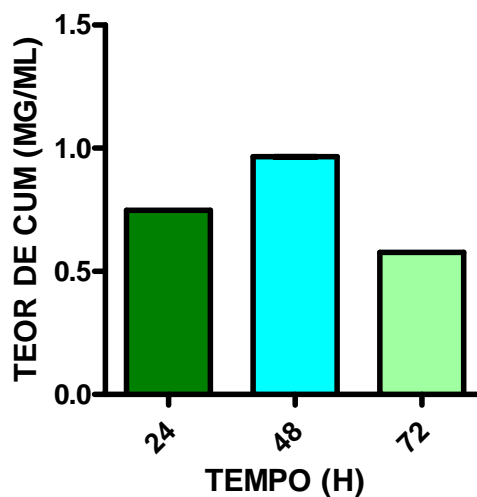
Estufa sem circulação de ar



Estufa com circulação de ar



Estufa sem circulação de ar



Estufa com circulação de ar

Figura 8.1. Análise comparativa das condições de secagem da droga vegetal em estufa de secagem com circulação de ar e sem circulação de ar com monitoramento dos teores de marcadores (Amburoside A (AMB A) e Cumarina (CUM)) por CLAE-DAD.

Avaliação granulométrica da droga vegetal pulverizada é um parâmetro importante a ser estabelecido, pois o grau de divisão dessa matéria-prima tem influência direta sobre o processo extrativo. Quando um extrato vegetal é produzido a partir de uma droga vegetal inteira ou dividido em fragmentos grosseiros o processo extrativo é prejudicado devido à pobre e lenta penetração do solvente no tecido vegetal. Por outro lado, a divisão excessiva pode causar problemas como a compactação do pó dificultando a passagem do solvente no caso da percolação, ou passagem das partículas mais finas para o extrato conferindo uma aparência turva no caso da maceração. Assim, utilização de pós moderadamente grosso é recomendada para a grande maioria das drogas vegetais (SHARAPIN, 2000).

A análise granulométrica da casca seca e pulverizada do cumaru revelou que o pó distribuiu-se predominantemente entre os tamises com abertura de malha de 2,8 a 0,355 mm (80,3 %), desses 27,7 % foi retido apenas no tamis com malha de 0,710 mm (Figura 8.2). Assim, de acordo a Farmacopéia Brasileira e (BRANDÃO,2007), a classificação do pó da casca seca do cumaru está entre grosso e semi-fino. Essa análise foi inserida no presente estudo para melhor caracterização da droga vegetal, o que facilitará a reprodução dos resultados aqui obtidos, pois a granulometria exerce influência direta sobre a extração.

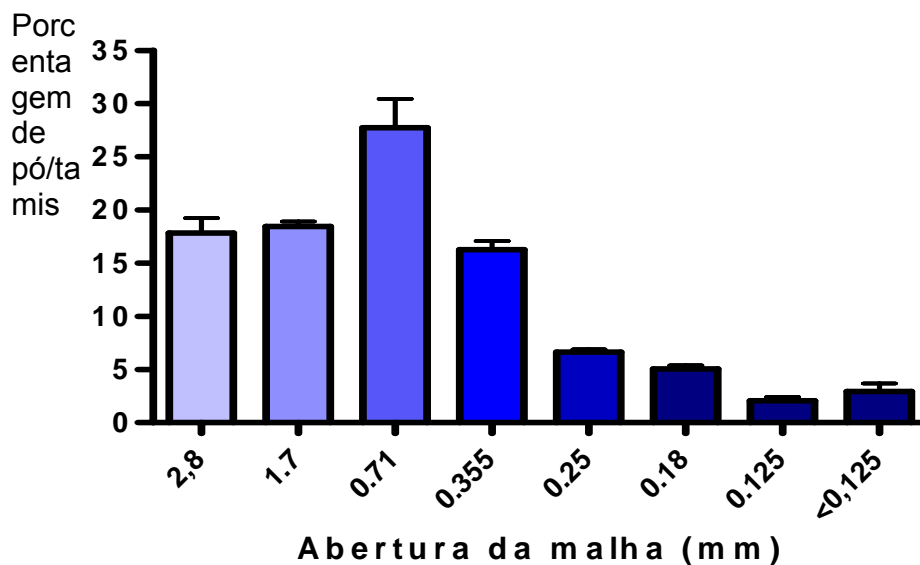


Figura 8.2 Granulometria da casca do caule de *Amburana cearensis* seca e pulverizada – droga vegetal. Os resultados representam a média \pm DP. As análises foram realizadas em triplicata.

As impurezas inorgânicas são, geralmente, decorrentes do processamento da matéria-prima ou produto, e os ensaios de pureza são associados com frequência e/ou relevância do contaminante. Entre os contaminantes inorgânicos destacam-se a água, íons metálicos, cloretos e outros ânions. Embora de modo geral, o número de espécies contaminantes de natureza inorgânica seja bem inferior à imensa variedade de contaminantes orgânicos possíveis, a frequência com que se fazem determinações de impurezas inorgânicas é até maior, como pode ser observada em monografias da farmacopéia Americana 24^a Ed. (USP24), Farmacopéia Portuguesa 7^a Ed. E Farmacopéia Brasileira 4^a Ed.(GIL, 2007).

O teor de cinzas totais determinado na matéria-prima vegetal permite a verificação de material inorgânico não-volátil, como por exemplo, carbonatos, fosfatos e metais. O teor de cinzas totais encontrado na casca do cumaru - droga vegetal foi de 5,7 %, este resultado comparado com outras drogas vegetais como

Hamamelis (*Hamamelis virginiana* L.) onde teor de cinzas encontrado foi de 9,14% e o do Jambolão (*Syzygium cumini* L.) foi de 9,56%, o demonstra que a amostra avaliada apresenta baixo nível de contaminação inorgânica (SALGADO et al, 2007).

O índice de intumescência determina o quanto à droga absorve do solvente sendo, portanto, um dado útil quando se deseja estimar o volume a ser utilizado na extração. O índice de intumescimento obtido para a droga vegetal estudada foi de $1,0 \pm 0,1$ ml, ou seja uma massa de 10 g de droga vegetal absorve cerca de 10,1 mL de água. Dessa forma não é interessante utilizar para extração um volume inferior ao volume de intumescimento, pois a recuperação do extrato pode ser prejudicada.

8.2. Desenvolvimento, avaliação e seleção do método de produção do extrato padronizado de cumaru

Segundo Prista et al. (1996) o principal objetivo que se pretende atingir ao preparar uma solução extrativa é separar os princípios ativos de uma droga dos que são inativos, e isso depende fundamentalmente da seletividade do solvente utilizado para extrair àquele(s) constituintes químicos de interesse presente no material vegetal. Adicionalmente, os extratos vegetais representam manipulações farmacêuticas têm objetivos como diminuir volume, concentrar as substâncias, reduzir as posologias, aumentar o prazo de validade e conservação (MARQUES, 2005).

No desenvolvimento do método de obtenção do extrato de cumaru a opção de extração a temperatura ambiente e o emprego dos solventes etanol e água deveram-se a natureza química dos marcadores/princípios ativos (CANUTO, 2003; 2006), além disso, estudos anteriores (LEAL, 1995; LEAL et al., 2000) mostraram a baixa toxicidade e as atividades antiinflamatória e broncodilatadora do extrato hidroalcolico obtido das cascas do caule de *Amburana cearensis*. Com base nos resultados obtidos nos estudos da droga vegetal, foi empregada na produção do extrato de cumaru, casca seca (estufa com circulação de 35 °C, durante 48 h) e trituradas (partículas selecionadas, $1,7 \text{ mm} \leq \varnothing \leq 210 \text{ mm}$)

É comum, especialmente em indústrias químicas, aparecerem problemas que é necessário estudarem várias propriedades ao mesmo tempo e estas por sua vez, são afetadas por um número de fatores experimentais. Para fazer isso com o mínimo de experimentos, tem sido empregado o planejamento fatorial completo (BARROS NETO et al., 2003). Nesse sentido, durante o estudo de desenvolvimento de método de produção da solução extrativa de cumaru, matéria-prima para produção de fitoterápicos, foi empregado o delineamento ortogonal de 1ª ordem, pesquisando a possível influência de alguns fatores/variáveis como tempo de extração (24, 48 e 72 horas), volume de extração (200, 400 e 600 mL) e percentual alcoólico (20, 60 e 100%) sobre o teor de marcadores (resposta). Isso, no intuito de maximizar o teor de marcadores no extrato, ao menor custo e tempo possíveis, e sem fugir das especificações de qualidade, além da preocupação da segurança e eficácia do produto.

Nas Figuras 8.3, 8.4 e 8.5 estão ilustrados os gráficos de superfície para resposta – teor de cumarina, em função do teor de etanol na solução extratora e o volume de extração, sob diferentes tempos de maceração - 24, 48 ou 72 horas, respectivamente. Pode ser observado que nas três condições de tempo de extração o teor de cumarina no extrato de cumaru apresentou um comportamento similar. Em relação ao teor alcoólico, ocorreu um incremento no teor de cumarina até um ponto correspondente à solução extratora com teor de etanol de 60% (volume de extração 400mL/48 h: $0,064 \pm 0,0007$ mg/g por casca), porém próximo a 100% de etanol o teor de cumarina decresceu. Entretanto, o teor de cumarina mostrou uma tendência de redução com o aumento do volume de extração.

Fixando os volumes de extração (Figuras 8.6, 8.7 e 8.8, respectivamente), observa-se que novamente o maior teor de cumarina manteve-se em torno de uma solução extratora hidroalcoólica a 60% de etanol em água. Além disso, é possível observar a influência do tempo de extração:teor alcoólico (20%EtOH/24h: 0,026; 100%EtOH/72h: 0,067 mg/g casca) sobre o teor de cumarina, embora não tenha sido significativa. As Figuras 8.9, 8.10, 8.11 ratifica que uma solução extratora em torno de 60% de etanol em água produz um extrato com maior teor de cumarina, e

que o aumento do tempo de maceração parece incrementar o teor de cumarina. Assim, os resultados sugerem que o teor de etanol (EtOH 20 E 100%/24h/200ml: 0,026±0,003 e 0,068±0,002 mg/g casca) na solução extratora e o tempo de extração observado no extrato a 20% EtOH (24 e 72h/200ml:0,026±0,003 e 0,047± 0,032 mg/g casca) têm uma influência positiva sobre a concentração de cumarina no extrato de cumaru, por outro lado, em relação ao volume de extração foi observada uma relação inversa (Figura 8.12). Adicionalmente é importante registrar que não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre a concentração de cumarina observado nos extratos a 60%EtOH/48h/400ml e 100%EtOH/24h/200ml.

Nas Figuras 8.13, 8.14 e 8.15 estão ilustrados os gráficos de superfície para resposta – teor de amburosídio A, em função do teor de etanol na solução extratora e o volume de extração, sob maceração de 24, 48 ou 72 horas, respectivamente. Pode ser observado que nas três condições de tempo de extração investigadas a concentração de amburosídio A no extrato cresceu com o aumento do teor de etanol na solução extratora, porém o inverso foi observado quanto ao volume de extração.

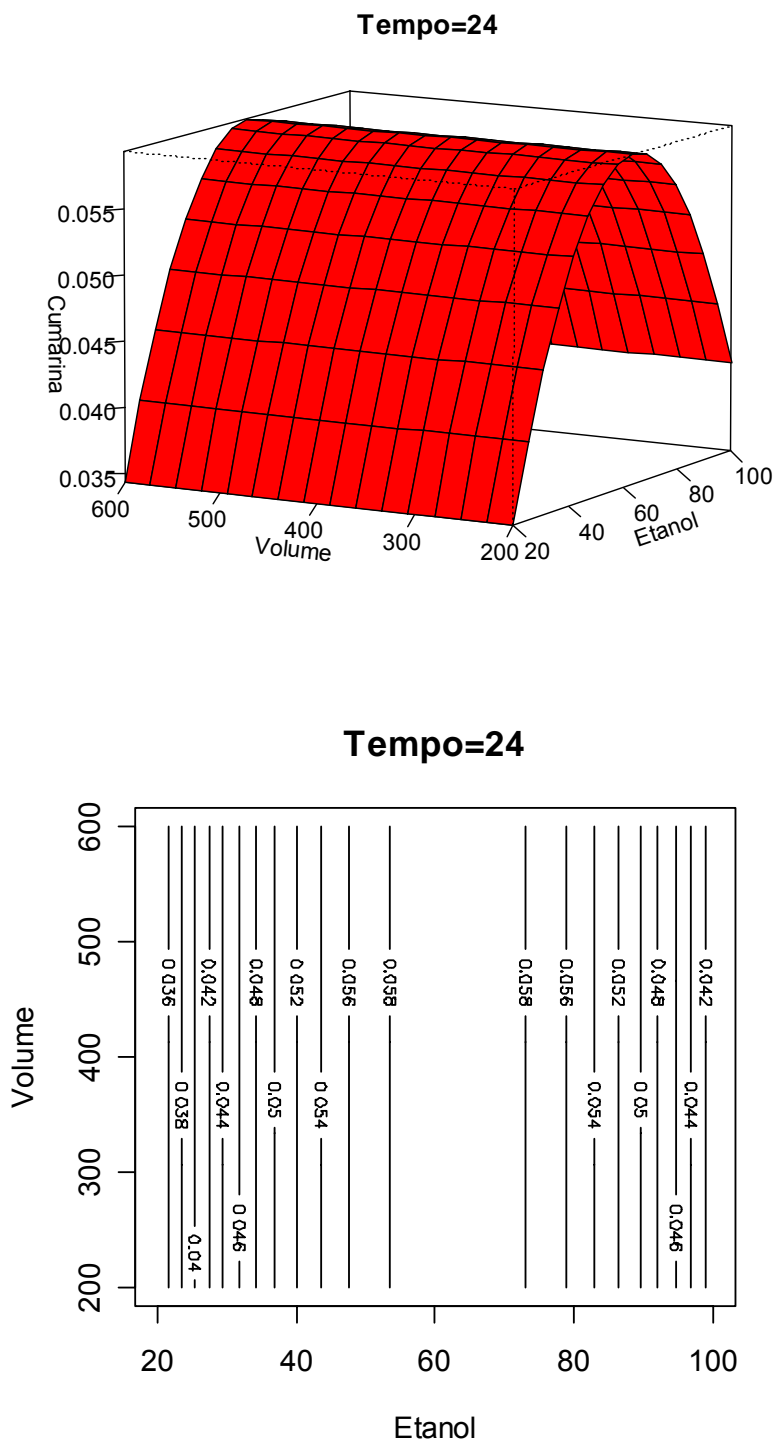


Figura 8.3. Gráfico de superfície de resposta do teor de cumarina em função do volume de extração e % etanol. Tempo de maceração de 24 horas

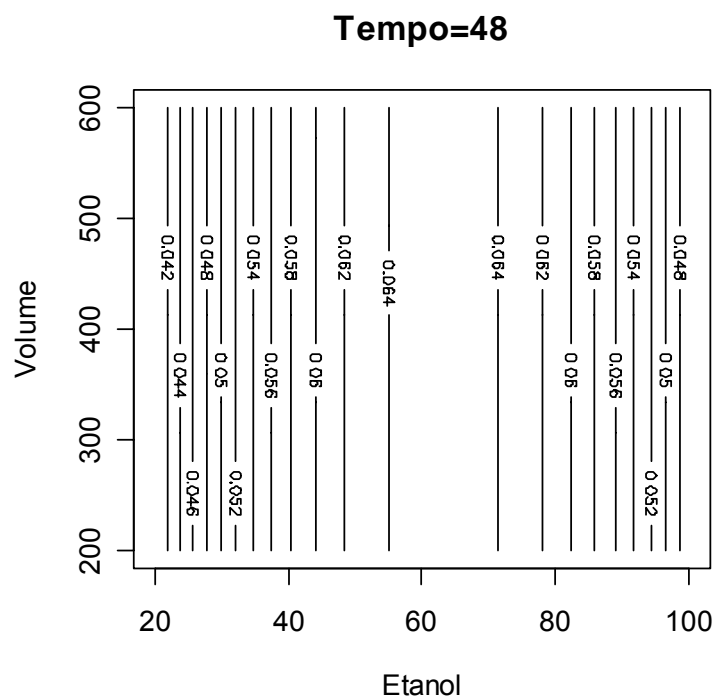
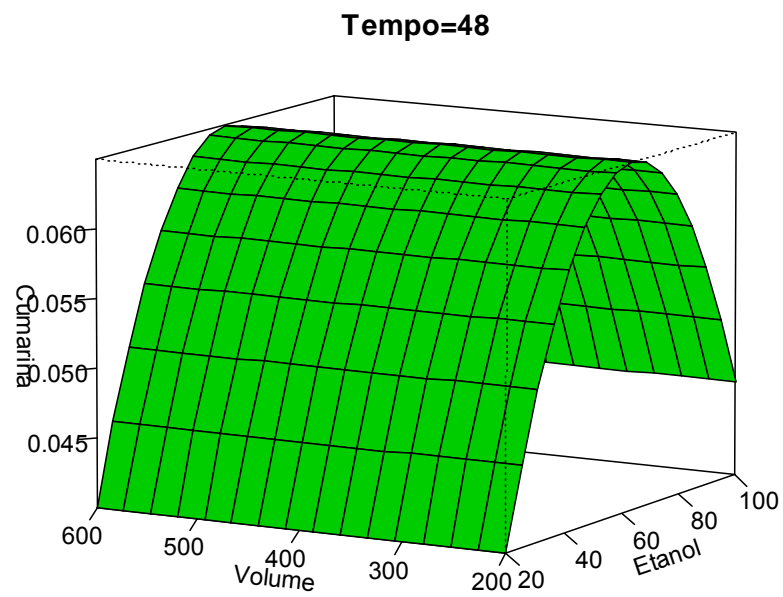


Figura 8.4. Gráfico de superfície de resposta do teor de cumarina em função do volume de extração e % etanol. Tempo de maceração de 48 horas

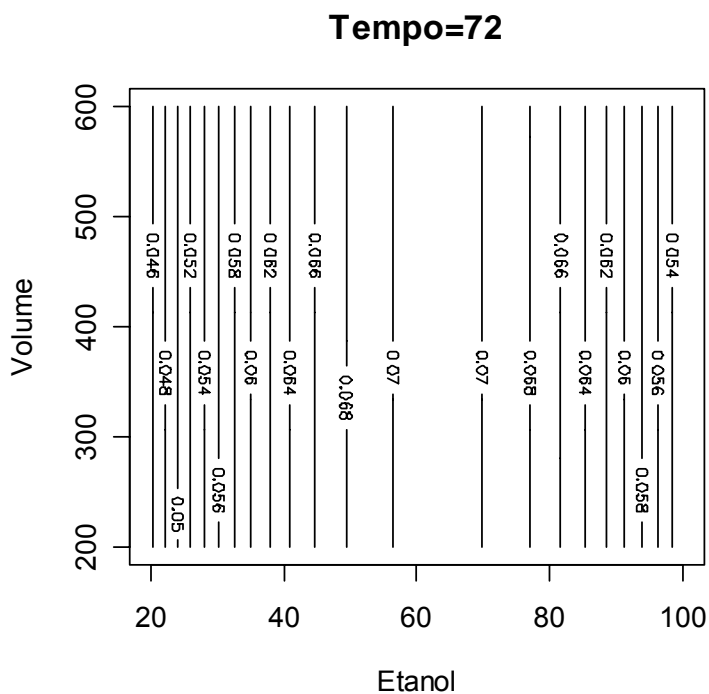
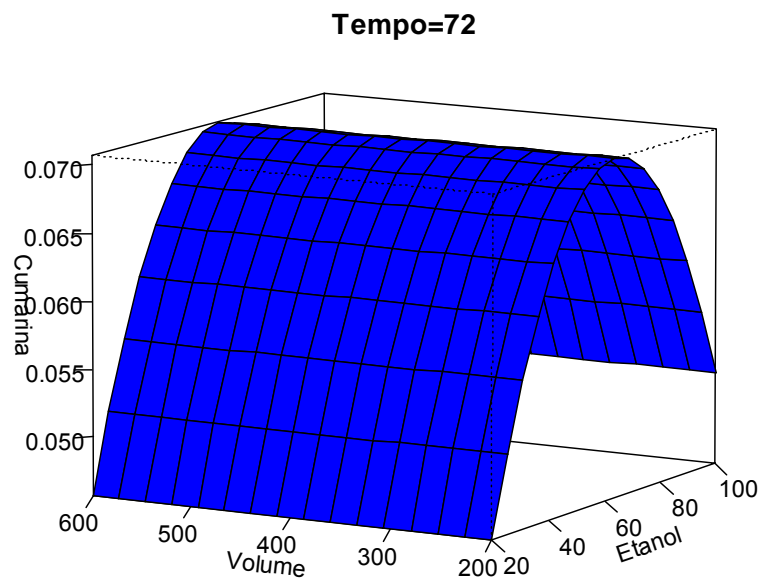


Figura 8.5. Gráfico de superfície de resposta do teor de curatrina em função do volume de extração e % etanol. Tempo de maceração de 72 horas

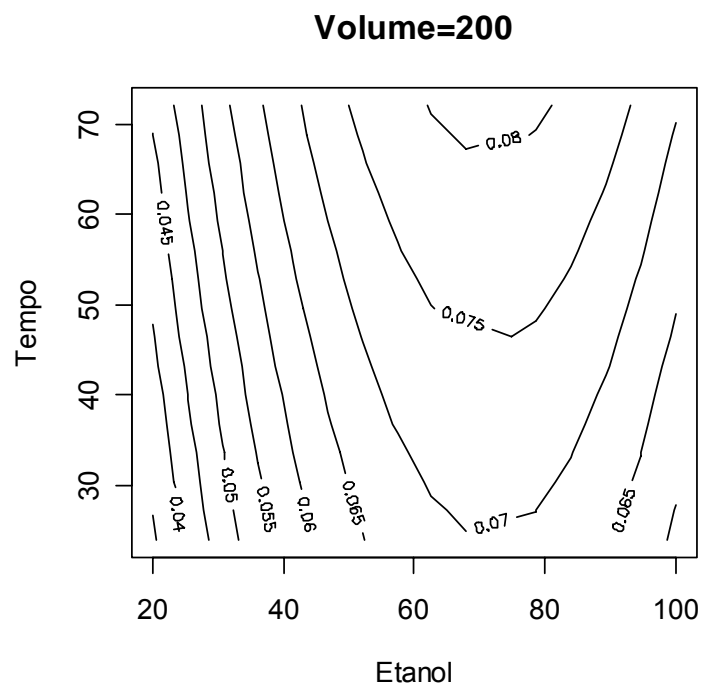
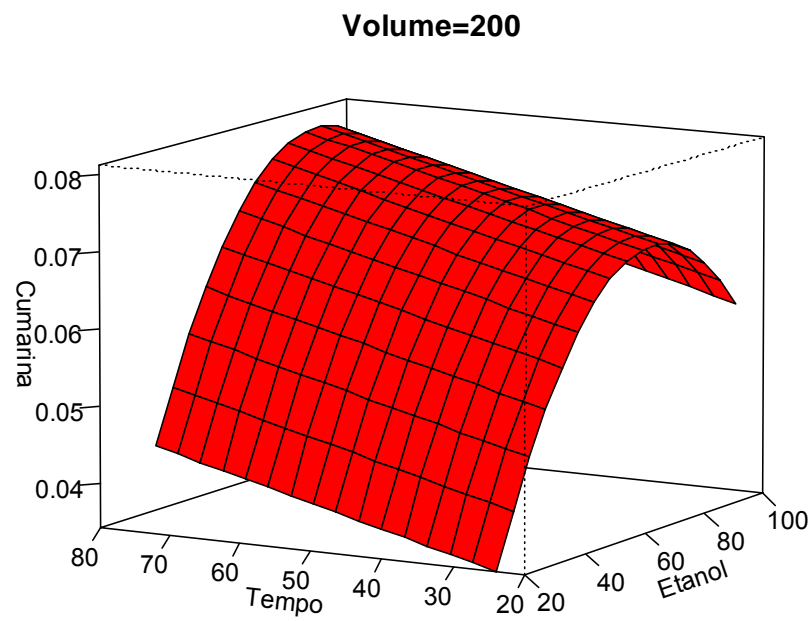


Figura 8.6. Gráfico de superfície de resposta do teor de cumarina em função do tempo de extração e % etanol. Volume de extração: 200 mL

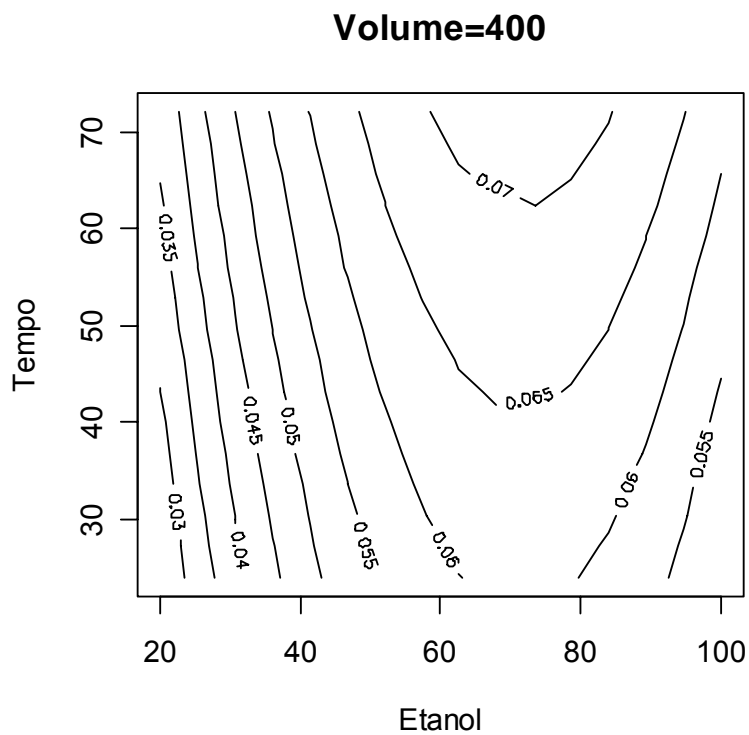
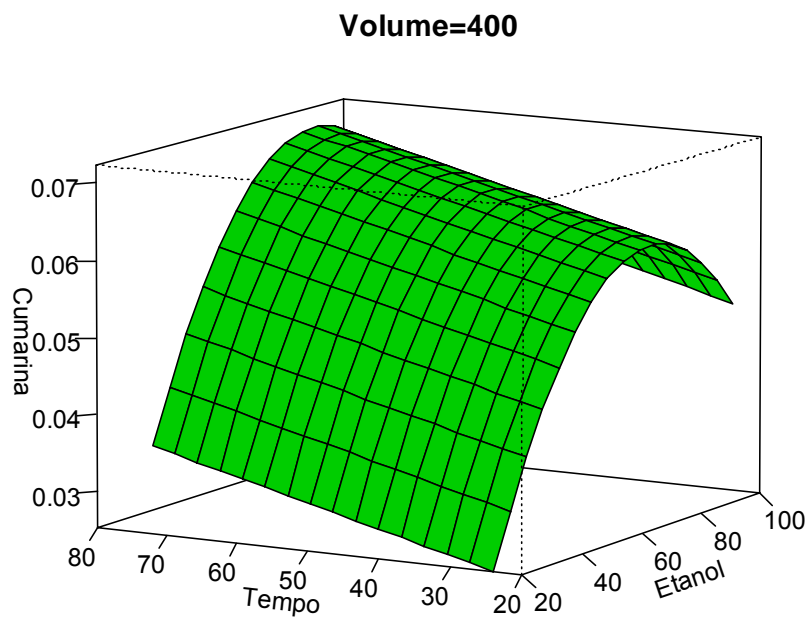


Figura 8.7. Gráfico de superfície de resposta do teor de cumarina em função do tempo de extração e % etanol. Volume de extração: 400 mL

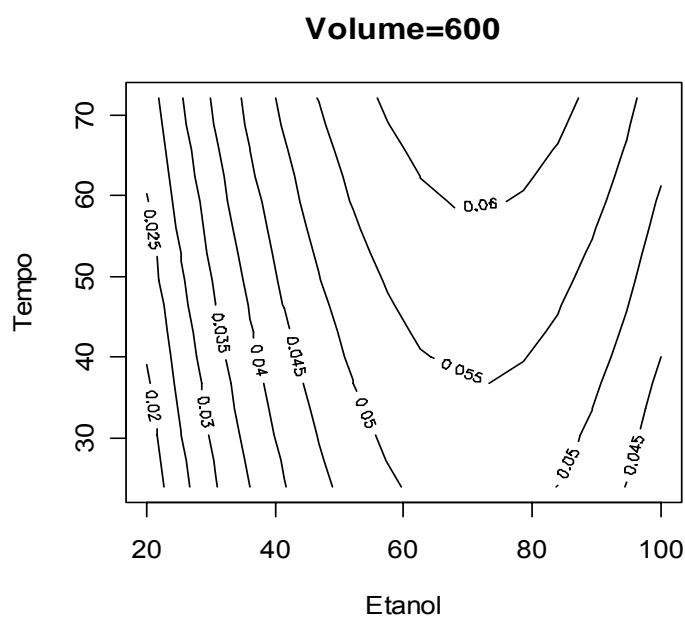
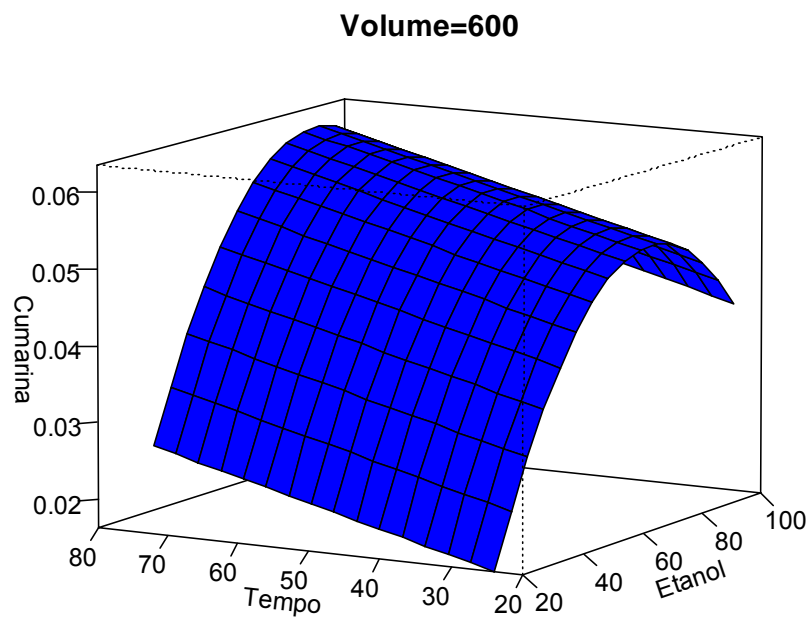


Figura 8.8. Gráfico de superfície de resposta do teor de cumarina em função do tempo de extração e % etanol. Volume de extração: 600 mL

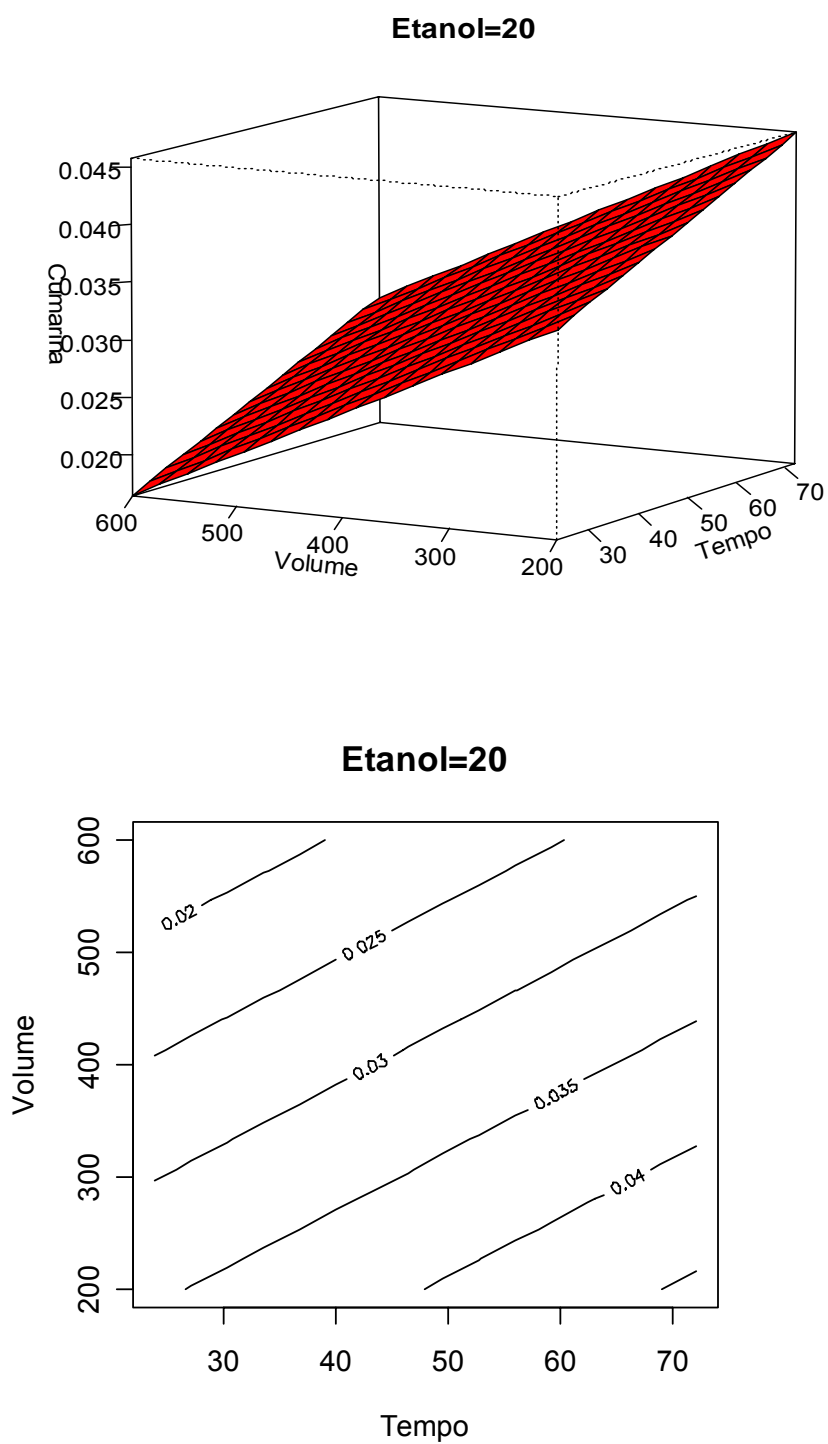


Figura 8.9. Gráfico de superfície de resposta do teor de cumarina em função do tempo de extração e volume de extração. Etanol: 20% em água

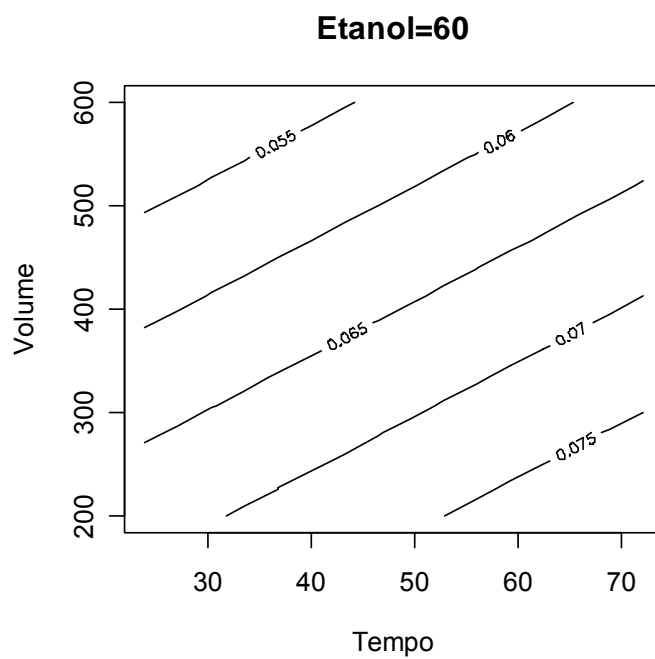
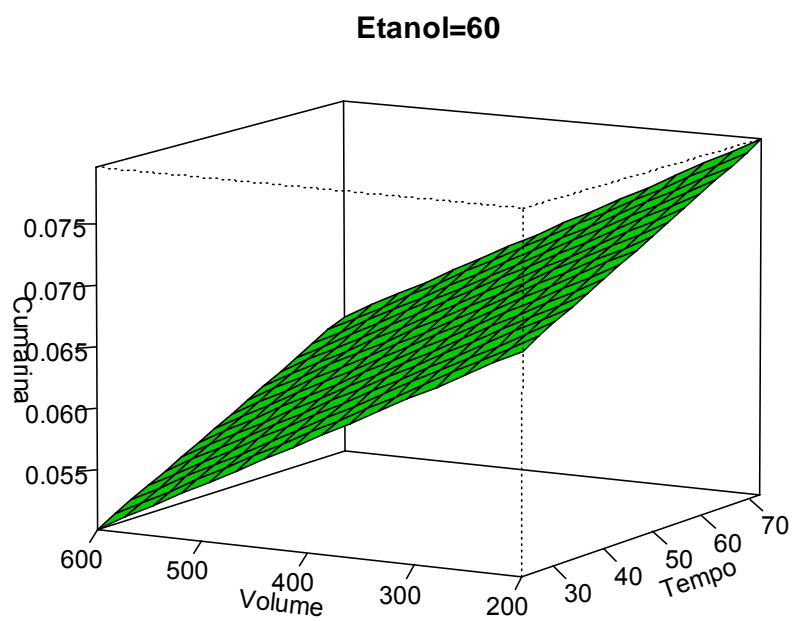


Figura 8.10. Gráfico de superfície de resposta do teor de cumarina em função do tempo de extração e volume de extração. Etanol: 60% em água

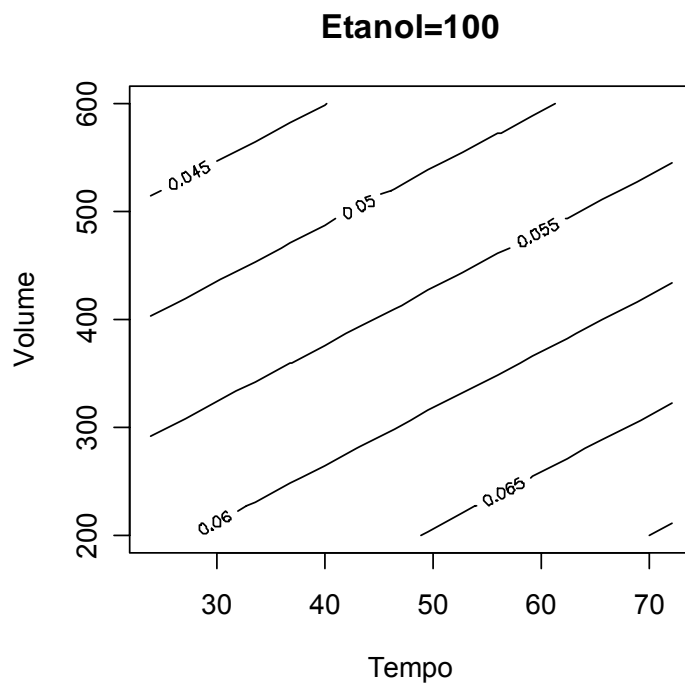
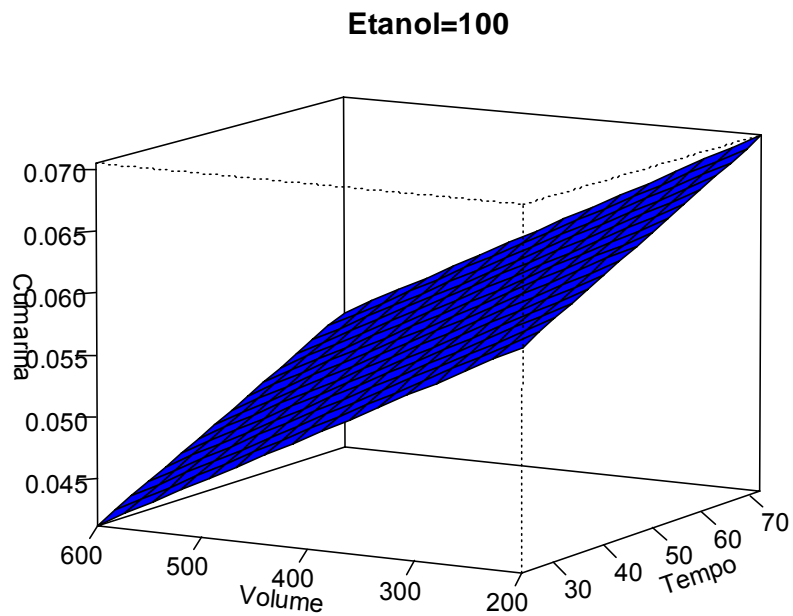


Figura 8.11. Gráfico de superfície de resposta do teor de cumarina em função do tempo de extração e volume de extração. Etanol: 100% em água

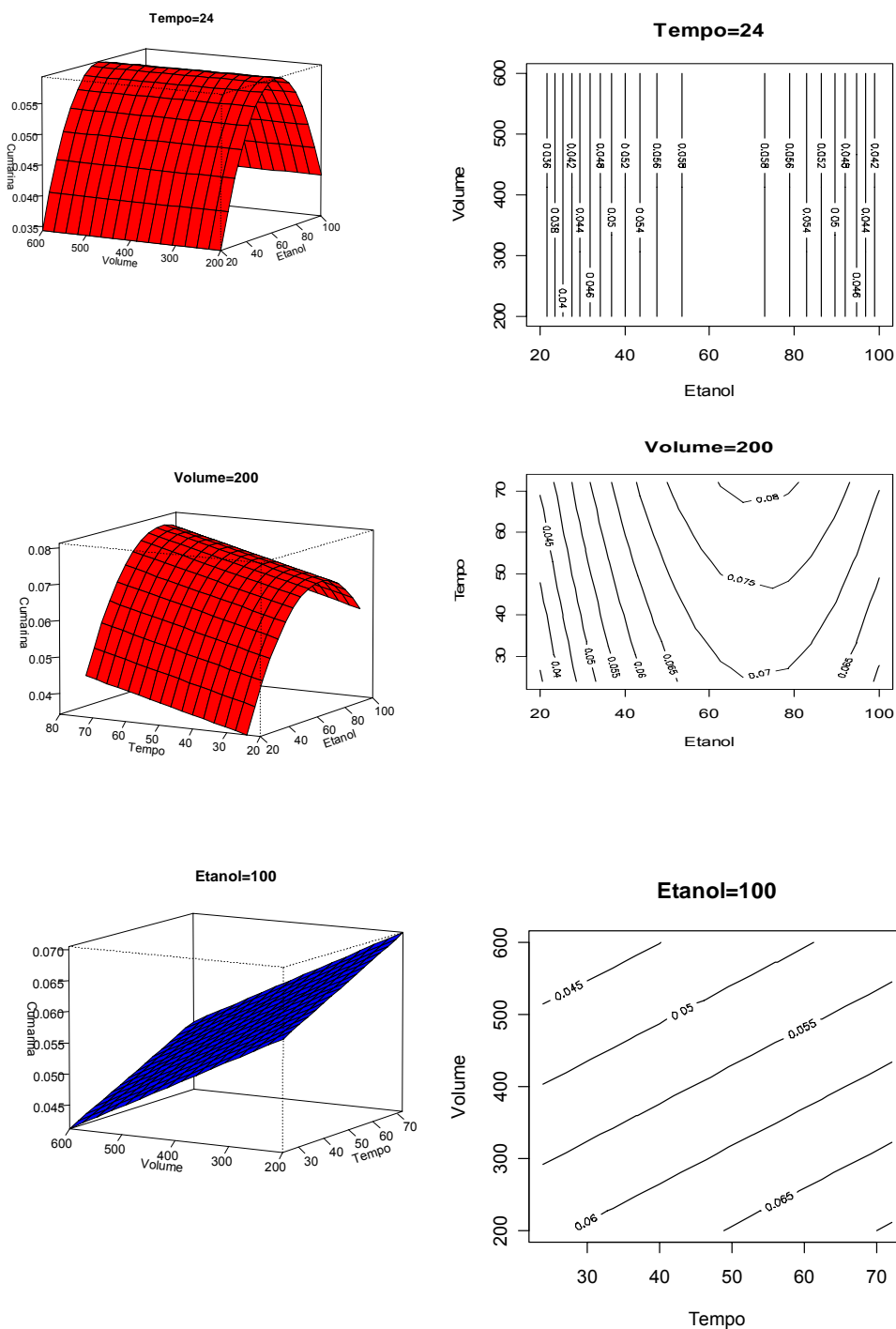


Figura 8.12. Gráficos de superfície de resposta do teor de cumarina em função de: A- volume de extração e teor alcoólico, B- tempo de extração e teor alcoólico e C- volume e tempo de extração

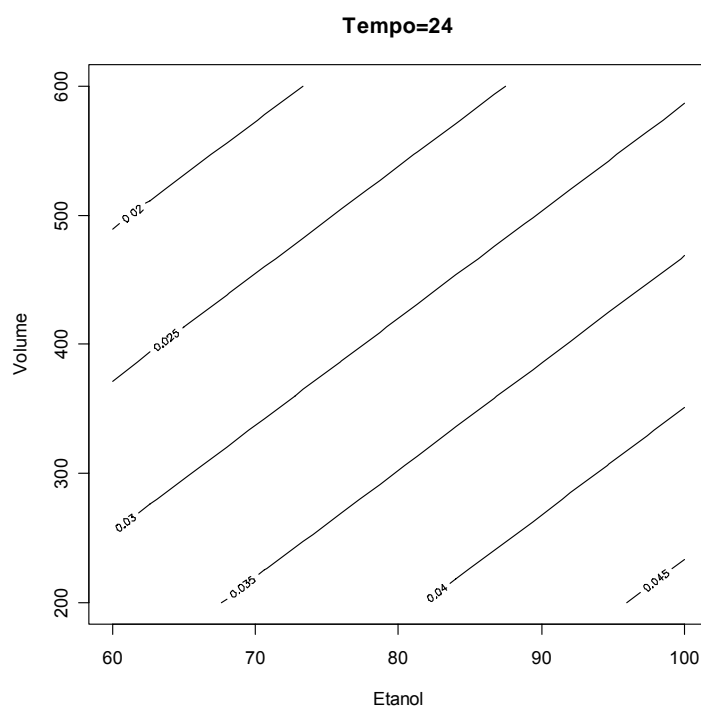
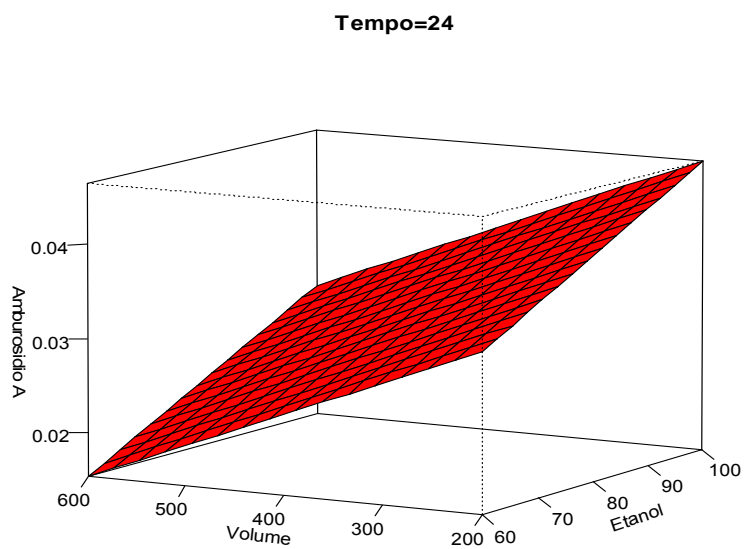


Figura 8.13. Gráfico de superfície de resposta do teor de ambrosídio A em função do volume de extração e % etanol. Tempo de extração de 24 horas

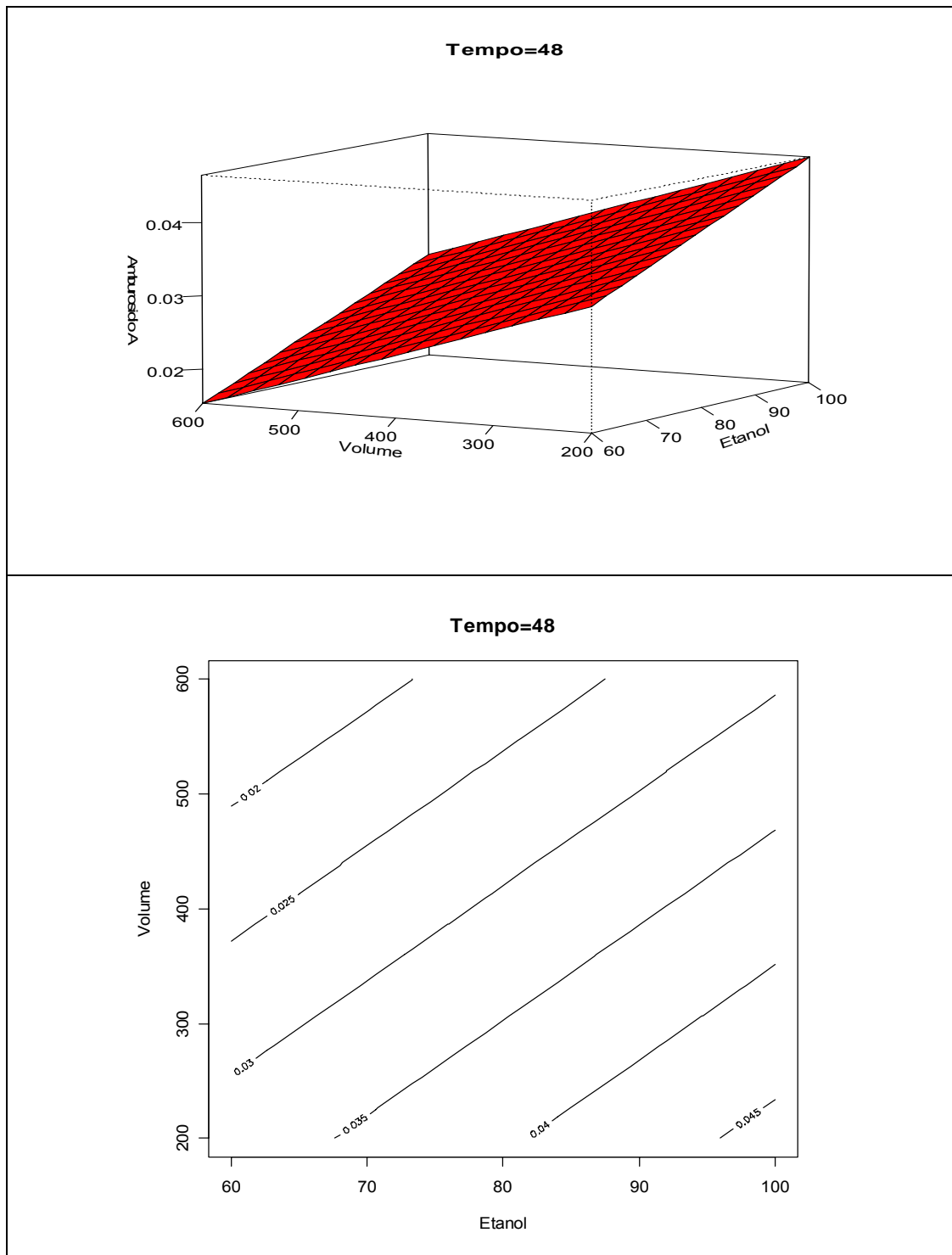


Figura 8.14. Gráfico de superfície de resposta do teor de ambrosid A em função do volume de extração e teor alcoólico. Tempo de extração de 48 horas

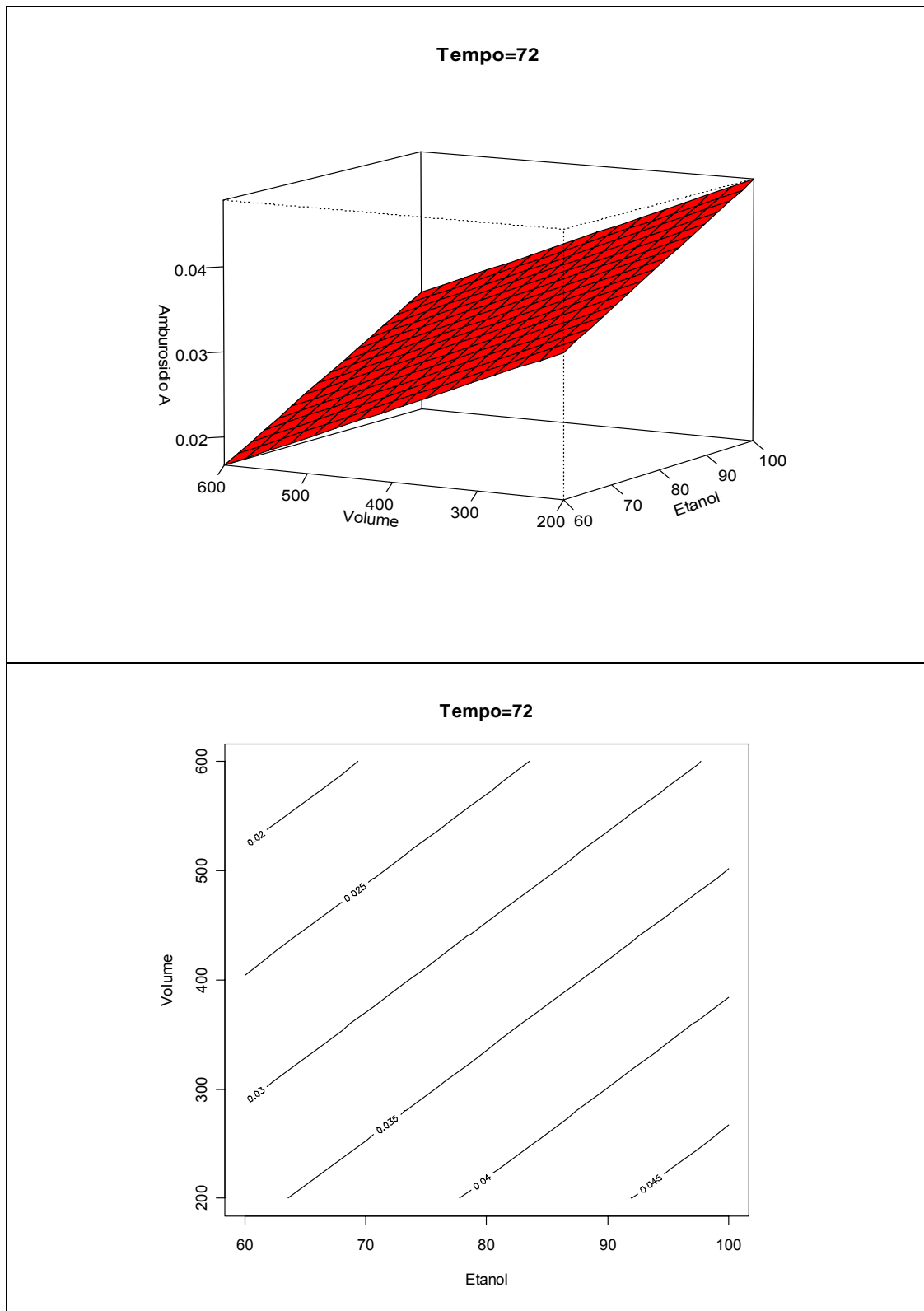


Figura 8.15. Gráfico de superfície de resposta do teor de ambrosídio A em função do volume de extração e teor alcoólico. Tempo de extração de 72 horas

Avaliando o efeito do tempo de extração e do teor alcoólico sobre a concentração de amburosídeo A no extrato de cumaru (Figuras 8.17 e 8.18,), foi observada uma influência do tempo em relação ao rendimento de amburosídeo A, e em relação ao teor alcoólico foi confirmado que um aumento na concentração de etanol no extrato promove um incremento considerável no teor de amburosídeo, inclusive na solução a 20% etanol o amburosídeo A não foi detectado, enquanto na solução a 100% de etanol (volume de extração: 200 mL) a concentração de amburosídeo A no extrato obtido sob maceração durante 24 e 72 h foi de $0,050 \pm 0,0019$ e $0,04422 \pm 0,0033$ mg/g casca, respectivamente. Não houve diferença significativa no teor de amburosídeo A determinado nos referidos tempo de extração. Na solução a 40% de etanol em água o teor de amburosídeo A foi de $0,024 \pm 0,001$ mg/g casca (volume de extração: 400 mL/ tempo: 48h). Na Figura 8.21 novamente percebeu-se uma influência sutil do tempo de extração, enquanto o aumento do volume de extração reduziu significativamente ($p < 0,0001$) a concentração de amburosídeo A (100% EtOH/24h/200 e 600 mL: $0,050 \pm 0,0019$ e $0,025 \pm 0,0002$ mg/g casca, respectivamente). Além disso, o gráfico sugere uma interação dessas variáveis (tempo e volume) sobre o processo extrativo.

Assim no extrato de cumaru, quanto maior o grau alcoólico da solução extratora maior é a concentração de amburosídeo A (pico: etanol 100%). Quanto ao tempo de extração este interfere de maneira sutil na concentração de amburosídeo A, enquanto o aumento do volume de extração promove uma redução na concentração do marcador (Figuras 8.19 e 8.20).

Portanto, os resultados mostraram que o aumento do volume de extração interfere de maneira negativa tanto na concentração de cumarina quanto de amburosídeo A no extrato de cumaru. Em relação às variáveis tempo de extração e teor alcoólico, a primeira influenciou, embora não significativamente, na concentração dos marcadores, enquanto a segunda interferiu significativamente tanto no teor de cumarina (volume 200 mL/24 h/ 20 e 100% EtOH -: $0,026 \pm 0,003$ e $0,068 \pm 0,002$ mg/g casca, respectivamente) quanto amburosídeo A (volume 200 mL/24h/ 20 e 100 % EtOH-: não detectado e $0,050 \pm 0,0019$ mg/g casca,

respectivamente). No ponto central (EtOH 40%/400 mL/48h) o teor de cumarina ($0,052 \pm 0,012$ mg/g casca) se manteve.

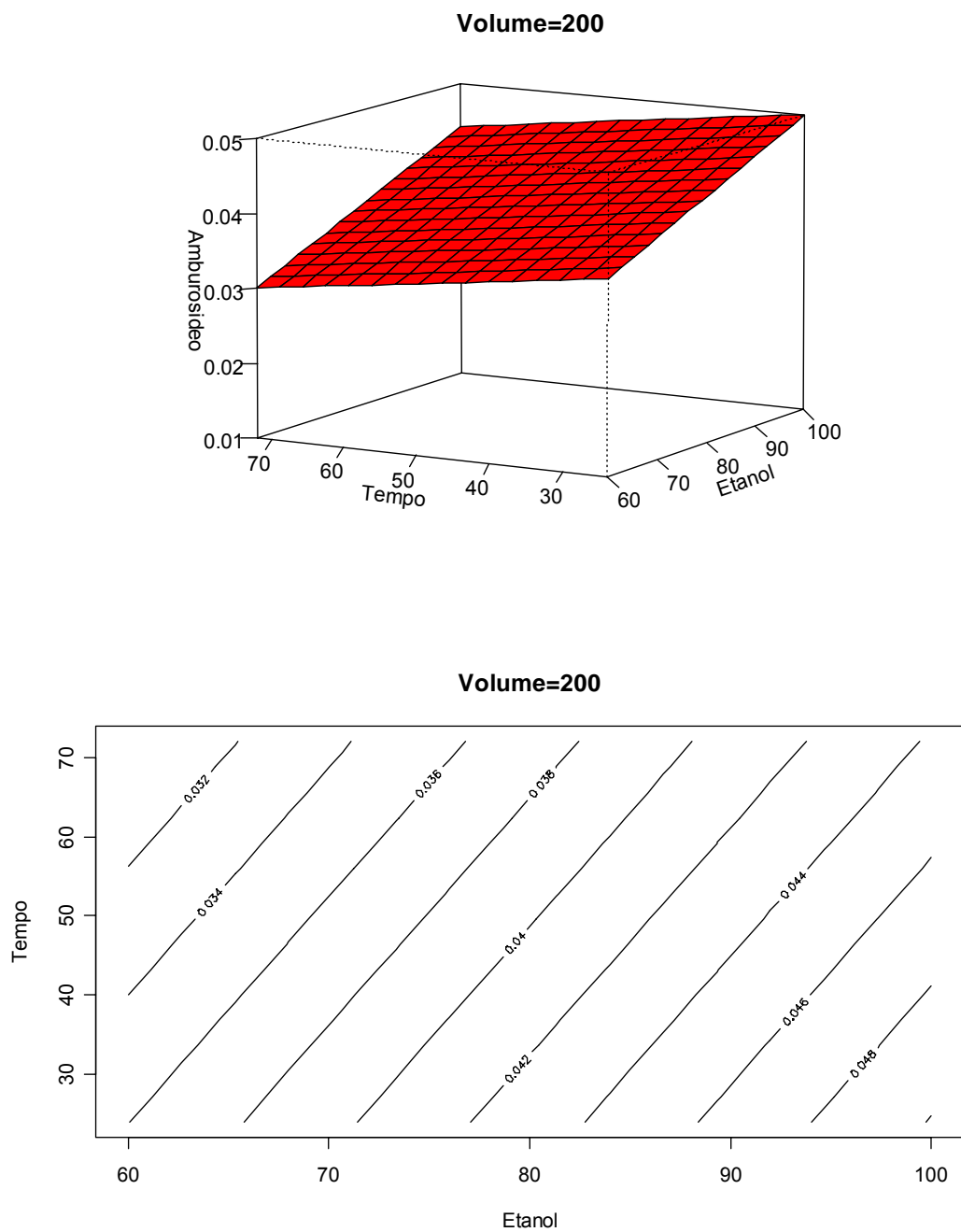


Figura 8.16. Gráfico de superfície de resposta do teor de amburoside A em função do tempo de extração e teor alcoólico. Volume de extração: 200 mL

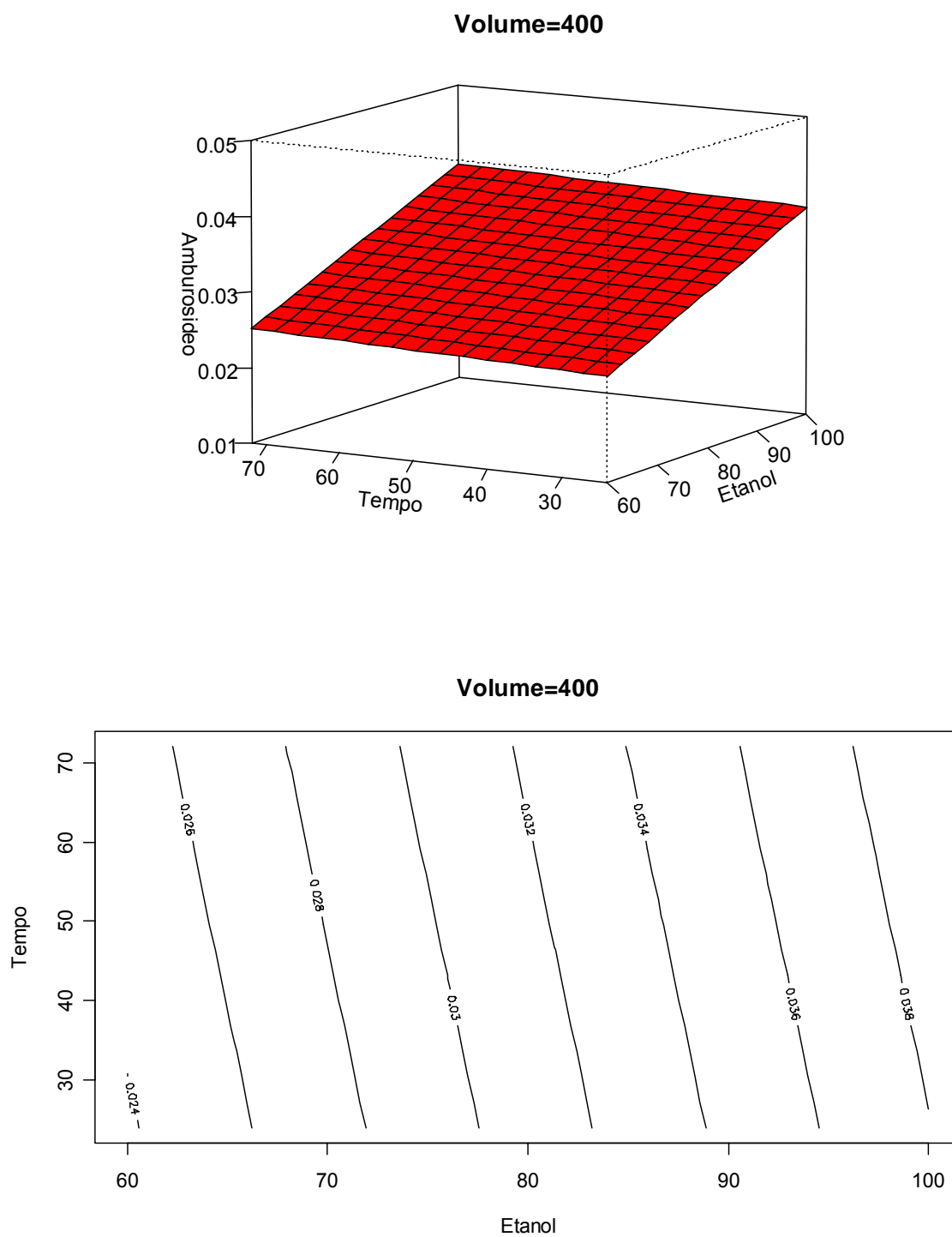


Figura 8.17. Gráficos de superfície de resposta do teor de amburoside A em função do tempo de extração e teor alcoólico. Volume de extração: 400 mL

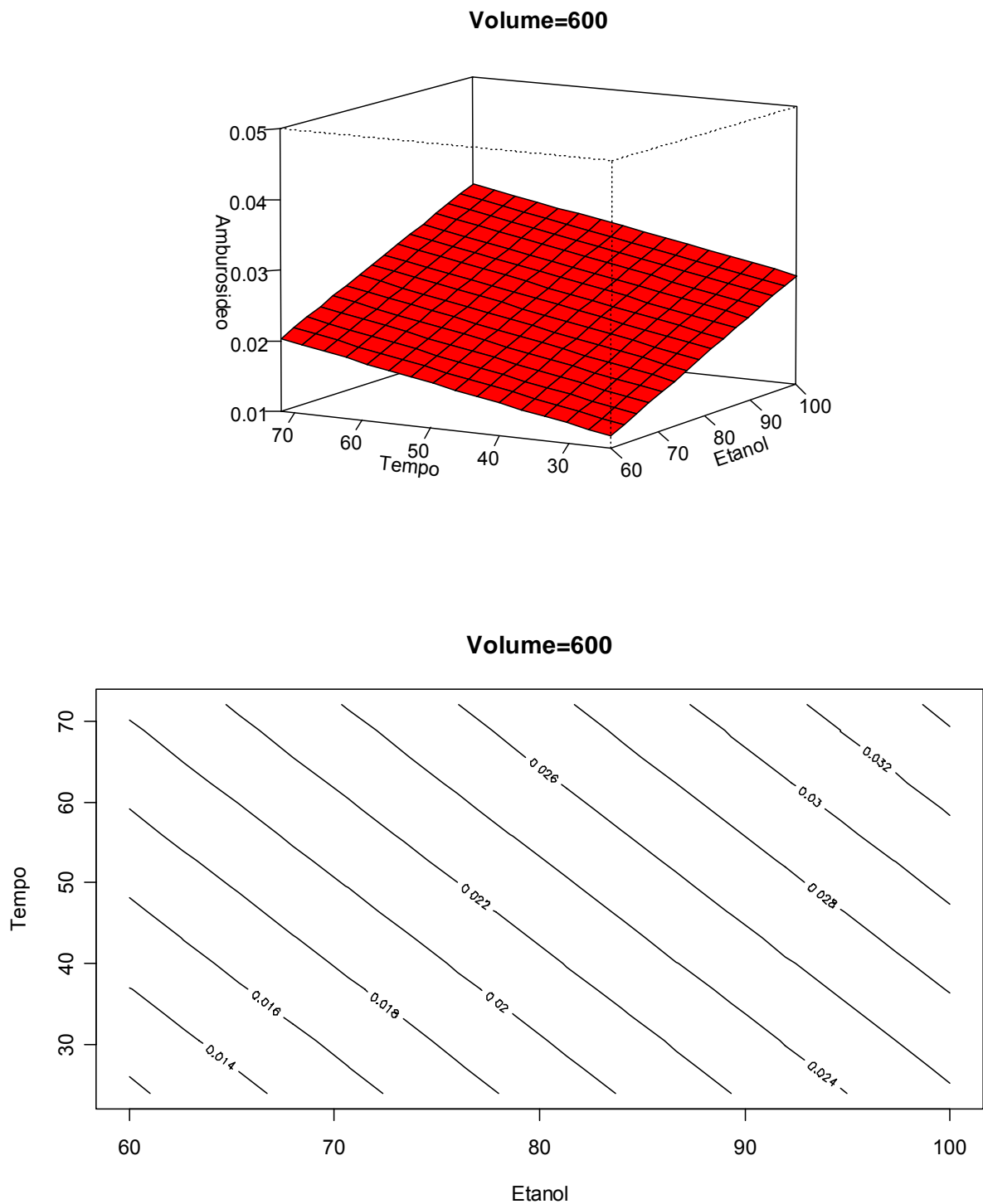


Figura 8.18. Gráfico de superfície de resposta do teor de amburosídeo A em função do tempo de extração e teor alcoólico. Volume de extração: 600 mL

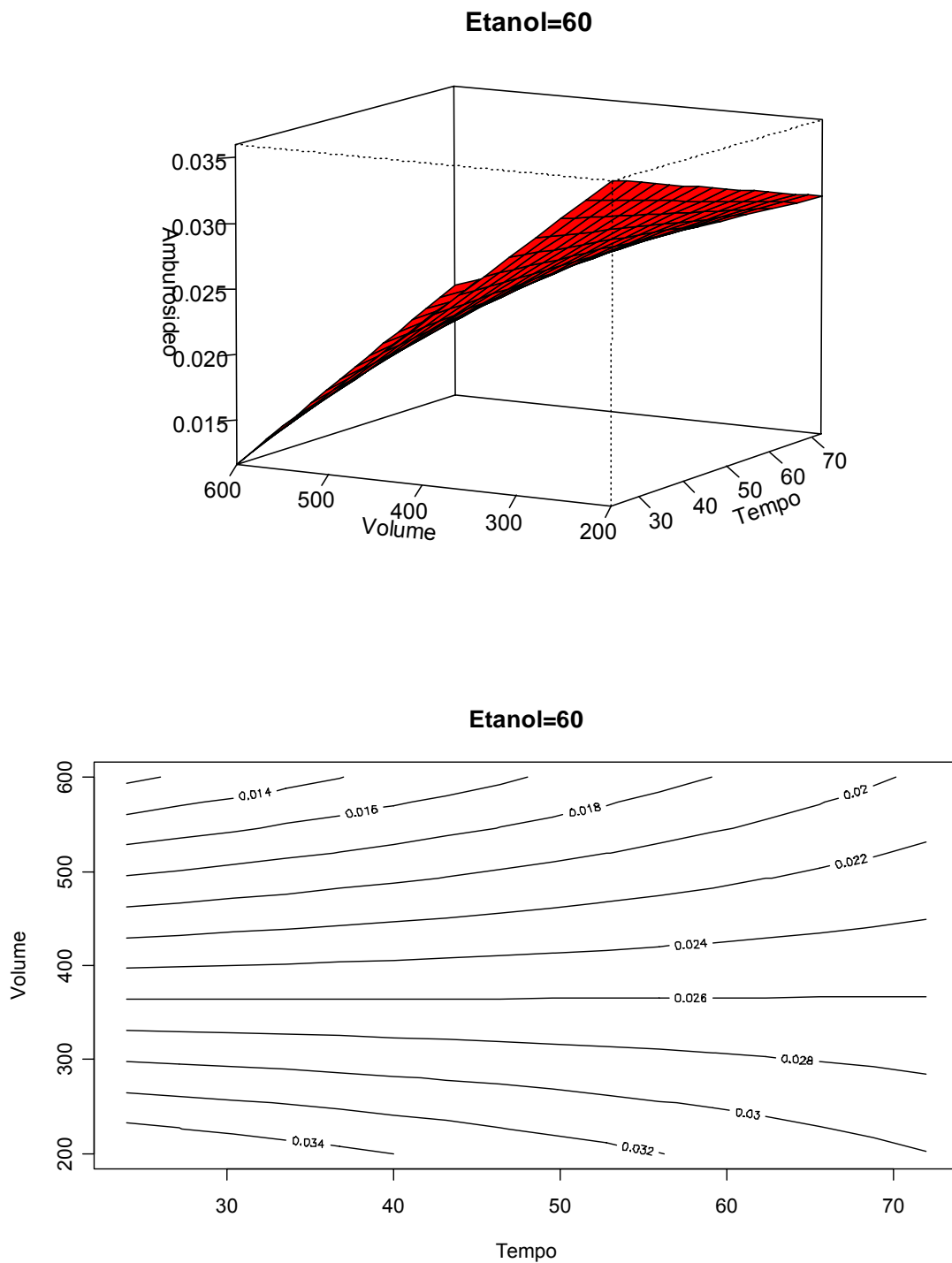


Figura 8.19. Gráfico de superfície de resposta do teor de amburoside A em função do tempo e do volume de extração

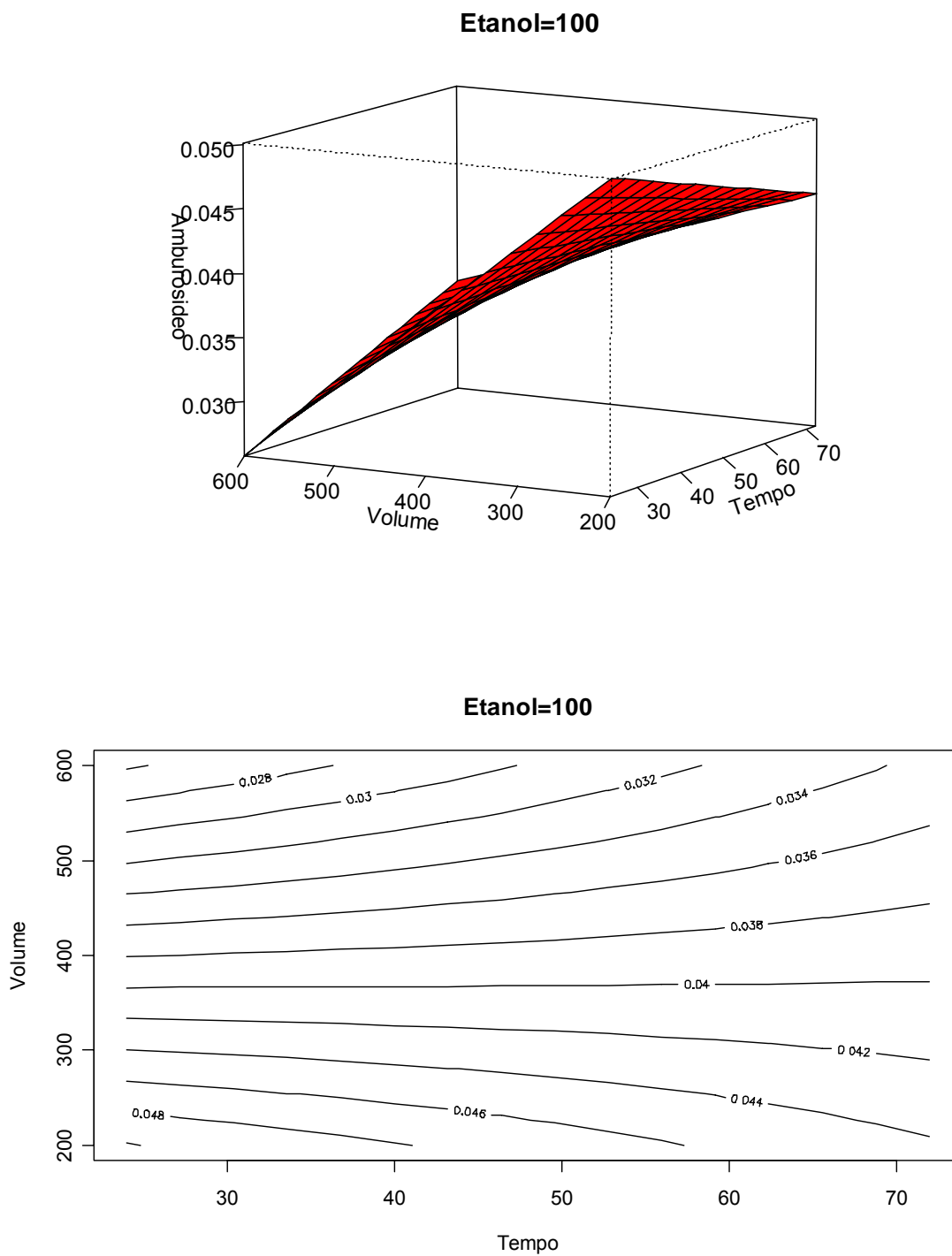


Figura 8.20. Gráfico de superfície de resposta do teor de amburosídio A em função do tempo e do volume de extração.

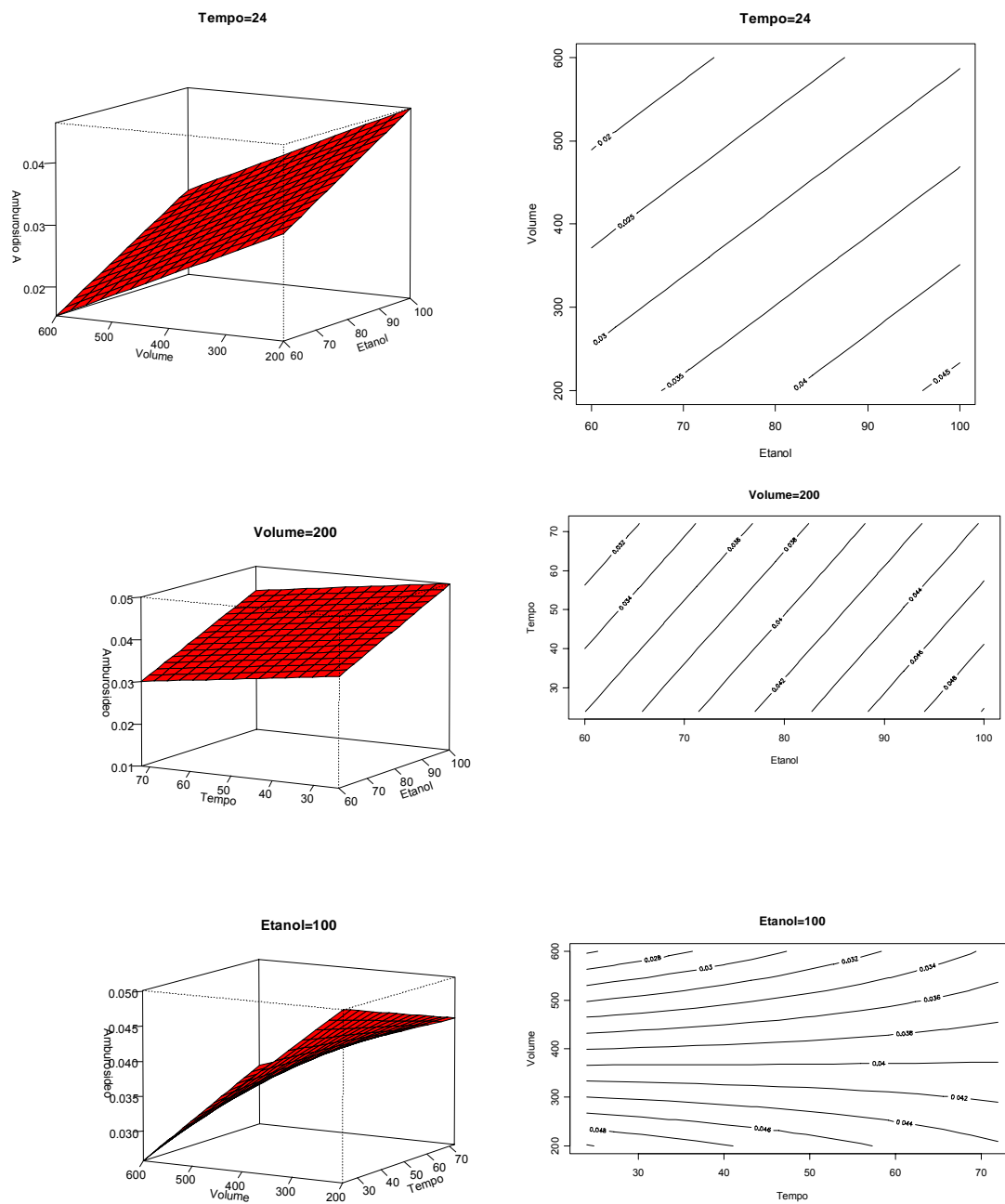


Figura 8.21. Gráficos de superfície de resposta do teor de ambrosídeo A em função de: A- volume de extração e teor alcoólico, B- tempo de extração e teor alcoólico e C- volume e tempo de extração

próximo àquele obtido com solução etanólica, enquanto o amburosídio A mostrou um decréscimo significativo ($p < 0,0001$) na sua concentração ($0,024 \pm 0,0001$ mg/g casca) (Tabela 8.4).

A análise estatística do delineamento experimental mostrou que todas as variáveis investigadas (volume de extração, tempo de maceração e grau alcoólico) isoladamente influenciaram significativamente o processo de preparação do extrato de cumaru, quando na avaliação do teor de cumarina (Tabela 8.3). Contudo, em relação ao amburosídio A (Tabela 8.4) das variáveis investigadas apenas o tempo não mostrou influência significativa. Quanto à interação das variáveis durante o processo extrativo, foi verificado que volume e tempo de extração interage no processo. Assim, numa perspectiva de aperfeiçoar mais ainda o processo extrativo, poderiam ser delineados estudos adicionais fixando o grau alcoólico de escolha para o processo, como 100%, e realizando maiores variações no volume e tempo de extração.

Diante dos resultados obtidos o método de extração selecionado para a produção da solução extrativa de cumaru a ser submetida a secagem e avaliação pré-clínica compreendeu: volume de extração 200 mL; tempo de maceração/percolação: 24 h e solução extratora: EtOH -100%).

Os ensaios aplicados na caracterização físico-química da solução extrativa foram àqueles necessários em pesquisa tecnológica desta natureza, ou seja, determinação de pH, resíduo seco, densidade, além de determinação dos teores dos marcadores, cumarina e amburosídio A (Tabela 8.2). O registro original dos cromatogramas dos marcadores e extrato selecionado estão na Figura 8.22.

A determinação do pH serve como parâmetro auxiliar para o controle de estabilidade, fornecendo indicativos gerais sobre a natureza química do conjunto de compostos presentes em solução. Permite, desta forma, inferir a

respeito de possíveis reações de degradação devido a fatores ligados à interação com o meio ambiente (SONAGLIO,1987).

Tabela 8.2. Concentrações de cumarina e amburosídio A determinadas nos extratos de cumaru por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Extrato	Etanol (%)	Tempo (h)	Volume (mL)	Cumarina (mg/g casca)	AMB (mg/g casca)
1	20	24	200	0,0115 ± 0,0007	ND
2	20	24	600	0,0204 ± 0,0007	ND
3	20	72	200	0,0115 ± 0,0020	ND
4	100	24	200	0,0274 ± 0,0009	1,0025 ± 0,03
5	20	72	600	0,0457 ± 0,0007	ND
6	100	24	600	0,0441 ± 0,0007	1,5464 ± 0,001
7	100	72	200	0,0268 ± 0,0021	0,8837 ± 0,06
8	100	72	600	0,0610 ± 0,011	1,6815 ± 0,15
9	60	48	400	0,0519 ± 0,0005	0,0198 ± 0,00006

Os valores das concentrações de cumarina e amburosídio A (AMB) estão descritos como média ± DP. As análises foram realizadas em triplicata. ND: não detectado.

a= CM4 vs CM1; b=AMB4 vs AMB1; c= AMB4 vs AMB9; d= CM4 vs CM6 e e=AMB4 vs AMB6.

a,b,c,d,e = p<0,05

Tabela 8.3. Análise de variância da concentração de cumarina nos extratos de cumaru obtido sob diferentes condições (variáveis: teor de etanol – EtOH em água, tempo de maceração - T e volume de extração - V)

Variáveis	Soma do quadrados	Grau de liberdade	F	P
EtOH	0.0049015	2	15.8071	0.0001089 *
V	0.0019278	1	12.4344	0.0024119*
T	0.0007741	1	4.9927	0.0383747*
EtOH:V	0.0002227	1	1.4361	0.2463149
EtOH:T	0.0001525	1	0.9837	0.3344373
V:T	0.0000175	1	0.1129	0.7407059
EtOH:V:T	0.0002263	1	1.4598	0.2426035

Tabela 8.4. Análise de variância da concentração de amburosídio A nos extratos de cumaru obtido sob diferentes condições (variáveis: teor de etanol – EtOH em água, tempo de maceração - T e volume de extração - V)

Variáveis	Soma do quadrados	Grau de liberdade	F	P
EtOH	0.00047940	1	23.2931	0.0006956*
V	0.00087040	1	42.2909	6.868e-05*
T	0.00000588	1	0.2857	0.6046715
V:T	0.00015987	1	7.7677	0.0192164 *

Tabela 8.5. Análise comparativa da solução extrativa etanólica de *A. cearensis*

Parâmetros analisados	EtOH 20%	EtOH 60%	EtOH 100%
pH	5,4 ± 0,07 (1,42)	5,5± 0,05 (0,85)	5,6 ± 0,06 (1,05)
Resíduo seco (% , m/m)	1,93 ± 0,05 (0,24)	1,83± 0,19 (1,04)	1,05± 0,05 (0,48)
Densidade (g/ml), 25°C	1,0606± 0,002 (0,20)	1,060± 0,002 (0,19)	0,8838± 0,004 (0,46)
Amburosídio A (mg/g de casca)	Não detectado	0,02450± 0,0001 (0,41)	0,05010 ± 0,0020 (3,98)
Cumarina (mg/g de casca)	0,0115 ± 0,0007 (0,88)	0,052 ± 0,012 (1,09)	0,06860 ± 0,0023 (3,33)

Os valores representam a média ± desvio padrão. CV= coeficiente de variação percentual.

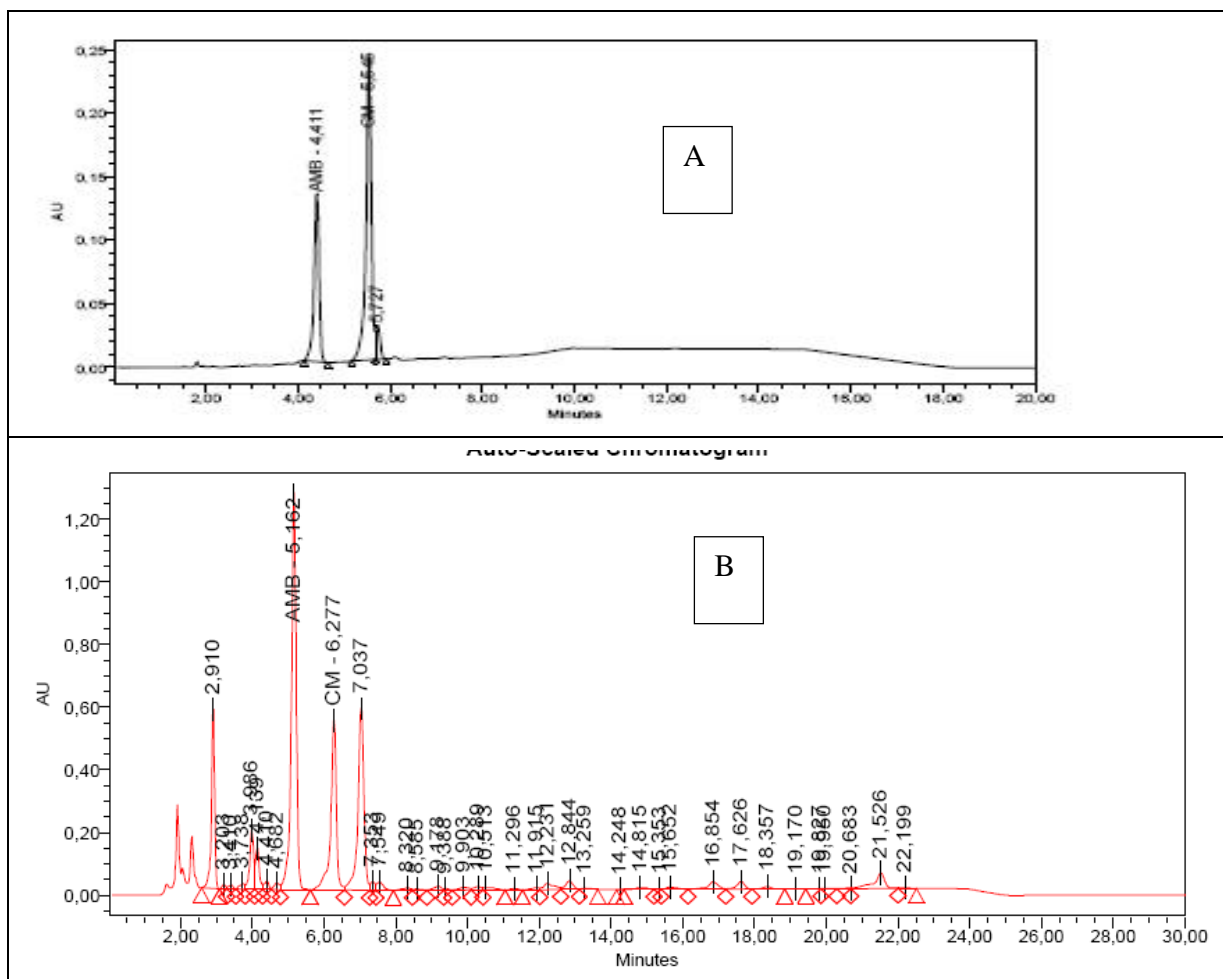


Figura 8.22. A. Cromatograma dos marcadores e B. Cromatograma do extrato de cumaru obtidos por CLAE-DAD.

Pode, também, fornecer informações sobre a estabilidade dos compostos químicas presentes na solução extrativa.

A avaliação do resíduo seco da solução extrativa apresentou um teor baixo de sólidos em comparação com outras drogas vegetais estudadas. A concentração de resíduo sólido presente na amostra possibilita fazer cálculo do percentual de adjuvantes a ser adicionado na solução extrativa para produção do extrato seco por *Spray dryer*. A avaliação da densidade da solução extrativa pode ser utilizada para auxiliar o processo de redução de volume para obtenção do extrato concentrado, já que seu valor pode ser utilizado para determinar o volume final ideal para iniciar o processo de secagem por *Spray dryer*.

A análise comparativa do teor de cumarina e amburosídio A da solução extrativa de cumaru obtida no presente estudo, em relação à tintura de cumaru (produto intermediário na produção do xarope) e ao xarope de cumaru doados pelo laboratório A está descrita na Tabela 8.6. Foi observado que o teor de cumarina na solução extrativa de cumaru foi 4,9 e 18 vezes superior em relação a tintura e xarope de cumaru, respectivamente. O amburosídio A foi detectado apenas no extrato de cumaru. Portanto, o processo extrativo desenvolvido pelo presente estudo apresentou vantagens em relação aos produtos derivados do cumaru que estão no mercado farmacêutico.

Tabela 8.6 Concentração de cumarina e amburosídio A na solução extrativa, tintura e xarope de cumaru determinada por CLAE-DAD

Produto	Concentração (mg/mL)	
	AMB	CM
Tintura	-	0,55 ± 0,0051
Xarope A	-	0,15 ± 0,0003
Extrato	2,0050 ± 0,0798	2,7449 ± 0,0903

O extrato de cumaru analisado foi produzido sob as seguintes condições: etanol 100%/200mL/24h de maceração/percolação. A tintura e o xarope de cumaru foram cedidos pelo laboratório A. Os valores representam a média \pm dp. As análises foram realizadas em triplicata.

8.3. Produção, avaliação e seleção do método de secagem do extrato padronizado de cumaru

Foram feitos dois experimentos para seleção do melhor adjuvante de secagem do extrato, o primeiro foi realizado com o extrato de cumaru com teor alcoólico de 100%, utilizando os excipientes dióxido de silício, maltodextrina, celulose, amido de milho e PVK-30, porém nenhum adjuvante mostrou-se ideal para secagem, visto que todos tiveram separação de fases e adesão na placa de petri. Enquanto que no segundo experimento foi adicionado 25% de água no extrato alcoólico 100%, sendo desta forma possível a seleção do melhor adjuvante de secagem do extrato de cumaru, conforme os resultados apresentados nas figuras 8.23, 8.24, 8.25 e 8.26.

A adição de água no extrato teve como objetivo aumentar a sua fluidez, evitando o entupimento do bico do atomizador durante a secagem, e reduzir o conteúdo de álcool, prevenindo o risco de explosão.

Dentre os adjuvantes testados no ensaio na placa de petri com o extrato hidroalcoólico de *Amburana cearensis* para seleção do melhor adjuvante de secagem, somente o extrato seco com dióxido de silício apresentou aspecto de pó seco, facilmente removível da placa. O extrato seco com celulose e amido de milho apresentaram aspectos semelhantes, isto é, pó com separação de fases e úmido e difícil remoção da placa, enquanto que o extrato seco com maltodextrina não foi solúvel impossibilitando a secagem e por fim o extrato seco com PVK-30 apresentou aspecto de um filme.

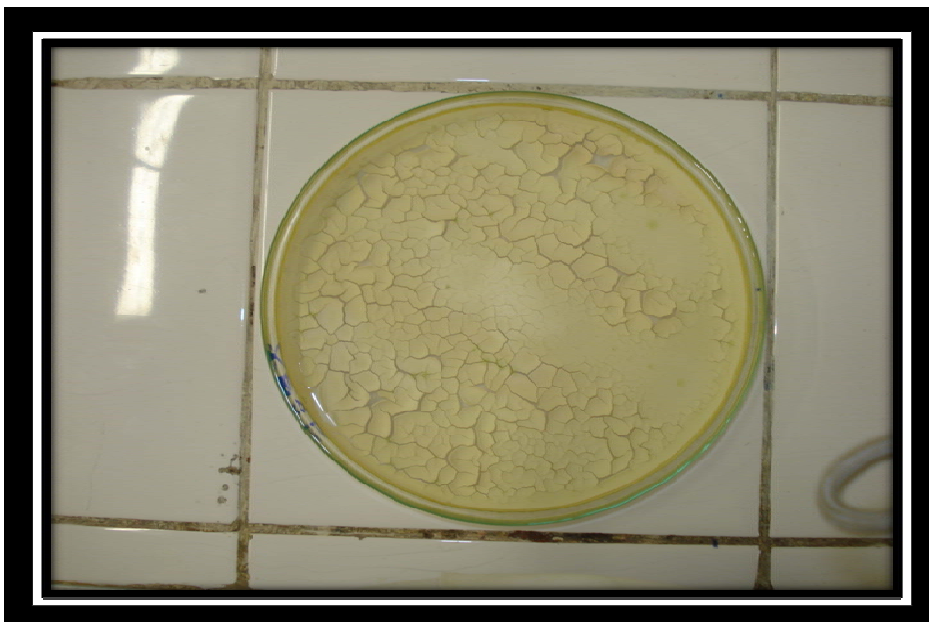


Figura 8.23 Aspecto obtido após secagem na estufa/1h com extrato alcoólico e Dióxido de silício.

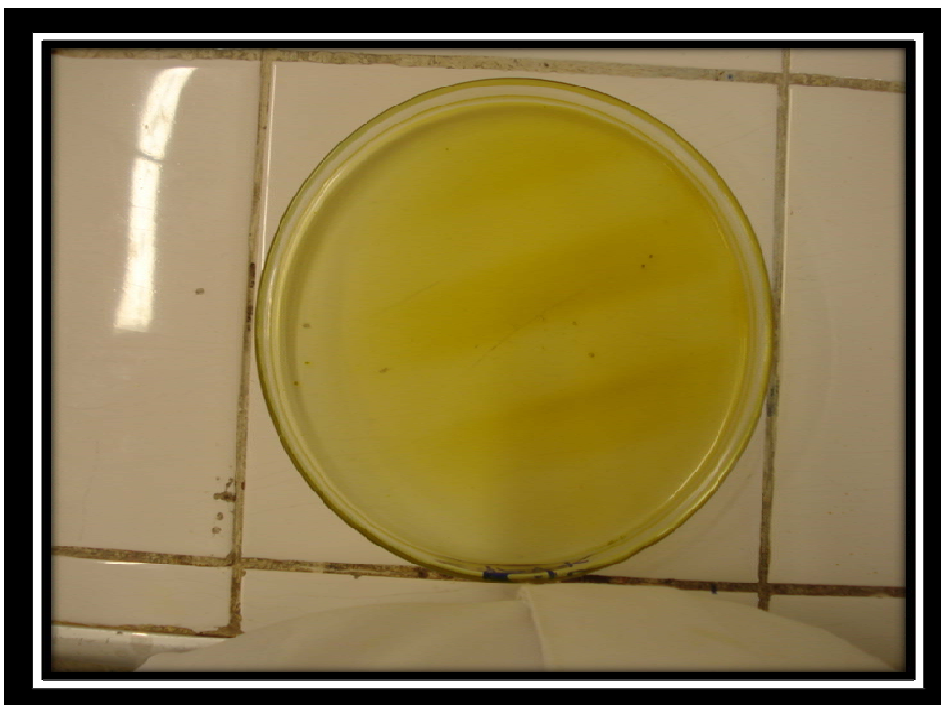


Figura 8.24 Aspecto obtido após secagem na estufa/1h com extrato hidroalcoólico e Amido.

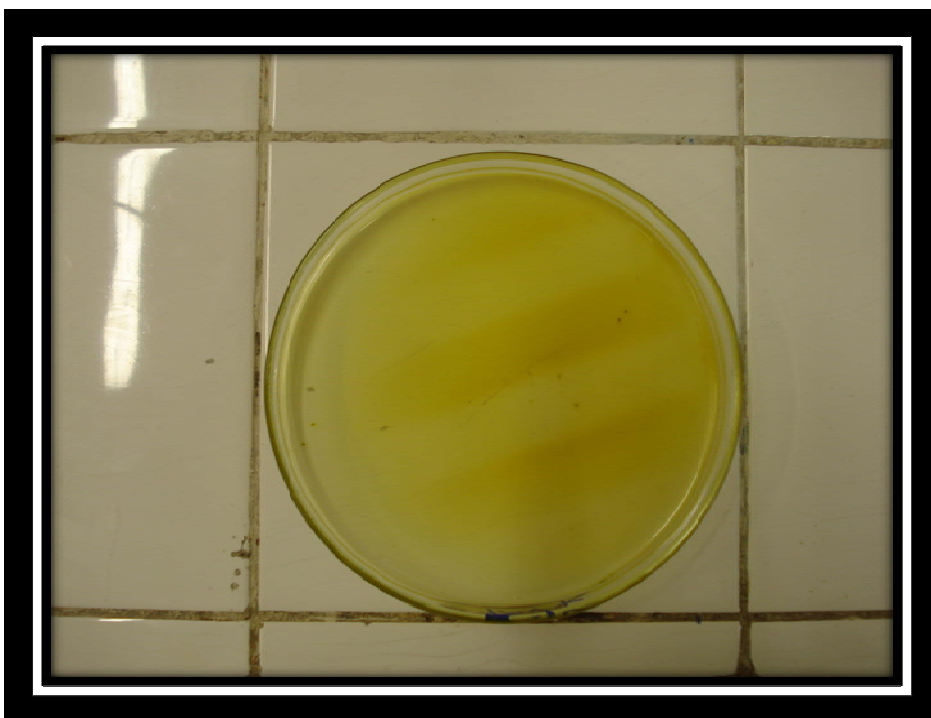


Figura 8.25 Aspecto obtido após secagem na estufa/1h com extrato hidroalcoólico e celulose.

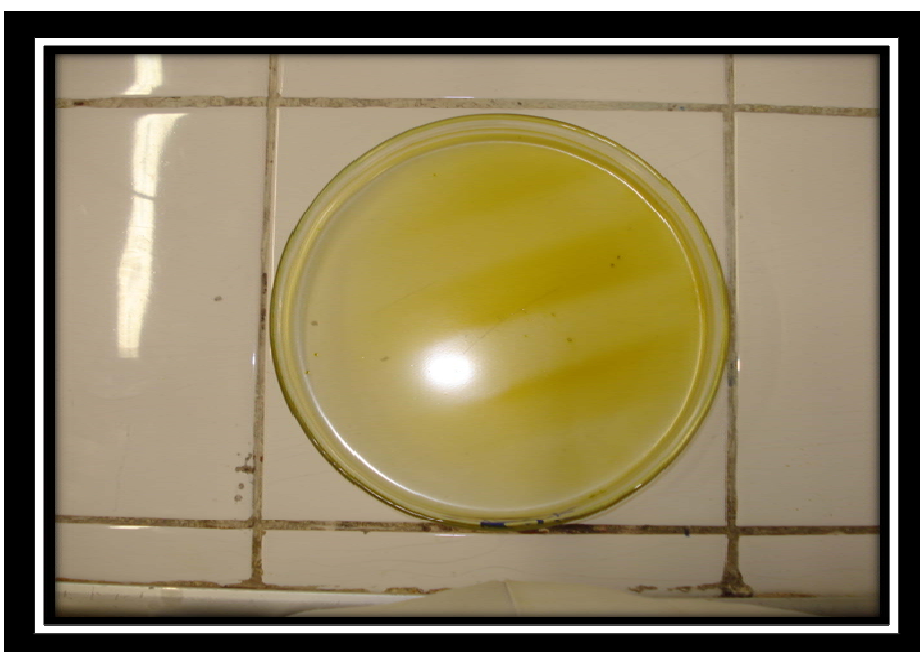


Figura 8.26 Aspecto obtido após secagem na estufa/1h com extrato hidroalcoólico e polivinilpirrolidona (PVK-30).

O dióxido de silício vem sendo amplamente empregado na secagem de produtos farmacêuticos devido à sua grande capacidade de adsorção, reduzindo a aderência do extrato nas paredes do equipamento durante o processo. Também permite a obtenção de partículas esféricas e homogêneas, aumentando o rendimento, (RUNHA et al , 2001).

O processo de secagem executado conforme os parâmetro operacionais padronizados e descritos na Tabela 8.7 , após várias tentativas com mudanças na concentração do extrato, fluxo, temperatura e a relação da concentração do extrato/adjuvante, demonstrado na Tabela 8.8

Durante a secagem, observou-se a aderência das partículas dos extratos seco nas paredes da câmara de secagem e a perda de parte das partículas em suspensão no ar pelo sistema de exaustão. Esses fatores já foram observados também em outros trabalhos (PETROVICK et al, 1991; DE PAULA, 1998; SOUZA et al, 2000) nos quais este mesmo método de secagem foi utilizado.

Segundo a literatura, a aderência às paredes pode estar relacionada aos excipientes utilizados, às condições adotadas no processo ou mesmo à baixa eficiência do ciclone utilizado na coleta do pó (MASTERS, 1985; LIST e SCHIMIDT, 1979). Este parâmetro, relacionado ao equipamento, pode ser ajustado em escala industrial e as perdas minimizadas. Essses parâmetros podem justificar os rendimentos obtidos no processo de secagem por *Spray drye* observados na tabela 8.7.

Os resultados obtidos do planejamento fatorial delineado na tabela 6.3, mostraram que devido a insolubilidade do excipiente em água, o tempo de incorporação não é um parâmetro válido para avaliação, pois quando cessa a agitação o material sedimenta independente da concentração do excipiente e tempo de incorporação. Enquanto que a agitação constante do extrato com excipiente durante a secagem mostrou-se a condição ideal de secagem, visto que o material fica homogêneo durante todo o processo de secagem.

Em relação a proporção de excipiente: resíduo sólido foi evidenciado que proporções maiores que 25% de excipiente são as ideais para otimização do processo de secagem. As proporções inferiores a esse percentual de aerosil,

apresentaram características físico-químicas não desejáveis no processo de secagem (adesão do pó a câmara de secagem, higroscopicidade) e diminuição do rendimento da operação.

O extrato seco por atomização da *Amburana cearensis* com o adjuvante tecnológico dióxido de silício, mostrou-se diferente quanto ao aspecto físico visual e tecnológico, conforme fosse alterada as proporções do adjuvante em relação ao resíduo sólido. O extrato com adição de 50%, de dióxido de silício apresentou coloração mais clara e baixo rendimento, enquanto que na proporção 25%, 75% e 100% mostraram melhores características físico-químicas e aumento do rendimento da operação. Estes dados são mostrados na Tabela 8.9 e visualizados na Fig. 8.28. Os adjuvantes adicionados aos extratos contribuíram para manutenção das características físicas dos extratos secos, além de influenciarem positivamente no rendimento do processo de secagem.

O dióxido de silício adicionado aos extratos nas concentrações, 25%, 50%, 75 e 100% proporcionaram uma boa estabilidade física, mantendo o aspecto de pó fino e solto além de conferir o bom rendimento ao processo. Estes dados corroboram com outros estudos (SOUZA, 2000). Esta estabilidade pode ser atribuída a uma possível microencapsulação das partículas do pó pelo dióxido de silício (CORNEC, 1990). Os extratos com concentrações de dióxido de silício menor que 25% apresentaram tendência à formação de aglomerados, de coloração enegrecida.

Portanto o dióxido de silício na proporção 1:0,5 foi a selecionada para o estudo de otimização dos parâmetros de secagem por propiciarem uma melhor recuperação do produto seco durante seu processamento e obtenção de produtos intermediários com maior concentração de constituintes químicos e com melhores características tecnológicas e uma maior resistência aos efeitos da higroscopicidade a qual estavam sendo expostos. Isto poderia ser relacionado à menor retenção de água pelo extrato seco durante o processo de secagem, como também às propriedades tecnológicas do adjuvante adicionado proporcionando melhor estabilidade do produto seco frente ao crescimento microbiano.

O rendimento dos extratos secos estão apresentados na Tabela 8.9. e podem ser visualizados na Figura 8.28. A análise dos dados de rendimento do

processo de secagem dos extratos secos mostrou que existe um comportamento diferenciado dentro do parâmetro de concentração de dióxido de silício e resíduo seco.

Tabela 8.7 Condições Operacionais padronizada para secagem do extrato hidroalcoólico de *A. cearensis* por *Spray dryer*

<i>Parâmetros</i>	<i>Dados Experimentais</i>
Temperatura de saída do ar de secagem (° C)	52
Temperatura de entrada do ar de secagem (° C)	95
Fluxo de alimentação (mL/min)	16,66
Fluxo de ar (L/min)	40

Tabela 8.8- Resultados obtidos do planejamento experimental para estudo dos adjuvantes avaliados para a produção do extrato seco de cumaru por *Spray dryer*

Concentração do Adjuvante	Teor de Amburosídeo A (mg/g)	Teor Cumarina (mg/g)
Dióxido de silício 1:0,5	70,44 ±2,09 (2,97)	17,98±0,48 (2,67)
Dióxido de silício 1:1	59,43 ± 1,2 (2,09)	14,09±1,03 (7,36)
Dióxido de silício 1:1,5	46,38 ± 2,12 (4,58)	10,11 ±0,64 (6,37)
Dióxido de silício 1:2	36,15± 0,06 (0,18)	8,81 ±0,31 (3,59)

X = média; s= desvio padrão; CV= coeficiente de variação percentual.

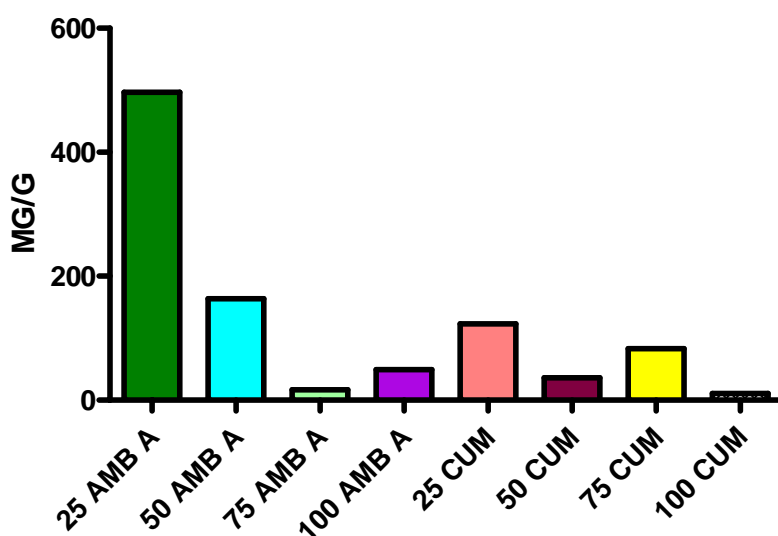


Figura 8.27 Avaliação do teor do Amburoside A (Amb A) e da Cumarina após secagem por Spray dryer com adjuvante dióxido de silício nos percentuais 25, 50, 75 e 100% em relação ao teor de resíduo sólido.

Tabela 8.9 Rendimento da do extrato hidroalcoólico de *A. cearensis* pelo processo de secagem por *Spray dryer*

Proporção resíduo sólido:adjuvante tecnológico	Quantidade de adjuvante (g)	Quantidade de extrato hidroalcoólico (g)	Quantidade do extrato seco obtido (g)	Rendimento (%)*
1:0,5	0,5016	50,0	0,2	39,87
1:1	1,0051	50,0	0,5	24,93
1:1,5	1,5027	50,0	0,8	32,00
1:2	2,0032	50,0	1,1	36,62

* Massa de extrato seco X100 / [(massa do extrato hidroalcoólico X resíduo seco / 100) + massa de adjuvante adicionada].

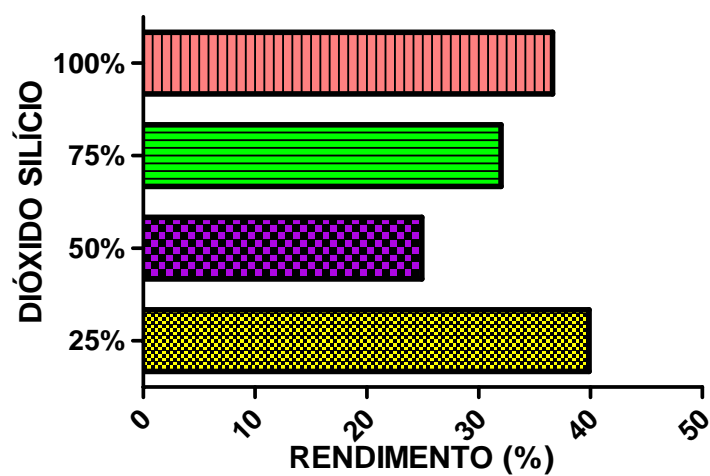


Figura 8.28 Comparação do rendimento obtido do Extrato seco de Cumaru por *Spray Dryer* com adjuvante dióxido de silício nos percentuais 25, 50, 75 e 100% em relação ao teor de resíduo sólido



Figura 8.29 Aspecto macroscópico do extrato seco de *A. cearensis*

Na análise macroscópica foi possível observar que o extrato seco apresenta-se como um pó fino, amarelo claro, com odor característico da espécie vegetal e com tendência a formar aglomerados (Figura 8.33). Em estudos adicionais pretende-se realizar a análise microscópica do pó. Isso por ser este parâmetro muito importante na etapa de desenvolvimento de formas farmacêuticas, podendo assim onde o pesquisador pode ter uma previsão preliminar de como será a velocidade de dissolução, biodisponibilidade, uniformidade de conteúdo e solubilidade da forma farmacêutica (ANSEL, et al,2000).

Tabela 8.10 Caracterização tecnológica do extrato seco por Spray dryer padronizado

Parâmetro analisado	Dados
Densidade bruta (g/ml)	0,1477±0,005 (0,35)
Densidade de compactação (g/ml)	0,2389±0,012 (0,52)
Fator de Hausner	0,0912±0,003 (0,35)

X = média; s= desvio padrão; CV= coeficiente de variação percentual.

A densidade bruta é uma característica que dá suporte para que se possa calcular e escolher o tipo de armazenamento, o recipiente de capacidade adequada, o tamanho da cápsula ou punção de compressão (PRESCOTT e BERNUM, 2000).

A densidade de compactação está relacionada com o volume que o pó pode adquirir em uma proveta quando submetida ao empacotamento, o qual é diretamente influenciado pela forma e pelo tamanho das partículas.

O fator de Hausner é uma das características do material que está diretamente relacionada aos processos de desenvolvimento e manipulação das formas farmacêuticas. A habilidade de se ajustar e controlar as propriedades de fluxo dos pós durante o processamento e formulação é de extrema importância no desenvolvimento de produtos (THALBERG; LINDHOLM, 2004).

O fator de Hausner, calculado a partir das densidades bruta e de compactação, está relacionado à compressibilidade do pó, sendo que, materiais com índice inferior à 1,25 são considerados facilmente compressíveis (WANCZINSKI et al, 2002). Como pode ser observado na tabela 8.8, o extrato produzido com dióxido de silício na concentração 25% apresentou fator de Hausner inferior à 1,25.

8.4. Toxicidade pré-clínica do extrato seco padronizado de cumaru

Na avaliação preliminar dos efeitos comportamentais e determinação da toxicidade aguda do extrato seco padronizado de cumaru (Cumarina: $17,989 \pm 2,67$ mg/g extrato; amburosídeo A: $70,441 \pm 2,095$ mg/g) foram utilizados camundongos Swiss. O extrato de cumaru administrado por via oral em doses únicas crescentes de 250, 500 e 1000 mg/Kg não produziu alterações comportamentais ou alterações nos padrões fisiológicos de evacuação e micção durante todo período de observação, 72 horas, em relação ao grupo controle. Contudo, de 33 a 50% dos animais tratados com o extrato apresentaram diminuição da atividade motora, alienação ao ambiente e analgesia, sugerindo um possível efeito depressor do sistema nervoso central. Nas doses investigadas não foram observadas mortes durante o período de observação.

Vários testes *in vitro* podem ser empregados na avaliação da potencial citotoxicidade de substâncias químicas. Esses ensaios necessitam de pequenas

quantidades de substância teste e vários parâmetros podem ser determinados desde a contagem direta de células às medidas da integridade da membrana como através da atividade da enzima lactato desidrogenase - LDH. Na avaliação da citotoxicidade do extrato seco padronizado de cumaru (1-200 µg/mL) em neutrófilos isolados do sangue humano através da determinação da atividade da LDH, mostrou que o produto possui um grau de citotoxicidade elevando a atividade da LDH de 2 – 2,5 vezes, enquanto o controle positivo (Triton X a 1%) elevou a atividade da LDH em 3,7 vezes (Figura 8.30).

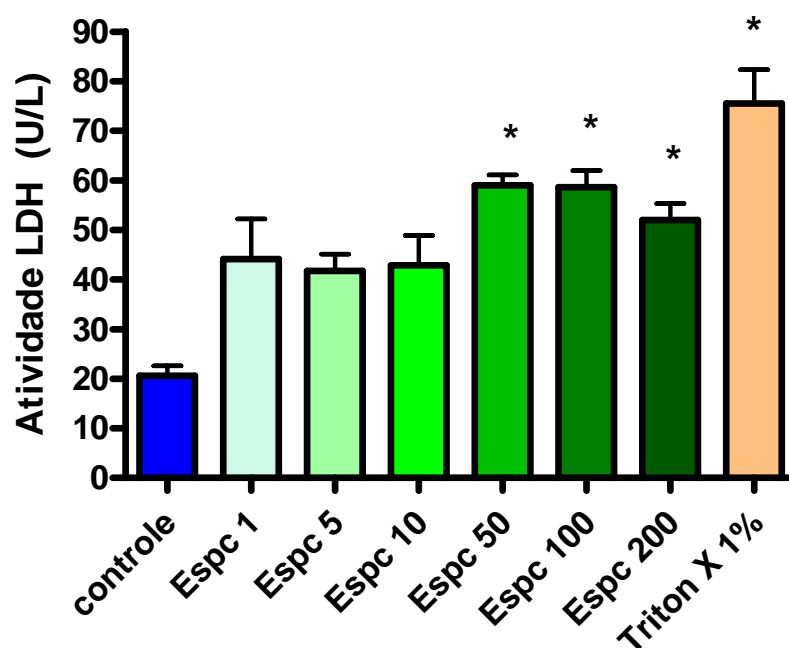


Figura 8.30. Avaliação da citotoxicidade do extrato seco padronizado de cumaru (ESPC) em neutrófilos isolados do sangue humano através da determinação da atividade da lactato desidrogenase (LDH). Os valores representam a média \pm EPM. * $p < 0,05$ (ANOVA, Tukey)

9. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo com a casca do caule de *A. cearensis* e produtos derivados padronizados nos permitem as seguintes conclusões:

- O método de preparação da droga vegetal – casca do caule de cumaru seca e pulverizada, desenvolvido permitiu o estabelecimento de parâmetros de qualidade imprescindíveis e requisitados oficialmente (ANVISA, RE 48 2004), como percentual de umidade, teor de cinzas, granulometria e teor de marcadores.
- A análise granulométrica da droga vegetal cominuída permitiu sua classificação em pó grosso a semi-fino, de acordo com a Farmacopéia Brasileira IV (1988).
- O método de secagem selecionado para produção da droga vegetal, monitorado pelos parâmetros descritos anteriormente, compreendeu: secagem em estufa com circulação de ar, duração: 48 h e granulometria: moderadamente grosso – semifino.
- No desenvolvimento do método extrativo com auxílio de um planejamento fatorial, mostrou que: 1. o aumento do volume de extração prejudica a concentração tanto de cumarina quanto de amburosídio A no extrato de cumaru; 2. A variável tempo de extração mostrou uma influência sutil no processo extrativo; 3. O teor alcoólico interferiu significativamente tanto no teor de cumarina quanto de amburosídio A no extrato monitorados por CLAE-DAD .
- O método de produção da solução extrativa de cumaru compreendeu: volume de extração 200 mL; tempo de maceração/percolação: 24 h e solução extratora: EtOH -100%).

- No processo extrativo, considerando o teor de amburosídeo A, as variáveis volume e tempo de extração mostraram interação. Assim, estudos adicionais fixando o grau alcoólico realizando maiores variações no volume e tempo de extração podem ser delineados, numa perspectiva de otimizar mais ainda o processo extrativo, como aumentar o teor de marcadores.
- Na secagem do extrato de cumaru, a etapa crítica foi a seleção do adjuvante tecnológico ideal, isto é, aquele que proporcionasse uma melhor recuperação do produto seco, bem como maior concentração de marcadores além de características tecnológicas adequadas. Assim, dentre os excipientes investigados o dióxido de silício (Aerosil®) na concentração 1:0,5 foi selecionado como excipiente para a secagem do extrato de cumaru.
- Na avaliação toxicológica preliminar *in vivo* do extrato seco padronizado de cumaru, foi observada uma toxicidade baixa, contudo o produto apresentou uma relativa citotoxicidade em neutrófilos humanos.
- Os resultados obtidos no presente estudo permitiram o desenvolvimento de métodos de produção, além de parâmetros analíticos necessários tanto para o controle de qualidade da droga vegetal quanto de produtos derivados de *A. cearenis* (solução extrativa e extrato seco). Além disso, a avaliação toxicológica pré-clínica mostrou preliminarmente o grau de segurança desse novo produto, extrato padronizado de cumaru especial por possuir um teor de marcadores/princípios ativos superiores em relação a outros produtos existentes que empregam também o cumaru como matéria-prima ativa. Dessa forma, esse trabalho possivelmente irá contribuir para o desenvolvimento num futuro próximo de um fitoterápico segundo as orientações da regulamentação vigente (ANVISA, RDC N° 48, de 16 de março de 2004).

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

AMBRÓSIO, Livia Maria Cordeiro Simões ; AZZOLINI, Ana Elisa Caleiro Seixas ; GREGÓRIO, Luiz Elídio ; BASTOS, Jairo Kenupp ; LUCISANO-VALIM, Y. M. Green propolis: relationship among chemical composition, influence of sazonal factors on the inhibition of the production of reactive oxygen species by neutrophils and toxicity on this cells.. In: Second International Joint Symposium: Chemistry, Biological and Pharmacological Properties of Medicinal Plants from the Americas, 2004, São Pedro - Sp. Book Abstracts, 2004. p. CP31-CP31.

AHMED A. A., Mahmoud A. A., Tanaka T., linuma M. (1994), Two methylated flavonols from *Jasonia candicans*. *Phytochemistry* **35**, 241-243.

ALEXANDER, K., 2000, Good design practice for medical devices and equipament. **Journal of Medical Engineering and Technology**, Vol. 24, No. 1, pp. 5-13.

ASCHWANDEN, C. Herbs for health, but how safe are they? *Bull. W. H. O.*, Geneva, v.79, n.7, p.691-692, 2001. Disponível em: <http://www.who.int/bulletin>. Acesso em: 14 set. 07.

ANSEL, H. C., POPOVICH, N. G.; ALLEN Jr., L. V. A. Farmacotécnica: Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos. 6º edição. São Paulo: editora Premier, 2000, 568p.

BANSKOTA A. H., Tesuka Y., Tran K.Q., Tanaka K., Saiki I., F. C. M., Silveira E. R., Nogueira N. A. P., Moraes and Kadota S. (2000a), Methyl quadrangularates A-D and related triterpenes from *Combretum quadrangularates*. *Chem. Pharmaceut. Bull.* **48**, 496-504.

BANSKOTA A. H., Tezuka Y., Adnyana I. K., Xiong Q., Hase K., Tran K. Q., Tanaka K., Saiki I., and Kadota S. Ducki S., Forrest R., Hadfield J. A., Kendall A., Law- (2000b), Hepatoprotective effect of *Combretum quadrangulare* and its constituents. *Biol. Pharmaceut.* **23**, 456-460.

BOOKER, J.D., 2003, Industrial practice in designing for quality. **International Journal of Quality Reliability and Management**, Vol. 20, No. 3, pp. 388-203.

BORGES, D.B. et al . Comparison of pharmacopeial methods for water determination in plant raw materials and validation of water determination by infrared drying for *Calendula officinalis*, *Foeniculum vulgare*, *Maytenus ilicifolia* e *Passiflora alata*. **Rev. bras. farmacogn.** , João Pessoa, v. 15, n. 3, 2005 . Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102695X2005000300013&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 10 June 2008.

BRASIL. Resolução – RDC nº. 17 de 24 de fevereiro de 2000. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/legis/resol.htm> . Acesso em 14 set 2007.

_____ Resolução RE nº. 899 de 29 de maio de 2003. Disponível em: <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/search.php>. Acesso em: 09 jun.. 2008.

_____ Resolução RE nº. 90 de 16 de março de 2004. Disponível em: <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/search.php>. Acesso em: 14 set. 2007.

_____ Resolução RDC nº. 48 de 16 de março de 2004. Disponível em: <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/search.php>. Acesso em: 14 set. 2007.

BRANDÃO, M.G.L., Dossiê Técnico- Produção de chás e extratos de plantas medicinais, CETEC, 2007.

BRAVO J. A. B., Sauvain M., Gimenez A. T., Munoz V. O., Callapa J., Men-Olivier L. L., Massiot G., and Lavaud. C. (1999), Bioactive phenolic glycosides from *Amburana cearensis*. *Phytochemistry* **50**, 71-74.

CAI, Y. Z., e CORKE, H., Production and Properties of Spray-dried *Amaranthus betacyanin* Pigmentos, *Journal of Food Science*, v.65, n.6, 2000.

CAMARGO, M. T. R. de A. *Contribuciones a los estudios etnofarmacobotánicos de espécies vegetales usados en los ritos afrobrasileiros*. Caracas: Ed. Arte, 1998.

CANUTO, K. M. Contribuição ao conhecimento químico de plantas do Nordeste: *Herisantia tiubae* (K. Schumann) Briz e *Amburana cearensis* (fr. Allem) A. C. Sm. 123f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) – Universidade Federal do Ceará, 2002.

CANUTO, K. M. ; SILVEIRA, E.R. ; BEZERRA, A.M.E. ; LEAL, L.K.A.M. ; VIANA, G.S.B. . Aspectos Químicos do Estudo Interdisciplinar (Química-Agronomia-Farmacologia) de *Amburana cearensis* A. C. Smith. In: XVIII Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, 2004, Manaus.

CANUTO, K. M. ; SILVEIRA, E.R. ; LEAL, L.K.A.M. ; VIANA, G.S.B. . Atividade Antinociceptiva e Antiedematogênica de *Amburana cearensis* (CUMARU), Silvestre e Cultivada, em Camundongos- Um Estudo Comparativo. In: XVIII Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, 2004, Manaus-AM. Livro de Resumos do XVIII Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, 2004. v. 1. p. 91.

CANUTO, K.M., Silveira, E. R., Constituintes Químicos da Casca do Caule de *Amburana cearensis* A.C.SMITH. *Quim. Nova*, vol.29, No. 6, 1241-1243, 2006.

CARDOSO, C. A. L., VILEGAS, W., BARISON, A., HONDA, N. K., “*Simultaneous determination of furanocoumarins in infusions and decoctions from carapiá (Dorstenia Species) by high-performance liquid chromatography*”, *Agricultural and food chemistry*, vol 50, p. 1465-1469, 2002.

CAMARGO, M. T. R. de A. *Contribuciones a los estudios etnofarmacobotánicos de especies vegetales usados en los ritos afrobrasileiros*. Caracas: Ed. Arte, 1999.

CAMPELO, L. M. ; Moura, R. R. ; ARARUNA, Sandra M ; Narcélio de Mattos B Goes ; SILVEIRA, E. R. ; CANUTO, Kirley Marques ; LEAL, L. K. A. M. . Determinação mensal do teor (CLAE-DAD) de princípios ativos, cumarina e amburosídeo A, na casca do caule de *Amburana cearensis* coletada no Ceará (caatinga), Brasil. In: VI Simpósio Brasileiro de Farmacognosia, 2007, Belém, PA. VI Simpósio Brasileiro de Farmacognosia, 2007.

CARVALHO, P. E. R.; *Espécies Florestais Brasileiras: Recomendações Silviculturais, Potencialidades e Uso da Madeira*, EMBRAPA: Brasília, 1994.

CASADEBAIG J, Jacob M, Cassanas G, Gaudy D, Baylac G, Puech A 1989. Physicochemical and pharmacological properties of spray-drier powders from *Fraxinus excelsior* leaf extracts. *J Ethnopharmacol* 26: 211-216.

CASADEBAIG, J., et al, Physicochemical and Pharmacological Properties os Spray-Dried Powers from *Fraxinus excelsior* leaf Extracts, *Journal of Ethnopharmacology*, v.26, p.211-216, 1986.

CELEGHINI, R. M. S., VILEGAS, J. H. Y., VILEGAS, F. M., "Extraction and Quantitative HPLC Analysis of Coumarin in Hidroalcoholic Extracts of *Mikania glomerata* Spreng ("guaco") Leaves", *J. Braz. Chem. Soc.*, vol 12, nº6, pg. 706-709, 2001.

COOK, R.D., *Concepts and Applications of finite element analysis*, John Wiley & Sons, USA, 1981 (Capítulos 1-3, 13-16)

CORDEIRO, D.S. (2000), *Produção de extrato seco de Maytenus ilicifolia* Ex. Reiss pelo processo leito de jorro, Dissertação (Mestrado), Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto - SP, Brasil.

CORREA M. P. (1984), *Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. Vol. 2., Ministério da Agricultura, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, Brasília, Brasil. 707p.

COS P., Calomme M., Sindambiwe J. B., Bruyne T., Ci- R. A., and Viana G. S. B. (1997), Antinociceptive and manga K., Pieters L., Vlietinck A. J., and Berghe D. V. antiedematogenic effects of the hydroalcoholic extract (2001), Cytotoxicity and lipid peroxidation-inhibiting and coumarin from *Torresea cearensis* Fr. All. Phytoactivity of flavonoids. *Planta Med.* 67, 515D519.

COSTA-LOTUFO, L. V.; Jimenez, P. C.; Wilke, D. V.; Leal, L. K. A. M.; Cunha, G. M. A.; Silveira, E. R.; Canuto, K. M.; Viana, G. S. B.; Moraes, M. E. A.; Moraes, M. O.; Pessoa, C.; *Z. Naturforsch., C: J. Biosci.* 2003, 58, 675.

COUTO, S. R. L. M.; BOTTINO, T. R.; GREGÓRIO, S. R. Identificação de fontes de vitamina C em polpas de frutas comerciais congeladas e concentradas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 16., 1998, Rio de Janeiro. Anais... Rio de Janeiro: SBCTA. CD.

DALLA COSTA, M. A.; MIGUEL, M. D. *Camomila*: aspectos sanitários da colheita ao armazenamento. Curitiba, 2001.

DE PAULA, I.C. *Desenvolvimento tecnológico de forma farmacêutica plástica contendo extrato seco nebulizado de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. Compositae marcela*. Porto Alegre: Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, 1996. Dissertação de Mestrado.

DHARMARATNE, H. R. W., SAJEEVANI, J. R. D. M., MARASINGHE, G. S. P., EKANAYAKE, E. M. H. G. S., "DISTRIBUTION OF PYRANOCOUMARINS IN CALOPHYLLUM CORDATO-OBLONGUM", *Phytochemistry*, vol 49, nº 4, pg 995-998, 1998.

DI STASI, L. C. *Plantas medicinais: arte e ciência*. Um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: Ed. da Universidade Estadual Paulista, 1996. DO BRASIL, 12., 1992, Curitiba.

DITTMAN, R. H., ZEMANSKY, M. W., (1981), *Heat and thermodynamics*, Mc Graw Hill, 543 pp.

ELVIN-LEWIS, Memory. Should we be concerned about herbal medicines? *J. Ethnopharmacol.*, Amsterdam, v.75, p.141-164, 2001.

ETZEL, M. R., et al, Enzyme Inactivation in a Droplet Forming a Bubble During Drying, *Journal of Food Engineering*, v.27, p.17-34, 1996.

FARIAS, M. R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Coord.) *Farmacognosia - da planta ao medicamento*. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS / Ed. da UFSC, 1999. p.197-220.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA: 4ª. Edição. São Paulo: Editora Atheneu, parte II, quarto fascículo, 1998.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA: 4ª. Edição. São Paulo: Editora Atheneu, parte II, quarto fascículo, 2000.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA: 4ª. Edição. São Paulo: Editora Atheneu, parte II, quinto fascículo, 2004.

FILKOVÁ, I; Mujumdar, A.S. (1995) Industrial Spray Drying Systems. Chapter 9 In: Handbook of Industrial Drying, second edition, Vol. 1, Ed. A. S. Mujumdar, pag. 263-308.

GIL, E.S. Controle físico-químico de qualidade de medicamentos. São Paulo: Phamabooks. 2ª Edição, 2007.

HIROSE Y., Tanaka T., Kawamori T., Ohnishi M., Makita H., Mori H., Satoh K., and Hara A. (1995), Chemoprevention of urinary bladder carcinogenesis by natural phenolic compound protocatechuic acid in rats. *Carcinogenesis* **16**, 2337-2342.

ISONO, Y., ARAYA., G., e HOSHINO, A., Immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* for ethanol Fermentation on Y-Alumina Particles using a Spray-dryer, *Process Biochemistry*, v. 30, n. 8, p. 743-746, 1995.

KASHMAN, Y., GUSTAFSON, K. R., FULLER, R. W., CARDELLINA, J. H., MCMAHON, J. B, CURRENS, M. J., BUCKHEIT, Jr. R. W., HUGHES, S., CRAGG, G. M., BOYD, M. R., *Journal of Medicinal Chemistry*. Vol. 35, pg 2735, 1992.

KING, C. J., KIECKBUSCH, T. G. e GREENWALD, C. G (1984), "Food-Quality Factors in Spray Drying", in: *Advances in Drying*, Vol.3, p.71-120.

KO, R.J. Causes, epidemiology, and clinical evaluation of suspected herbal poisoning. *Clin. Toxicol.*, New York, v.37, n.6, p.697-708, 1999.

KUMAR RK. Understanding airway wall remodeling in asthma: a basis for improvement in therapy? *Pharmacol Ther.* 2001;91(2):93-104.

LACHMAN, L.; Lieberman, A. H.; Kanig, J.L – Teoria e prática na Indústria Farmacêutica, Vol. 1; editora Fundação Calouste Gulbenkian, pag. 83- 112., 2001.

LEAL L. K. A.M., Ferreira A. A. G., Bezerra G. A., Viana G. S. B., Cunha K. M. A., Pessoa C., Moraes Matos F. J. A., and Viana G. S. B. (2000), Antinociceptive, antiinflammatory and bronchodilator activities of Brazilian medicinal plants containing coumarin: a comparative study. *J. Ethnopharm.* **70**, 151-159.

LEAL L. K. A.M., Matos M. E., Matos F. J. A., Ribeiro R. A., and Viana G. S. B. (1997), Antinociceptive and antiedematogenic effects of the hydroalcoholic extract and coumarin from *Torresea cearensis* Fr. All. *Phytomedicine* **4**, 221-227.

LEAL, K. A. M.; Matos, M. E.; Matos, F. J. A.; Ribeiro, R. A.; Ferreira, F. V.; Viana, G. S. B.; *Phytomedicine* **1997**, **4**, 221.

LEAL, L. K. A. M.; Estudos Farmacológicos do Extrato Hidroalcolico e Constituintes Químicos de *Torresea cearensis* Fr. All. (Cumaru). 1995. Fortaleza-CE: Curso de

Pós-Graduação em Farmacologia da UFC, 1995. Dissertação (Mestrado em Farmacologia)

LEAL, L. K. A. M.; Nechio, M.; Silveira, E. R.; Canuto, K. M.; Fontenele, J. B.; Ribeiro, R. A.; Viana, G. S. B.; *Phytother. Res.* **2003**, *17*, 335.

LEAL, L. K. A. M.; Nobre-Júnior, H. V.; Cunha, G. M. A.; Moraes, M. O., Pessoa, C.; Oliveira, R. A.; Silveira, E. R.; Canuto, K. M.; Viana, G. S. B.; *Neurosci. Lett.* **2005**, *388*, 86

LEAL, L. K. A. M.; Contribuição para a validação do uso medicinal de *Amburana cearensis* (Cumaru): estudos farmacológicos de princípios bioativos, isocampferídio e amburosídeo A, da planta, 2006. Fortaleza-CE: Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da UFC . Tese (Doutorado em Farmacologia).

LEAL, L. K. A. M. ; Vlândia Q Belarmino ; MOURA, R. R. ; MOURA, M. L. R. ; SILVEIRA, E. R. ; VIANA, Glauce S B . Validated HPLC-PDA Method for the Determination of Coumarin and Amburoside A in *Amburana cearensis* extract and finished product. In: 6th International Congress of Pharmaceutical Sciences, 2007, Ribeirão Preto. 6th International Congress of Pharmaceutical Sciences, 2007.

LEITE MGR, Silva MAM, Lino CS, Viana G.S.B, Matos FJA,1992. Atividade broncodilatadora em *Mikania glomerata*, *Justicia pectoralis* e *Torresea cearensis*. Resumos do XII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, Curitiba-PR, p.021.

LEAL, L.K.A.M. ; SILVEIRA, E.R. ; CANUTO, K. M. ; MATOS, F.J.A. ; VIANA, G.S.B. Overview of Chemical, Toxicological and Pharmacological Studies with *Amburana cearensis* A.C. Smith and its Active Constituents.. In: Govil, J.N.; Singh, V.K.; Arunachalam, C.. (Org.). Recent Progress in Medicinal Plants. 1 ed. Houston: Studium Press, LLC, 2006, v. 11, p. 333-353.

LEAL, L.K.A.M. ; COSTA, K. ; CANUTO, K. M. ; SILVEIRA, E.R. ; VIANA, G.S.B. Efeito relaxante muscular do isocampferídio em traquéia isolada de cobaia-possível mecanismo de ação.. In: XVIII SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 2004, Manaus-AM. XVIII SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 2004.

LIPWORTH BJ, Kaliner MA, LaForce CF, Baker JW, Kaiser HB, Amin D, et al. Effect of ciclesonide and fluticasone on hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in adults with mild-to-moderate persistent asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2005;94(4):465-72.

LIST PH, Schimdt PC 1989. *Phytopharmaceutical Technology*. Boca Raton: CRC.

LIU C. L., Wang J. M., Chu C. Y., Cheng M. T., and Tseng T. H. (2002), *In vivo* protective effect of protocatechuic acid on *tert*-butyl hydroperoxide-induced rat hepatotoxicity. *Food Chem. Toxicol.* **40**, 635- 641.

MAIA, G. N.; *Caatinga: Árvores e Arbustos e Suas Utilidades*, D & Z Ed.: São Paulo, 2004.

MALLOL J, Solle D, Asher I, Clayton T, Stein RT, Soto-Quiroz M, et al. Prevalence of asthma symptoms in Latin America. *Pediatric Crit Care Med* 2001;30(4):439-44.

MASTERS, K. **Spray drying handbook**. Londres: Longman Scientific and Technical, 1991. 725p.

MASTERS, K, *Spray Drying Handbook*, 4^aed., George Godwin, London, 1985.

MASTERS, K., *Spray Drying handbook*, George Godwin, Ltd., London, 3 ed., 1979.

MATOS FJA 2000. *Plantas medicinais – Guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil*, 2 edição: Imprensa universitária da UFC, Fortaleza.

MATOS, F.J.A. 1998. *Farmácias Vivas*. 3^a ed., Edições UFC, Fortaleza.

MATOS, F.J.A.; 1998. *Introdução à Fitoquímica Experimental*; 2^aed. UFC, Fortaleza, CE.

MIDDLETON Jr E., Kandaswami C., and Theoharides T. C. (2000), *The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer*. *Pharmacol. Rev.* **52**, 673-751.

MIGUEL, M. D.; MIGUEL, G. O. *Desenvolvimento de fitoterápicos*. São Paulo: Robe, 1999.

MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G.; GOMES, E. C. Produção piloto de xarope de guaco, *Mikania glomerata* Sprengel. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 12., 1992, Curitiba.

MIGUEL, M. D.; Zanin, S. M. W.; MIGUEL, O. G.; ROZE, A. O.; OYAKAWA, C. N.; OLIVEIRA, A. B. O cotidiano das farmácias de manipulação. *Visão Acadêmica*, v. 3, n. 2, p. 103-108, jul.-dez. 2002.

MONTGOMERY, D. C. **Design and Analysis of Experiments**. 6. ed. New York: J. Wiley, 2005.

MORS, W.B., RIZZINI, C.T., PEREIRA, N.A., *Medical of plants Brazil*. Reference Publications. Inc Alagonac. Michigan, 2000.

NETO B. B., SCARMINIO I.S., BRUNS R. E., *Como Fazer Experimentos*, 2° edição, Campinas, SP, Editora Unicamp, p. 80-402, 2003.

OLIVEIRA, F., AKISUE, G., AKISUE, M.K. *Farmacognosia*. São Paulo: Editora Atheneu, 1998.

PENNA C., Marino S., Vivot E., Cruan~ es M. C., Munoz J. D., Cruan~ es J., Ferraro G., Gutkind G., and MartinoV. (2001), Antimicrobial activity of Argentine plants used in the treatment of infectious diseases. Isolation of active compounds from *Sebastiania brasiliensis*. *J. Ethnopharm.* **77**, 37-40.

PEREIRA, B. M. R., GONÇALVES, L. C., PEREIRA, N. A., “*Abordagem farmacológica de plantas recomendadas pela medicina folclórica como anti-*ofídicas* III. Atividade antidermatogênica*”, Congresso Brasileiro de Plantas Medicinais, Curitiba, 1992, Anais. Curitiba, Universidade Federal do Paraná, pg. 1, 1992.

PRESCOTT, J. K., BARNUM, R. A. Sobre a fluidez do pó. *Pharmaceutical Technology*, Brasil, p.124-156, ut, 1997

PETROVICK, P.R., orgs. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 2.ed. Florianópolis. UFSC; Porto Alegre: UFRGS, 2000. cap.15, p.291-320.

PETROVICK, P.R.; JACOB, M.; GAUDY, D.; BASSANI, V.L.; GUTERRES, S.S. Influence of Adjuvants on the in vitro Dissolution of Hydrochlorothiazide from Hard Gelatine Capsules. *Int. J. Pharm.*, v. 76, p. 49-53, 1991.

PETROVICK, P.R.; LIMA NETO, S. A. Determinação das características de intumescimento de adjuvantes. *Cad. Farm.*, v.7 (Supl.), p. L.58-L.60, 1991.

PETROVICK, P.R.; LIMA NETO, S.A.; JECKEL, L.C. Swelling of Adjuvants: Methodological Influences. In: 1993 AAPS ANNUAL MEETING, 1993, Orlando. *Pharm. Res.* v.10,n.10, p. S-35, 1993.

PETROVICK, G. F. Desenvolvimento e avaliação tecnológica de granulado revestido contendo produto seco por spray drying de *Achyrocline satureoides* (LAM.) D.C. - Compositae (Marcela), Porto Alegre: Curso de Pós-Graduação em Farmácia da UFRGS, 2006. Dissertação (Mestrado em Farmácia)

PRESCOTT, J.K; BARNUM, R.A. Sobre a fluidez de pós. *Pharm. Technol.*, v.4, n.6, p.16-30, 2000.

RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, Amsterdam, v.39, p.603-613, 2001.

REMILI, H, BOUSSARD, P., E DEVLEESCHOUWER, M., Microbiology Quality os spray-dried Pharmaceutical Plants Extracts, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. I, p. 265-268, 1994.

ROBBERS, J.E.; SPEEDIE, M.K.; TYLER, V.E. *Pharmacognosy and pharmacobiotechnology*.

RUNHA, F.P.; Cordeiro, D.S.; PEREIRA, 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 the drying operation. *Trans. Inst. Chemical Engineers Part C: Food and Bioproducts Processing*, 79, p.160–168, 2001.

SALGADO R.N. Ketylin F. Migliato; Raquel R.D. Moreira; João C.P. Mello; Luis V.S. Sacramento; Marcos A. Corrêa; Hérida. Controle da qualidade do fruto de *Syzygium cumini* (L.) Skeels. *Rev. bras. farmacogn.* vol.17 no.1 João Pessoa Jan./Mar. 2007.

SAMPAIO, I.L., LEAL, L.K.A.M. ; VIANA, G.S.B., MORAES, M.O., MORAES, M. E.A., Toxicologia clínica do xarope de cumaru (fitoterápico)- estudo piloto com 12 voluntários. In: XVI SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 2000, Redipe, PE.

SHARAPIN, N.; ROCHA, L.M.; CARVALHO, E.S.; LÚCIO, E.M.R. DE A.; SANTOS, E.V.M. DOS; ALMEIDA, J.M.L. de. Fundamentos de tecnologia de produtos fitoterápicos. 12. ed. Rio de Janeiro: Merck e Co, 2000. p.87-89.

SCHEFFER, M. C. Roteiros para estudos agrônômicos das plantas medicinais selecionadas pela fitoterapia do SUS-PR/CEMEPAR. *OB Infarma*, Curitiba, v. X/XI, n. 2/1, 1992.

SCHENKEL EP, GOSMANN G, PETROVICK PR. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES CMO et al *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Florianópolis e Porto Alegre: Editoras da UFSC e UFRGS, 1999.

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.M.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.;

SCHENKEL EP, GOSMANN G, PETROVICK PR. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.M.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 4. Ed. Porto Alegre: Editora da UFSC, p.301-330, 2002.

SCHULZ, V.; HÄNSEL, R.; TYLER, V.E. Medicinal plants, phytomedicines, and phytotherapy. In: _____. *Rational phytotherapy: a physician's guide to herbal medicine*. 4.ed. New York, Berlin: Springer, 2001. cap.1, p.1-39.

SCHMIDT, S. R.; LAUNSBY, R.G. **Understanding industrial designed experiments**. 4. ed. Colorado Springs: Air Academy Press & Associates, 2000.

SENNA EL, Petrovick PR, Ortega GG, Bassani VL 1997. Preparation and characterization of spray-dried powders from *Achyrocline satureioides* (Lam.) Dc extracts. *Phytother Res* 11: 123-127.

SONAGLIO, D. Padronização de Extrato hidroalcoólico das Sumidades Floridas de *Achyrocline satureioides* (LAM.) D.C. - Compositae (Marcela), Porto Alegre: Curso de Pós-Graduação em Farmácia da UFRGS, 1987. 167f. Dissertação (Mestrado em Farmácia)

SHU, Y.-Z. Recent natural products based drug development: a pharmaceutical industry perspective. *J. Nat. Prod.*, Columbus, v.61, p.1053-1071, 1998.

SILVA, C.R., SANT'ANNA. A.P., Uma aplicação do planejamento de experimentos na indústria farmacêutica. Universidade Federal Fluminense, 2007.

SIMÕES C.M.O, Santos RI, Falkenberg MB 2003. Introdução à análise fitoquímica. In: Simões, CMO, et al. *Farmacognosia: da planta ao medicamento* 3. Ed Porto Alegre: UFRGS, Florianópolis: UFSC, p.229- 245.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. *Farmacognosia da planta ao medicamento*. 4. ed., Porto Alegre: Ed. da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2001

SOARES LAL 2002. *Obtenção de comprimidos contendo alto teor de produto seco por aspersão de Maytenus ilicifolia*

SOKHANSANJ, S.; Jayas, D.S. (1995) Drying of Foodstuffs. Chapter 19 In: Handbook of Industrial Drying, second edition, Vol. 1, Ed. A. S. Mujumdar, pag. 589-626.

SOUSA, M. P., MATOS, M.E.O., MATOS, F.J.A, Constituintes Químicos de Plantas Medicinais Brasileiras. Impr. Universitária/ UFC, Fortaleza, 1991, pág. 416.

SOUZA KCB, Petrovick PR, Bassani VL, Ortega GG 2000. The adjuvants aerosil 200 and gelita-sol-p influence on the technological characteristics of spray-dried powders from *Passiflora edulis* var. *fl. avicarpa*. *Drug Dev Ind Pharm* 26: 331-336.

SOUZA, C.R.F.; OLIVEIRA, W.P. Spouted bed drying of *Bauhinia forficata* Link extract: The effects of feed atomizer position and operating conditions on equipment performance and product properties. *Brazilian Journal Chemical Engineering*, 26 (2), p.239-47, 2005.

TEIXEIRA, H.F. *Avaliação da influência de adjuvantes farmacêuticos sobre características físicas, químicas, tecnológicas e farmacológicas de extratos secos nebulizados de Achyrocline satureioides (Lam.) DC. Compositae - marcela*. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, 1996. Dissertação de Mestrado.

THALBERG, K; LINDHOLM, D.; AXELSSON, A. Comparison of different flowability tests for power for inhalation. *Power technology*, v.146, p.206-13, 2004.

TIMBERS, B. J., MATHEW, A., e KOHLER, H. M., *Real Time Gas Moisture Based Control Approaches for Food Drying Processes*, Dewcon Instruments Inc., 1997.

TSENG T. H., Kao T. W., Chu C. Y., Chou F. P., Lin W. L., and Wang C. J. (2000), Induction of apoptosis by *Hibiscus* protocatechuic acid in human leukemia cells via reduction of retinoblastoma (RB) Phosphorylation and Bcl-2 expression. *Biochem. Pharmacol.* **60**,307-315.

TSENG T. H., Wang C. J., Kao E. S., and Chu C. Y. (1996), *Hibiscus* protocatechuic acid protects against oxidative damage induced by *tert*-butylhydroperoxide in rat primary hepatocytes. *ChemBiol. Interactions* **101**, 137-148.

TYLER, V.E. Natural products and medicine: an overview. In: BALICK, M.J.; ELISABETSKY, E.; LAIRD, S.A., eds. *Medicinal resources of the tropical forest, biodiversity and its importance to human health*. New York: Columbia University Press, 1996. p.3-10. (Biology and resource management series).

UNITED states pharmacopeia 31. Ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2008.

WANCKINSKI, B. J.; FELIPE, F. D.; CARDOSO, M. L. C.; CAVALCANTI, O. A. Desenvolvimento de comprimidos de AAS 500 mg: influência do amido 1500 a compressão direta. *Acta Scientiarum*, v.24 n.1.p. 649-55, 2002.

WEESE, D. L., 1998, Conducting process validations with confidence, **Medical Device and Diagnostic Industry**, Vol. 20, pp. 107-112.

WENDEL, S., e CELIC, M., Uma Visão Geral sobre o Uso da tecnologia de Spray-drying, *Pharmaceutical echnology*, abril, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *WHO monographs on selected medicinal plants*. Geneva: Organização Mundial de Saúde, 1999. 2v.

