



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
POS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO E INOVAÇÃO  
TECNOLÓGICA EM MEDICAMENTOS**

**SANDRA MIRANDA ARARUNA**

**DESENVOLVIMENTO DO EXTRATO SECO PADRONIZADO POR *SPRAY DRYING* DE *Amburana cearensis* A. C. Smith (CUMURU): OTIMIZAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA**

**FORTALEZA  
2013**

**SANDRA MIRANDA ARARUNA**

**DESENVOLVIMENTO DO EXTRATO SECO PADRONIZADO POR *SPRAY DRYING* DE *Amburana cearensis* A. C. Smith (CUMURU): OTIMIZAÇÃO, PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento e Inovações Tecnológicas em Medicamentos, Universidade Federal do Ceará, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Desenvolvimento e Inovações Tecnológicas em Medicamentos.

Orientadora: Profa. Dra. Luzia Kalyne Almeida MoreiraLeal

**FORTALEZA  
2013**

**SANDRA MIRANDA ARARUNA**

**DESENVOLVIMENTO DO EXTRATO SECO PADRONIZADO POR *SPRAY DRYING* DE *Amburana cearensis* A. C. Smith (CUMURU): OTIMIZAÇÃO, PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA**

Esta Tese foi submetida como parte dos requisitos necessários á obtenção do GRAU DE DOUTOR em Desenvolvimento e Inovações Tecnológicas em Medicamentos, 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 tese é permitida, desde que seja feita de acordo com as normas da ética científica.

Aprovada em 03/12 / 2013

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal  
(Orientadora)

---

Dr. Kirley Marques Canuto  
(Embrapa Agroindústria Tropical)

---

Profa. Dra. Maria Elenir Nobre Pinho Ribeiro  
(Instituto Federal do Rio Grande do Norte)

---

Prof. Dr. Alejandro Pedro Ayala  
(Universidade Federal do Ceará)

---

Prof. Dr. Angelo Roncalli da Silva Araújo  
(Universidade de Fortaleza -UNIFOR)

**A Deus, que é fonte infinita em minha vida!!!**

Aos meus pais (*in memorium*), 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 a tantas pessoas maravilhosas.*

A DEUS, provedor da minha existência

O meu agradecimento especial será para meus pais que por vontade divina não está comigo fisicamente nesse momento ímpar da minha vida, foram muito momentos ausência em busca desta conquista, contudo sou eternamente grata por não terem colocado nenhum empecilho na conquista deste objetivo. Painho e Mainha saudades infinitas somente Deus em minha vida para abrandar este sentimento.

A Profa. Dra. Kalyne Leal, pela sua orientação, empenho, confiança, paciência e amizade na realização desse trabalho;

Aos professores participantes da banca examinadora pelo tempo, pelas valiosas colaborações e sugestões.

A Profa Célia Praça a quem muito me incentivou para esta conquista, pela enorme apoio, pela amizade e carinho.

Aos Professores do Curso de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos pelos ensinamentos e contribuições científicas no decorrer da minha formação.

Aos professores Osvaldo de Freitas e Luiz Alexandre Freitas e o técnico José Maria (USP- Ribeirão Preto) pela colaboração no desenvolvimento de parte do trabalho experimental com a *Amburana cearensis* imprescindível para conclusão da pesquisa objeto desta tese.

A Funcionária e amiga da Pós-Graduação, Raimundinha, pela ajuda, amizade, presteza e atenção.

Aos Funcionários da Farmácia-Escola, pelo convívio agradável e as gentilezas, em particular ao Beto, Elton e Jurandir que não mediram esforços para me ajudar nessa empreitada;

Ao apoio, amizade e companheirismo compartilhados pelos amigos do curso de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos - UFC e do CEFAC-UFC: Suzana, Nathália, Bianca, Amanda, Luri, Tálysson, Anderson, Talita, Taiana, Moises, Aline, Larissa, Jonas, Carla, Silésia, Elizama, Angelo, Taiana, Raoni, Saul.

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.

À Aline, Amanda, Bianca, Nathália, Taiana, e Suzana, pela amizade e conselhos. Obrigada pelas conversas confortantes durante os momentos de aflição, pelo carinho, incentivo e companheirismo.

Ao Sr. Ivomar e à Elita, por serem prestativos e estarem sempre esbanjando simpatia.

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

*Amburana cearensis* (Fabaceae) é uma árvore silvestre, típica da caatinga nordestina, conhecida popularmente como cumaru ou imburana-de-cheiro. Sua casca do caule é utilizada na medicina tradicional principalmente no tratamento da asma, tosse e bronquite. Estudos químicos e farmacológicos têm permitido caracterizar o cumaru, com definição de princípios ativos, como a cumarina e o amburosídeo A, e do seu potencial anti-inflamatório, antioxidante e relaxante do músculo liso traqueal de roedores. Diante do exposto o objetivo do presente estudo foi prosseguir os estudos farmacêuticos com a casca do caule de *Amburana cearensis* relacionado ao desenvolvimento e a caracterização do extrato seco por *spray drying* de *Amburana cearensis*, incluindo validação de método analítico e avaliação farmacológica não clínica. Inicialmente, foi desenvolvido método para quantificação dos teores dos marcadores químicos, Amburosídeo A (AMB) e cumarina (CM), por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD). O método foi validado (Brasil, ANVISA RE 899, 2003), com estabelecimento dos seguintes parâmetros de performance: especificidade, linearidade, precisão, exatidão e avaliação da robustez. Na etapa seguinte foram investigadas a influência de alguns parâmetros (temperatura do ar de entrada: 100°C, vazão de alimentação: 1l/h e taxa de fluxo de ar: 40l/h) no processo de secagem do extrato etanólico de cumaru por *spray-drying* com auxílio do planejamento fatorial  $2^3$  empregando como resposta: concentração dos marcadores, umidade e rendimento do processo. O método selecionado produziu um extrato com o melhor teor de marcadores (AMB:  $74.54 \pm 1.45$  e CM:  $26.23 \pm 1.20$  mg/g extrato), teor de umidade aceitável e um máximo rendimento ( $41.10 \pm 1.45$  %). Ademais, o presente extrato foi submetido a novos ensaios para caracterização tecnológica (higroscopicidade, atividade da água, propriedades reológicas, morfologia, tamanho de partícula e avaliação microbiológica). O extrato seco de cumaru (100; 200 and 400  $\mu\text{g/mL}$ ) padronizado mostrou atividade sequestradora do radical DPPH. Por outro lado, ao contrário da vitamina C (padrão) o extrato não foi capaz de sequestrar o ânion superóxido. O tratamento de camundongos com extrato de cumaru (100 e 200 mg/Kg, v.o.) reduziu significativamente as duas fases de nocicepção induzida pela formalina, apresentando melhores respostas na 2ª fase (inflamatória). Os resultados obtidos no presente estudo permitiram agregar novas tecnologias na produção de produtos derivados de *Amburana cearensis*, produzindo um extrato seco por *spray-drying* padronizado (CLAE-DAD), incluindo caracterização tecnológica, além da comprovação de propriedades farmacológicas do produto que são de interesse para o tratamento de doenças inflamatórias, como a asma.

**Palavras chaves:** *Amburana cearensis*, amburosídeo, cumarina, *spray-drying*, antioxidante, antinociceptivo

## ABSTRACT

*Amburana cearensis* (Fabaceae) is a wild tree, typical of the northeast “Caatinga” popularly known as “cumaru” or “imburana-de-cheiro”. Its trunk bark is used in traditional medicine mainly in the treatment of asthma, cough and bronchitis. Chemical and pharmacological studies have allowed us to characterize the Cumaru with the definition of active principles, such as cumarina and amburosídeo A and its potential anti-inflammatory, antioxidant and relaxant of the tracheal smooth muscle of rodents. Therefore, the aim of the present study was to continue the pharmaceutical studies with the trunk bark of *Amburana cearensis* related to the development and the characterization of the dry extract through spray drying of *Amburana cearensis*, including the validation of the analytical method and non-clinical pharmacological evaluation. Initially, a method was developed for the qualification of the levels of the chemical markers, Amburosídeo A (AMB) and cumarina (CM) through liquid chromatography of high efficiency connected to the detector of photodiode arrays (CLAE-DAD). *The method was validated (Brasil, ANVISA RE 899, 2003), with the establishment of the following parameters of performance: specificity, linearity, precision, accuracy and robustness.* In the following stage, the influence of some parameters was investigated (temperature of air entrance: 100°C, feed flow rate: 11/h and Air flow rate: 401/h) in the process of the drying of ethanolic extract from cumaru through spray-drying with the assistance of factorial 2<sup>3</sup> planning using as a response: concentration of the markers, unit and efficiency of the process. The selected method produced an extract with the best level of markers (AMB: 74.54±1.45 and CM: 26.23±1.20 mg/g extract), level of acceptable humidity and a maximum performance 941.10±1.45%). Furthermore, the present extract was submitted to new tests for technological characterization (hygroscopicity, water activity, rheological properties, morphology, particle size and microbiological evaluation). The dry extract of cumaru (100; 200 and 400 µg/mL) standardized showed expelling activity of the radical DPPH. On the other hand, contrary to vitamin C (standard) the extract was not able to expel the Superoxide anion. The treatment of mice with cumaru extract (100 and 200 mg/Kg, v.o.) significantly reduced the two phases of nociception induced by formalin, presenting better responses in the second stage (inflammatory). The obtained results in the present study allowed us to join new technologies in the production of derived products from *Amburana cearensis*, producing a dry extract through standardized spray-drying (CLAE-DAD) including technological characterization, in addition to the evidence of pharmacological properties of the product which are of interest to the treatment of inflammatory diseases, such as asthma.

**Key Words:** *Amburana cearensis*, amburosídeo, cumarina, spray-drying, antioxidant, antinociceptive.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Formação de partícula por secagem por aspersão.....	25
<b>Figura 2</b>	<i>Amburana cearensis</i> A. C. Smith silvestre (A): caule mostrando o ritidoma esfoliativo (B) e folhas (C). <i>Amburana cearensis</i> cultivada (D). Fotos: Plantas Medicinais da Caatinga: Atividades Biológicas e Potencial Terapêuticas.....	28
<b>Figura 3</b>	Metabólitos secundários obtidos das cascas do caule de <i>A. cearensis</i> . 1. cumarina , 2. sacarose, 3. afrormosina, 4. ácido vanílico , 5. ácido protocatecuico, 6. isocampferídio, 7. campferol, 8. $\beta$ -sitosterol glicosilado, 9. estigmasterol glicosilado, 10. amburosídio A, 11. amburosídio B, 12. quercetina, 13. 4'-metoxifisetina.....	29

### LISTA DE FIGURA REFERENTE AO ARTIGO: DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A HPLC-PDA METHOD FOR STANDARDIZATION OF EXTRACTS FROM *Amburana cearensis* A.C. SMITH

<b>Figure 1</b>	Chemical structures of amburoside A and coumarin in <i>Amburana cearensis</i> .....	40
<b>Figure 2</b>	View $\lambda_{max}$ chemical markers amburoside A (AMB) and coumarin (CM) from <i>Amburana cearensis</i> by HPLC-PDA including HPLC-PDA chromatograms of AMB and CM (retention time: 4.7 and 10.0 min, respectively) (panel A). HPLC-PDA chromatograms of chemical markers (AMB and CM) and dry extract from <i>Amburana cearensis</i> .....	45

### LISTA DE FIGURA REFERENTE AO ARTIGO: INFLUENCE OF PROCESS CONDITIONS ON THE PHYSICOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF CUMARU (*Amburana cearensis*) POWDER PRODUCED BY SPRAY DRYING

<b>Figure 1</b>	Chromatogram profile of the ethanol extract, SDP, amburoside and coumarin from <i>Amburana cearensis</i> .....	54
<b>Figure 2</b>	Spray Dryer Powder from <i>Amburana cearensis</i> : response surfaces for coumarin (a) and amburoside A (b) for optimization of drying conditions.....	55

**LISTA DE FIGURA REFERENTE AO ARTIGO:**  
**TECHNOLOGICAL CHARACTERISTICS AND AND EVALUATION**  
**PHARMACOLOGICAL OF THE DRY EXTRACT FROM *Amburana cearensis***  
**(CUMARU) BY *SPRAY DRYING***

- Figure 1** Chromatogram profile of the Extract Dried Powder (SDP) and chemical markers AMB and CM from *A. cearensis*.....67
- Figure 2** Moisture uptake of spray-dried powder (SDP) of *Amburana cearensis* exposed to atmospheres of 8% (A), 32,5% (B) and 75% (C) of RH.....72
- Figure 3** Photomicrographies of the granules of the SDP of *Amburana cearensis*.....72
- Figure 4** Distribution and particle size of the dry extract by *spray drying* of *Amburana cearensis* by Laser Diffraction.....73

**LISTA DE TABELA REFERENTE AO ARTIGO:**  
**TECHNOLOGICAL CHARACTERISTICS AND AND EVALUATION**  
**PHARMACOLOGICAL OF THE DRY EXTRACT FROM *Amburana cearensis***  
**(CUMARU) BY *SPRAY DRYING***

<b>Tabela 1</b>	Legislações relacionadas ao desenvolvimento de fitoterápicos no Brasil.....	18
<b>Tabela 2</b>	Classificação dos ensaios segundo sua finalidade.....	21
<b>Tabela 3</b>	Parâmetros que devem ser estudados na validação do procedimento analítico, de acordo com sua finalidade e categoria.....	22

**LISTA DE TABELA REFERENTE AO ARTIGO: DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A HPLC-PDA METHOD FOR STANDARDIZATION OF EXTRACTS FROM *Amburana cearensis* A.C. SMITH**

<b>Table 1</b>	Statistical analysis of variance (ANOVA) for amburoside A assay linearity.....	47
<b>Table 2</b>	Statistical analysis of variance (ANOVA) for coumarin assay linearity.....	47
<b>Table 3</b>	Validation of precision of analytic method of amburoside A and coumarin from <i>Amburana cearensis</i> .....	48

**LISTA DE TABELA REFERENTE AO ARTIGO: INFLUENCE OF PROCESS CONDITIONS ON THE PHYSICOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF CUMARU (*Amburana cearensis*) POWDER PRODUCED BY *SPRAY DRYING***

<b>Table 1</b>	Experimental matrix according to 2 <sup>3</sup> factorial design and studied responses.....	55
----------------	---	----

**LISTA DE TABELA REFERENTE AO ARTIGO: TECHNOLOGICAL CHARACTERISTICS AND EVALUATION PHARMACOLOGICAL OF THE DRY EXTRACT FROM *Amburana cearensis* (CUMARU) BY *SPRAY DRYING***

<b>Table 1</b>	Physicochemical characterization of the SDP of <i>Amburana cearensis</i> by <i>spray drying</i> .....	67
----------------	---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABIFISA	Associação Brasileira das Empresas do Setor Fitoterápico,
Suplemento	Alimentar e de Promoção da Saúde
ALT	Alanina transaminase
AMB	Amburosídeo A
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATP	Trifosfato de adenosina
BPF	Boas Práticas de Fabricação
BRA	Brasil
CEPA	Comitê de Ética e Pesquisa Animal
CESAC	Cápsulas do Extrato Seco de <i>A. cearensis</i>
CG	Cromatografia Gasosa
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CM	Cumarina
COFID	Coordenação de Fitoterápicos, Dinamizados e Notificados
COMEPE	Comitê de Ética em Pesquisa Humana
COX-2	Ciclo-oxigenase 2
CP	Consulta Pública
DAD	Detector de Arranjo de Diodos
DL <sub>50</sub>	Dose letal para 50 % dos animais
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio padrão
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazila
DPPH-H	2,2-difenilpicril-hidrazina
DPR	Desvio Padrão Relativo
DV	Droga vegetal
E.P.M.	Erro Padrão da Média
EAG	Equivalentes em Ácido Gálico
EHA	Extrato Hidroalcólico
ESSD	Extrato Seco por <i>Spray Drying</i>
EUA	Estados Unidos das Américas
FDA	Food And Drug Administration
fMLP	N-formil-metionil-leucil-fenilalanina

h	hora
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
HOCl	Ácido hipocloroso
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
ICH	International Conference on Harmonisation
IgE	Imunoglobulina E
IL	Interleucina
IN	Instrução Normativa
INDO	Indometacina
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
GESEF	Gerência de Avaliação de Segurança e Eficácia
LDH	Lactato Desidrogenase
L-NAME	N <sup>G</sup> -nitro-L-arginina metil éster
LPS	Lipopolissacarídeo
LTC <sub>4</sub>	Leucotrieno C <sub>4</sub>
M 1	Maceração 1
M 2	Maceração 2
m/v	Massa por volume
MPO	Mieloperoxidase
MS	Ministério da Saúde
MTT	Brometo de 3[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Reduzida
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Reduzida
NBT	Azul de nitrotetrazólio
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NO	Óxido nítrico
NP	Natural Products
O <sub>2</sub> <sup>·-</sup>	Radical ânion superóxido
OH <sup>·</sup>	Radical hidroxila
OMS	Organização Mundial da Saúde
p/v	Peso por volume
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PGD <sub>2</sub>	Prostaglandina D <sub>2</sub>

PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
PKC	Proteína quinase C
PMA	Forbol-12-miristato-13-acetato
PNPIC	Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
PNPMF	Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RE	Resolução Específica
RNS	Espécies Reativas de Nitrogênio
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
RP-HPLC	Reverse-Phase High Performance Liquid Chromatographic
SDP	Spray Dryer Powder
SEM	Scanning Electron Microscopy
SOD	Superóxido dismutase
SUS	Sistema Único de Saúde
TMB	3,3',3,5 – tetrametilbenzidina
Tr	Tempo de retenção
UV	Ultravioleta
v. o.	via oral
v/v	Volume por volume
VFE1	Volume Expiratório Forçado no primeiro segundo

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
<b>1.1</b>	<b>Desenvolvimento de fitoterápicos: mercado, aspectos regulatórios e tecnológicos.....</b>	<b>16</b>
<b>1.2</b>	<b>Extrato seco obtidos por <i>spray drying</i>.....</b>	<b>24</b>
<b>1.3</b>	<b><i>Amburana cearensis</i> A.C Smith.....</b>	<b>27</b>
<b>1.3.1</b>	<b>Aspectos geográficos, botânicos e etnofarmacológicos da <i>Amburana cearensis</i>.....</b>	<b>27</b>
<b>1.3.2</b>	<b>Estudos Fitoquímicos da <i>Amburana cearensis</i>.....</b>	<b>28</b>
<b>1.3.3</b>	<b>Estudos Toxicológicos e Farmacológicos de <i>Amburana cearensis</i></b>	<b>30</b>
<b>1.3.4</b>	<b>Estudos Farmacêuticos da <i>Amburana cearensis</i>.....</b>	<b>33</b>
<b>2</b>	<b>RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>34</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>36</b>
<b>3.1</b>	<b>Objetivo Geral.....</b>	<b>36</b>
<b>3.2</b>	<b>Objetivos Específicos.....</b>	<b>36</b>

### Capítulo I

<b>4</b>	<b>ARTICLE - DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A HPLC-PDA METHOD FOR STANDARDIZATION OF EXTRACTS FROM <i>Amburana cearensis</i> A.C. SMITH .....</b>	<b>38</b>
----------	--	-----------

### Capítulo II

<b>5</b>	<b>ARTICLE - INFLUENCE OF PROCESS CONDITIONS ON THE PHYSICOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF CUMARU (<i>Amburana cearensis</i>) POWDER PRODUCED BY SPRAY DRYING.....</b>	<b>52</b>
<b>6</b>	<b>TECHNOLOGICAL CHARACTERISTICS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF THE DRY EXTRACT FROM <i>Amburana cearensis</i> (CUMARU) BY <i>SPRAY DRYING</i>.....</b>	<b>58</b>
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>82</b>
<b>8</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>91</b>
<b>9</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....</b>	<b>92</b>



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Desenvolvimento de fitoterápicos: mercado, aspectos regulatórios e tecnológicos.

A indústria Farmacêutica é uma indústria intensiva em Ciência e Tecnologia, cuja inovação é a sua força motriz, que assegura o seu desenvolvimento (QUENTAL *et al.*, 2010). Nesse contexto, observando o cenário nacional, o setor farmacêutico brasileiro é dominado por grandes empresas que, em sua maioria, não operam nas etapas de desenvolvimento, dotando principalmente o papel de utilizadoras da tecnologia (ZUANAZZI e MAYORGA, 2010). Em relação, aos insumos farmacêuticos ativos, o Brasil depende da importação destes, sendo responsável pela fabricação aproximadamente de apenas 2% dos insumos utilizados na fabricação de medicamentos comercializados (ANVISA, 2012). Esse quadro desfavorável vem configurando também na área de fitoterápicos, com dependência da importação de drogas e alto custo para empresas e consumidores (QUENTAL *et al.*, 2010).

Nos últimos anos, o interesse mundial por produtos fitoterápicos tem crescido significativamente em decorrência basicamente do fato desses produtos representarem terapias de menor custo em relação àquelas normalmente oferecidas pela indústria farmacêutica e, por conseguinte apresentaram uma parcela significativa no mercado de medicamentos. E um dos fatores de atração é o ritmo de crescimento das vendas no Brasil, mais de 15% anuais, contra 4% do que evoluem as vendas dos medicamentos sintéticos, sem, contudo deixar de ressaltar a hegemonia brasileira da biodiversidade do mundo que também contribui para este crescimento (CARVALHO *et al.*, 2007; CALIXTO, 2000).

Corroborando com os dados revelados anteriormente (CARVALHO *et al.*, 2007; CALIXTO, 2000) a Associação Brasileira da Indústria Fitoterápica (Abifito) contabilizou que o mercado mundial de fitoterápicos gira em torno de US\$ 40 bilhões, atraindo interesses de grandes indústrias farmacêuticas em investigar o potencial terapêutico de novas moléculas. No Brasil, não existem dados oficiais atualizados, porém, estima-se que esse mercado gira em torno de US\$ 160 milhões por ano (FEBRAFARMA, 2013). A cifra brasileira é pequena se comparada aos valores publicados para a Europa e Estados Unidos no ano de 2000, o equivalente a 8,5 e 6,3 bilhões de dólares, respectivamente (SIMÕES e SHENKEL, 2002).

Diante deste cenário os órgãos de regulação de medicamentos à base de plantas medicinais, Alemanha, Índia, China e EUA, passou normatizar o setor de pesquisa e de produção por meio de Leis, Decretos, Portarias e Resoluções dispondo sobre os requisitos mínimos de produção e controle de qualidade deste tipo de medicamento.

No Brasil o mercado de medicamentos fitoterápicos tem sido regulamentado por meio da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) que criada com a prerrogativa de conceder estabilidade dos dirigentes, independência administrativa e autonomia financeira (BRASIL,1999), todavia o processo de regulamentação iniciou-se em meados da década de 60 sob a responsabilidade da extinta Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária, com a publicação da Portaria nº 22/1967, que dispõe sobre as normas para o emprego de preparações fitoterápicas (BRASIL,1967), com discreta atuação fiscalizatória. Essas normas foram sendo ajustadas ao desenvolvimento científico tecnológico ao longo dos últimos anos e novas resoluções publicadas, considerando as modificações implementadas no país pela Política Nacional de Plantas Medicinal e Fitoterápico (PNPMP) e a Política de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS), ambas publicadas em 2006 (BRASIL, 2006 a, b).

Assim, com a publicação da PNPMF e PNPIC, tornou-se imprescindível a regulamentação dos produtos de origem vegetal, objetivando a regulamentação de toda a cadeia produtiva, incluindo produção, distribuição, manipulação e uso de plantas medicinais e fitoterápicos (CARVALHO *et al.*, 2012; BRASIL, 1967, 2006 a, b). Dessa forma, observa-se o estabelecimento de uma série de resoluções para assegurar a qualidade, a eficácia e a segurança de medicamentos derivados de plantas medicinais, dentre elas estão as Resoluções da Diretoria Colegiada, RDC 10/10 que dispõe sobre a notificação de drogas vegetais, RDC 14/10 que dispõe sobre registro de fitoterápicos e a mais recente RDC 13/13 que trata de Boas Práticas de Fabricação (BPF) para os produtos fitoterápicos tradicionais. Por intermédio da RDC 10/10, a qual dispõe sobre a notificação de drogas vegetais, a ANVISA passou a regular a produção, o comércio e o uso de drogas vegetais, liberando-as para utilização pela população na forma de produtos industrializados, para os quais são estabelecidos e controlados os requisitos de qualidade, segurança e tradicionalidade de uso (CARVALHO *et al.*, 2012; BRASIL, 2010 a).

A RDC 14/10 é a atual legislação que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos, que estabelece os parâmetros de controle de cada etapa da cadeia de

produção das matérias-primas ativas (droga e derivados vegetais) até o produto acabado (fitoterápico). Para o registro, necessita-se de um relatório de produção, de controle de qualidade e de eficácia e segurança. Além da RDC 14/10, existem instruções normativas (IN) que a complementam como a IN nº 5 (11/12/2008), a qual dispõe a lista de medicamentos fitoterápicos de registro simplificado e a IN nº 5 (31/03/2010), que apresenta a lista de referências bibliográficas para avaliação de segurança e eficácia de fitoterápicos (BRASIL, 2008, 2010 b, c).

A RDC 13/13 dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Produtos Tradicionais Fitoterápicos, estabelecendo os requisitos mínimos para garantir a qualidade desses produtos tanto para o seu uso pretendido quanto requerido para notificação ou registro (BRASIL, 2013).

Além dessas, a RE 91/04, que trata das alterações, inclusões, notificações e cancelamentos pós-registro do produto fitoterápico; a RE 899/03, guia para validação de métodos analíticos e o guia da Gerência de Avaliação de Segurança e Eficácia - GESEF, que trata da condução de estudos não clínicos de eficácia e segurança, complementam o corpo regulatório para fins de registro junto à ANVISA de produtos fitoterápicos (BRASIL, 2003, 2004, 2010 d).

Acompanhando o rumo da construção do marco regulatório para medicamentos fitoterápicos, a ANVISA publicou também a Consulta Pública (CP) 85/2010, a qual dispõe sobre boas práticas de armazenamento de plantas medicinais, manipulação e dispensação de preparações magistrais e oficinais de plantas medicinais e fitoterápicos em Farmácias Vivas (BRASIL, 2010e). A publicação dessa CP foi baseada na necessidade de regulamentação das Farmácias Vivas, criadas pela Portaria MS 886/2010, que as definiu como aquelas instituídas no âmbito do SUS, que realizam as etapas de cultivo, coleta, armazenamento de plantas medicinais, manipulação e dispensação de preparações magistrais e oficinais de plantas medicinais e fitoterápicos (CARVALHO *et al.*, 2012; BRASIL, 2010f). A **Tabela 1** apresenta as normas vigentes para medicamentos fitoterápicos no Brasil, incluindo aquelas que auxiliam o cumprimento das exigências para registro do fitoterápico na ANVISA.

**Tabela 1** – Legislações relacionadas ao desenvolvimento de fitoterápicos no Brasil

<b>Norma vigente</b>	<b>Finalidade</b>
RE 899/03	Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos
RE 91/04	Guia para realização de alterações, inclusões, notificações e cancelamentos pós-registro de fitoterápicos
IN nº 5 (11/12/2008)	Lista de medicamentos fitoterápicos de registro simplificado
IN nº 5 (31/03/2010)	Lista de referências bibliográficas para avaliação de segurança e eficácia de fitoterápicos
RDC 10/10	Dispõe sobre a notificação de drogas vegetais
RDC 14/10	Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos
RDC 13/13	Dispõe sobre as boas práticas de fabricação de produtos tradicionais fitoterápicos
Guia-GESEF	Guia para a condução de estudos não clínicos de segurança necessários ao desenvolvimento de medicamentos
CP 85/10	Dispõe sobre as boas práticas de armazenamento, manipulação e dispensação de preparações magistrais e oficinais de plantas medicinais e fitoterápicos em Farmácias Vivas
Portaria MS 886/10	Institui a Farmácia Viva no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS)

CP = Consulta Pública; GESEF = Gerência de Avaliação de Segurança e Eficácia; IN = Instrução Normativa; RDC = Resolução da Diretoria Colegiada; RE = Resolução Específica; MS = Ministério da Saúde; SUS = Sistema Único de Saúde.

Diante do exposto, torna-se imprescindível o desenvolvimento de estudos farmacêuticos visando à produção de fitoterápicos a luz das exigências da regulamentação atual - RDC 14/10 (BRASIL, 2010). No entanto, a indústria farmacêutica nacional vem encontrando dificuldades para registrar estes medicamentos, onde frequentemente são relacionadas à segurança e eficácia, relatório de estabilidade, cumprimento de exigências e controle de qualidade que estão ordenadas por maiores causas de indeferimentos de registros de fitoterápicos relacionadas à comprovação da segurança e eficácia do produto, ao estudo de estabilidade e principalmente ao cumprimento das exigências do controle de qualidade (PERFEITO, 2012).

- *Aspectos tecnológicos no desenvolvimento de matérias-primas ativas e fitoterápicos*

As plantas medicinais e seus conhecimentos tradicionais associados têm importância fundamental para os laboratórios farmacêuticos no desenvolvimento de

novos fármacos. As substâncias naturais ativas podem ser utilizadas como medicamento (fitofármaco), protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos, produtos de partida para a síntese (fármaco semissintético), além de medicamentos elaborados exclusivamente à base de extratos vegetais – medicamentos fitoterápicos. Segundo a ANVISA – RDC N° 14 (BRASIL, 2010) os fitoterápicos são medicamentos obtidos empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Não se considera medicamento fitoterápico aquele que, na sua composição, inclua substâncias ativas isoladas, de qualquer origem, nem as associações destas com extratos vegetais.

Para o desenvolvimento tecnológico de um fitoterápico são necessários estudos prévios em diversas áreas de conhecimento, como estudos botânicos, agrônomo, químico e de atividade biológica, incluindo estudos de segurança e eficácia não clínica e clínica. Nesse contexto, uma das etapas críticas do processo é a produção e o controle de qualidade tanto das matérias-primas quanto do produto acabado. O controle de qualidade de fitoterápicos incluem métodos farmacognósticos, *fingerprint*, análise de marcadores químicos e parâmetros microbiológicos (KROLL E CORDES, 2006; MIGLIATO et al, 2007).

Dentre os métodos analíticos mais empregados no controle de qualidade de fitoprodutos podemos relacionar a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com detector ultravioleta (FAN *et al.*, 2006; XIE *et al.*, 2007; TISTAERT; DEJAEGHER; HEYDEN, 2011). O *fingerprint* de fitoprodutos por CLAE tem sido uma ferramenta muito útil na detecção dos vários compostos presentes nestes produtos, que foi introduzido e aceito pela OMS (Organização Mundial da Saúde, 1991), ANVISA (National Health Agência Nacional de Vigilância de Brasil, 2010) e outras autoridades, como uma estratégia para a avaliação de medicamentos à base de plantas. Estudo recente (HOLANDA, 2011) realizado pelo nosso laboratório em parceria com o Departamento de Química/UFC permitiu a detecção simultânea de cinco novas moléculas bioativas, sendo elas: *Sodium Erysovin 15-O-Sulfate*, *Erysovine 15-O-Sulfate*, *16-O-b-D-Glucopyranosyl Coccoline* e *Sodium Erysovine N-Oxy-15-O-sulfate* e *erysodine* presente na casca do caule do mulungu (*Erythrina velutina*), planta amplamente utilizada no Nordeste no tratamento de problemas neurológicos, e com comprovada ação no sistema nervoso central (VASCONCELOS et al, 2004). Alguns fitoterápicos, como o iberogast (*Iberis amara*,

*Melissa officinalis*, *Matricaria recutita*, *Carum carvi*, *Mentha x piperita*, *Angelica archangelica*, *Silybum marianum*, *Chelidonium majus* e *Glycyrrhiza glabra*) tem sido caracterizado pelo menos em parte com a determinação de seu perfil cromatográfico com identificação de terpenos, bisabolol, bisaboleno, beta-cariofileno, alfa e beta felandrenos, alfa-pineno, (WEGENER,2006). Contudo, é importante destacar que para que um método analítico seja empregado, por exemplo, no monitoramento do processo de produção de um medicamento, é necessária a validação deste.

A validação de um método é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento e transferência. Para registro de novos produtos, todos os órgãos reguladores do Brasil e de outros países exigem a validação de metodologia analítica e, para isso, a maioria deles tem estabelecido documentos oficiais que são diretrizes a serem adotadas no processo de validação (RIBANI *et al.*, 2004). Um processo de validação bem definido e documentado oferece às agências reguladoras evidências objetivas de que os métodos e os sistemas são adequados para o uso desejado.

A necessidade de se mostrar a qualidade de medições químicas, através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade, está sendo cada vez mais reconhecida e exigida. Dados analíticos não confiáveis podem conduzir a decisões desastrosas e a prejuízos financeiros irreparáveis. Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve sofrer uma avaliação denominado validação (RIBANI *et al.*, 2004).

Existe um grande número de normas nacionais e internacionais, bem como estudos científicos publicados na área de medições químicas e afins, nas quais há a exigência da validação dos métodos e processos analíticos. No Brasil, a ANVISA e o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial) são os órgãos habilitados para avaliar a competência dos ensaios analíticos em laboratórios.

Assim, os parâmetros de validação preconizados pelos organismos de acreditação e regulação nacional e internacional, como ICH (International Conference on Harmonisation) e o INMETRO para comprovação a validação são: especificidade e seletividade, faixa de trabalho e faixa linear de trabalho, linearidade, sensibilidade, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão e tendência (*bias*), precisão, robustez e incerteza de medição. A ANVISA, por meio da RE nº 899/2003, realizou uma categorização dos parâmetros de performance de acordo com a finalidade do

ensaios (**Tabela 2**), e relacionar os parâmetros que necessitam ser determinados durante o processo de validação (**Tabela 3**).

**Tabela 2** – Classificação dos ensaios segundo sua finalidade

<b>Categoria</b>	<b>Finalidade do teste</b>
<b>I</b>	Determinação de princípios ativos em produtos farmacêuticos ou matérias-primas
<b>II</b>	Testes quantitativos ou ensaios limite para determinar impurezas de degradação em produtos farmacêuticos e matérias-primas
<b>III</b>	Testes de performance (ex. dissolução, liberação de ativo)
<b>IV</b>	Teste de identificação

Fonte: BRASIL, 2003

**Tabela 3** – Parâmetros que devem ser estudados na validação do procedimento analítico, de acordo com sua finalidade e categoria

<b>Parâmetro</b>	<b>Categoria I</b>	<b>Categoria II</b>		<b>Categoria III</b>	<b>Categoria IV</b>
		Quantitativo	Ensaio limite		
<b>Especificidade</b>	Sim	Sim	Sim	1	Sim
<b>Linearidade</b>	Sim	Sim	Não	1	Não
<b>Intervalo</b>	Sim	Sim	1	1	Não
<b>Repetibilidade</b>	Sim	Sim	Não	Sim	Não
<b>Precisão intermediária</b>	2	2	Não	2	Não
<b>Limite de detecção</b>	Não	Não	Sim	1	Não
<b>Limite de quantificação</b>	Não	Sim	Não	1	Não
<b>Exatidão</b>	Sim	Sim	1	1	Não
<b>Robustez</b>	Sim	Sim	Sim	Não	Não

Fonte: BRASIL, 2003

**NOTA:** Destaque à categoria a em que se enquadram as amostras avaliadas neste trabalho. 1: Pode ser necessário, dependendo da natureza do teste específico; 2: se houver comprovação de reprodutibilidade não é necessária a comprovação de precisão intermediária.

O processo de validação de um método deve estar descrito em um procedimento, e os estudos para determinar os parâmetros de desempenho devem ser realizados com equipamentos e instrumentos dentro das especificações, funcionando corretamente, adequadamente calibrados e validados. Do mesmo modo, o operador que realiza os estudos deve ser competente na área de estudo e precisa ter conhecimento suficiente sobre o trabalho sendo capaz de tomar as decisões apropriadas durante a realização do estudo.

Com o cumprimento da etapa de validação analítica, o processo de desenvolvimento de fitoterápico avança na produção de matérias-primas, incluindo

droga vegetal e produtos derivados (ex.: extratos vegetais), e produto acabado (fitoterápico) padronizados, sendo todas as etapas do processo monitoradas pelo teor de marcador (es) químico(s) por método analítico validado.

A necessidade crescente da Indústria Farmacêutica para a otimização de produtos e processos, minimizando custos e tempos, maximizando rendimento, produtividade e qualidade de produtos, tem levado profissionais a buscarem ferramentas técnicas sistemáticas de planejamento de experimentos. Nesse contexto, a metodologia do planejamento fatorial, associada à análise de superfícies de respostas, é uma ferramenta fundamentada na teoria estatística, que fornece informações seguras sobre o processo, minimizando o empirismo que envolve técnicas de tentativa e erro (BOX *et al.*, 1978; RODRIGUES e LEMMA, 2009).

Até recentemente a investigação e desenvolvimento de novas formulações e/ou processos eram realizados pela técnica de tentativa e erro, e, com avaliação de apenas um fator por vez. Esta forma de abordagem é reconhecidamente dispendiosa considerando o custo e o tempo necessários para sua execução. Além disto, a ausência de uma análise estatística adequada pode facilmente conduzir a conclusões equivocadas, especialmente quando diferentes variáveis interagem (MYERS; MONTGOMERY, 1995; WHERLÉ *et al.*, 1993; WHERLÉ *et al.*, 1995). Nesse contexto surgem ferramentas estatísticas como o desenho fatorial estatístico, que é uma ferramenta amplamente utilizada para o planejamento, execução e informação sobre experimentos. É utilizado para determinar a influência de variáveis no processo de desenvolvimento de um produto, e desta forma monitorá-los e otimizá-los por meio do estudo das respostas empregada no planejamento.

O planejamento de experimentos foi idealizado por Ronald A. Fisher (1935), que durante alguns anos foi responsável pela estatística e análise de dados na Estação Agrícola Experimental em Londres - Inglaterra. Fisher foi quem desenvolveu e usou pela primeira vez a técnica de ANOVA (*Analysis of variance*) como ferramenta primária para a análise estatística do projeto experimental. Outros autores que contribuíram de maneira significativa para a evolução das técnicas sobre o projeto de experimentos são: Yates, Box, Bose, Kempthorne e Cochran (MONTGOMERY, 1991).

Segundo MONTGOMERY (1991), as técnicas de planejamento e análise de experimentos são utilizadas basicamente para melhorar as características de qualidade dos produtos ou processos de fabricação, reduzir o número de testes e otimizar o uso de recursos da empresa (material, tempo dos funcionários, disponibilidade de



equipamentos, etc). BUTTON (2001) descreve que esse objetivo geral pode ser dividido em outros objetivos secundários:

- a) Identificar as variáveis (fatores de controle) do processo que mais influem nos parâmetros de resposta de interesse;
- b) Atribuir valores às variáveis influentes do processo de modo que a variabilidade da resposta de interesse seja mínima ou que o valor do resultado (parâmetro de qualidade) seja próximo do valor nominal;
- c) Atribuir valores às variáveis influentes do processo de modo que o efeito das variáveis não controláveis seja reduzido.

Desta forma, no desenvolvimento de formulações farmacêuticas e nos seus processos de fabricação há o envolvimento de muitas variáveis, o que torna sugestiva a utilização de técnicas de otimização, como por exemplo, os desenhos experimentais (ROTHÄUSER; KRAUS; SCHMIDT, 1998; LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001) com produtos farmacêuticos, à semelhança do que ocorre com outras indústrias como alimentos, tintas e plásticos. Uma das técnicas do planejamento experimental estatístico é conhecida como mistura, onde vários componentes são misturados e a influência de cada componente é investigada nas propriedades da mistura final(CORNELL, 1990; ERIKSSON; JOHANSSON; WIKSTRÖN, 1998).

Recentemente (FONSECA, 2009), o nosso laboratório avaliou a influências de alguns fatores (tempo de maceração, proporção droga: solvente e teor alcoólico do solvente extrator) sobre a produção do extrato das folhas de chambá (*Justicia pectoralis*) empregando um planejamento fatorial  $2^3$ . Nesse estudo foi observado que a proporção droga: solvente e teor alcoólico do solvente extrator afetaram o rendimento dos marcadores químicos (cumarina e umbeliferona) nos extratos produzidos. Por outro lado, o tempo de extração não interferiu significativamente no processo.

## **1.2 Extrato seco obtidos por *spray drying***

Extratos segundo a Farmacopéia Brasileira (2010) é descrito como uma preparação de consistência líquida, sólida ou intermediária, obtida a partir de material animal ou vegetal. Os extratos vegetais (seco, líquido, moles e semi-sólidos) tem sido uma das principais formas de produtos derivados empregado no desenvolvimento de fitoterápicos (BONATI, 1980), e um dos mais utilizados pela indústria farmacêutica

multinacional tem sido os extratos secos, como *Ginkgo biloba*, *Hipericum perforatum*, *Achyrocline satureioides*, *Maytenus ilicifolia*, *Phyllanthus niruri*. Estudo realizado por Carvalho et al (2008) mostrou que no Brasil até o ano de 2008, dos 512 medicamentos fitoterápicos registrados na ANVISA, mais de 70% apresentavam-se sob a forma farmacêutica sólida (CARVALHO *et al.*, 2008).

Os extratos secos são preparações obtidas pela eliminação total da fase líquida, e podem ser obtidos através de alguns métodos como por secagem em pressão atmosférica ou reduzida, por liofilização ou por nebulização (*spray drying*). Devem apresentar uma umidade residual máxima de 5 % (DEUTSCHES, 1992). Os extratos secos, quando comparados aos extratos líquidos e semi-sólidos, apresentam vantagens que incluem a maior estabilidade química, físico-química e microbiológica, mais fácil padronização, manipulação mais simples, maior concentração de compostos ativos e mais elevada capacidade de transformação em diferentes tipos de formas farmacêuticas sólidas, bem como melhor homogeneidade e distribuição dos constituintes da preparação, conferindo a forma final maior garantia da dose administrada (LIST e SCHMIDT, 1989; SONAGLIO *et al.*, 2003).

O processo de secagem por *spray drying* consiste em pulverizar o produto dentro de uma câmara submetida a uma corrente controlada de ar quente, e dessa maneira se consegue uma evaporação dos solventes, em geral água, obtendo-se uma separação ultra-rápida dos sólidos e solúveis contidos, com a mínima degradação do produto a secar, terminando esse processo com a recuperação do produto já em pó, (MASTERS, 1985).

Os fundamentos de como ocorre o processo de secagem por aspersão pode ser descritos em três fases. Na primeira fase, o fluído é disperso como gotículas, produzindo uma grande área superficial. Na segunda, ocorre contato destas com uma corrente de ar aquecido, havendo transferência de calor. Na terceira etapa acontece a evaporação do solvente e a formação da partícula sólida (**Figura 1**) (NONHEBEL; MOSS, 1971; MASTERS, 1985; BROADHEAD *et al.*, 1992; SHAW, 1997; RANKELL *et al.*, 2001).



(adaptada de CAO *et al.*, 2000)

**Figura 1** - Formação de partícula por secagem por aspersão

Vários estudos têm empregado esta técnica de secagem no desenvolvimento de extratos secos a partir de plantas medicinais que ocorrem no Nordeste, como aroeira-da-praia (*Shinus terebenthifolius Raddi*) (VASCONCELOS *et al.*, 2005) e quebra-pedra, *Phyllanthus niruri* (SOUZA *et al.*, 2009).

Embora os produtos secos por *spray drying* possam ser empregados como forma farmacêutica final, diversas pesquisas têm demonstrado que os mesmos também podem ter aplicação vantajosa como produtos intermediários no desenvolvimento de formas sólidas derivadas, como é o caso de granulados e comprimidos (COUTO, 2005; SOARES, 2002; DE SOUZA, 2000; DE SOUZA *et al.*, 2005).

Petrovick (2006) produziu granulados de macela (*Achyrocline satureioides*) empregando o extrato seco da planta obtido por *spray drying* como matéria-prima ativa. No presente trabalho a preparação dos granulados a partir deste extrato seco por aspersão, através do método de desagregação por via seca, originou grânulos com forma irregular, superfície rugosa, mas com melhor fluxo e melhores características de compactabilidade. O extrato seco por aspersão foi caracterizado como um pó fino, composto por pequenas partículas esféricas com superfície rugosa e porosa. O fator de Hausner, índice de Carr e o índice de densificação das partículas foram,

respectivamente, 1,23, 18,9% e 27,2 mL, caracterizando-o como um pó com fluxo pobre e de baixa densidade. Estudos realizado por Carvalho (1997) mostrou o desenvolvimento de produtos secos nebulizados de *Maytenus ilicifolia* enquanto que Da Silva (2007) desenvolveu estudos para avaliação tecnológica e atividade antioxidante de produtos secos por spray-drying de *Ilex paraguariensis*. Ademais, estudos realizados por DE SOUZA e colaboradores (2005) mostrou estabilidade dos comprimidos revestidos por película contendo alta concentração de produto seco por aspersão de *Phyllanthus niruri*.

Nos últimos dez anos aproximadamente têm sido realizados pelo nosso grupo de pesquisa estudos agronômicos, químicos, farmacológicos e farmacêuticos com a casca do caule de *Amburana cearensis* (cumaru), vislumbrando a validação científica do uso medicinal desta planta no tratamento da asma, e o desenvolvimento de um fitoterápico padronizado com tecnologia agregada.

### **1.3 *Amburana cearensis* A.C Smith**

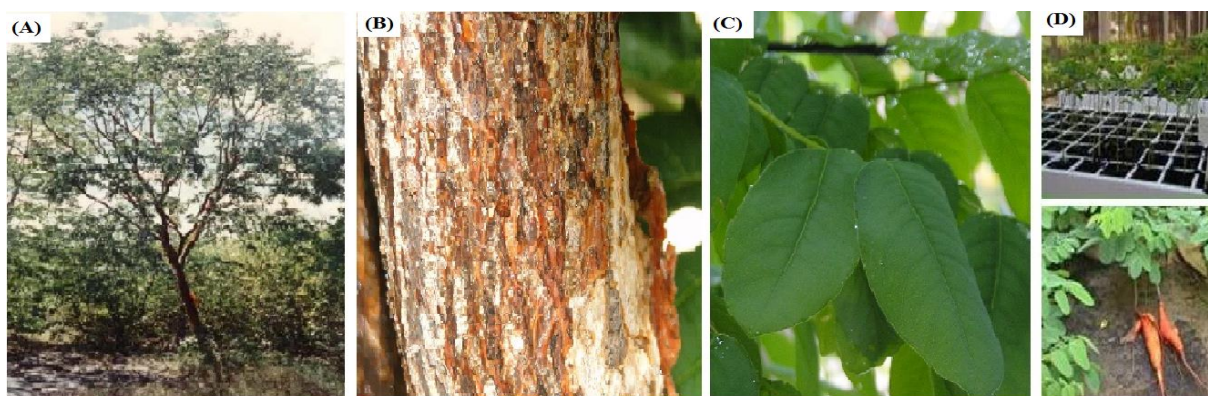
#### **1.3.1 Aspectos geográficos, botânicos e etnofarmacológicos da *Amburana cearensis***

O táxon *Amburana* é formado por apenas duas espécies, *Amburana acreana* Ducke e *Amburana cearensis* A. C. Smith, as quais possuem grande importância econômica e medicinal. Enquanto que a primeira espécie apresenta-se na forma arbórescente de alto fuste, ocorrendo em matas altas e fechadas, a *A. cearensis* assume a forma arbustiva de fuste curto, predominando em formações vegetais tropicais e subtropicais secas (CANUTO, 2007).

Considerada uma planta nativa da caatinga nordestina, *A. cearensis* é também encontrada nos estados de Minas Gerais, Espírito Santo, Tocantins e da região Centro-Oeste. Por outro lado, a *Amburana acreana* tem sua distribuição restrita ao sudoeste da floresta amazônica (Rondônia, Acre e Amazonas). Há registros de sua ocorrência em outros países como no norte da Argentina, sul da Bolívia e nordeste do Paraguai e Peru (LEITE, 2005).

*A. cearensis* pertence à família Fabaceae, também conhecida como Leguminosae, e recebe diferentes designações populares como amburana, baru, cumaru-do-ceará, cumaru-das-caatingas, imburana-de-cheiro, louro-ingá, umburana, angelim, cerejeira-rajada, cumaré, roble criollo, tumi e palo trébol (CANUTO, 2007).

A planta apresenta porte regular, podendo atingir até 10 m de altura nas regiões da caatinga e até 20 m na zona da mata. Os espécimes jovens têm suas folhas compostas, pinadas, com 5 a 9 pinas, alternas, longo-pecioladas, imparipenadas e raras vezes paripenadas na mesma muda. O pecíolo é de coloração verde, piloso, com pulvino. Os folíolos são curto-peciolados, elípticos, com base obtusa e ápice agudo, margem inteira, nervação peninérvea evidente na face abaxial, ao contrário da adaxial e apresentam pelos simples. Os cotilédones, quando caem, deixam cicatriz no caule (ALMEIDA *et al.*, 2010; CUNHA; FERREIRA, 2003). Possui tronco cuja parte externa se solta em camadas finas (descasca), formando grandes manchas vermelho pardacentas e lisas. Flora em setembro e, dois meses depois, tem boa produção de frutos (vagens curtas). As sementes, em número de uma por fruto, são achatadas, oleaginosas, manchadas de marrom e branco e têm aroma forte agradável de cumarina. O mesmo cheiro, embora mais fraco, está presente em todas as outras partes da planta (MATOS, 2002). A **Figura 2** apresenta a espécie silvestre de *A. cearensis* e as diferentes partes da planta.



**Figura 2** - *Amburana cearensis* A. C. Smith silvestre (A): caule mostrando o ritidoma esfoliativo (B) e folhas (C). *Amburana cearensis* cultivada (D). Fotos: Plantas Medicinais da Caatinga: Atividades Biológicas e Potencial Terapêuticas.

Fonte: Leal *et al* (2013)

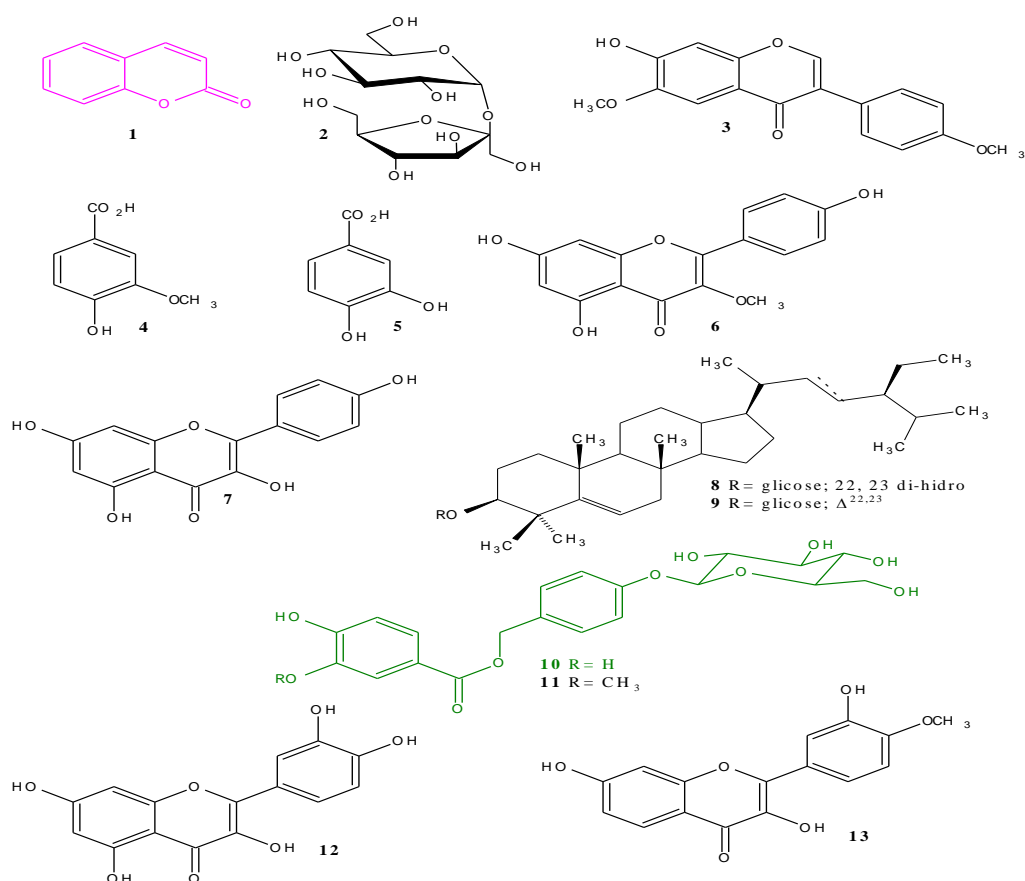
### 1.3.2 Estudos Fitoquímicos da *Amburana cearensis*

Em virtude do difundido uso de *A. cearensis* para fins terapêuticos, tornou-se indispensável à realização de estudos científicos que justificassem sua indicação para o tratamento de afecções respiratórias. Assim, desde o início dos anos de 1980, estudos químicos e farmacológicos têm sido realizados, visando o aproveitamento desta planta para fins medicinais.

O conhecimento fitoquímico de *A. cearensis* está praticamente restrito ao estudo dos constituintes químicos da casca do caule, em razão de esta parte ser utilizada medicinalmente, tendo revelado a presença de cumarina (1) e compostos fenólicos, sobretudo flavonoides como isocampferídio (2), o flavonoide majoritário; campferol (3); quercetina (4); 4'-metoxi-fisetina (5); afrormosina (6); 7-hidroxi-8,4'-dimetoxi-isoflavona (7) e os biflavonóides amburanina A (8) e B(9); ácido protocatecuico (10) e ácido vanílico (11); glicosídeos fenólicos, como amburosídeo A (12) e B (13) e esteróides glicosilados bsitosterol (14) e estigmasterol (15) (Silveira; Pessoa, 2005). Além disso, 24-metilenocicloartanol (16) e 3,4-dimetoxi-cinamato de metila (17) já foram relatados (BASTOS, 1983) (**Figura 3**).

Das cascas do caule da planta coletada no município de Quixeramobim-CE, foram isoladas várias substâncias, como cumarina (1,2-benzopirona), isocampferídio (5,7-dihidroxi-2-(4-hidroxifenil)-3-metoxi), fisetina (3,5,3',4'-tetrahidroxiflanona), alfalona (6-hidroxi-4',7-dimetoxiisoflavona) e o glucosídeo fenólico, amburosídeo A (4-(O-β-Dglucopiranosil)-hidroxi-7-(3',4'-dihidroxi-benzoil)-benzilálcool) (CANUTO, 2002;2007). Das cascas do caule do cumaru coletado na Bolívia, Bravo e colaboradores (1999) isolaram além da cumarina os amburosídeo A e B (**Figura 3**). Dentre esses compostos serão investigados no presente estudo a cumarina e o amburosídeo A. O amburosídeo A (0,3 %) foi selecionado ao lado da cumarina (0,2 %) por está entre os compostos bioativos majoritários presentes nas cascas do caule do cumaru (CANUTO *et al.*, 2002; 2004).

O amburosídeo A e B, compostos glucosídicos 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).



**Figura 3** - 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.  $\square$ -sitosterol glicosilado, 9. estigmasterol glicosilado, 10. amburosídio A, 11. amburosídio B, 12. quercetina, 13. 4'-metoxifisetina.

### 1.3.3 Estudos Toxicológicos e Farmacológicos de *Amburana cearensis*

O estudo toxicológico agudo do extrato hidroalcoólico (EHA) não-padronizado das cascas do caule de *A. cearensis*, administrado por via oral ou intraperitoneal em ratos, mostrou a baixa toxicidade da planta. Na avaliação toxicológica do EHA com doses repetidas, realizada pela administração diária do produto por via oral durante 30 dias (via oral) a ratos de ambos os sexos, observou-se na avaliação bioquímica do sangue um aumento significativo no nível da alanina transaminase (ALT), bem como de neutrófilos, estando este último efeito possivelmente relacionado a um quadro inflamatório agudo, desenvolvido durante o estudo (LEAL *et al.*, 2003). O aumento no nível de ALT, promovido pelo EHA em ratos, está possivelmente relacionado à presença de cumarina na planta, considerando que estudos anteriores (CARLTON *et al.*,

1996; LAKE, 1999; COHEN, 1979) demonstraram o potencial hepatotóxico desta molécula em roedores. Prosseguindo os estudos de segurança de *A. cearensis*, mostrou-se que a administração diária deste extrato não interferiu na gestação, bem como no desenvolvimento da primeira e segunda geração de ratos (LEAL *et al.*, 2000).

Estudos toxicológicos, *in vitro*, com as moléculas isoladas da casca de caule de *Amburana cearensis* mostraram que, dentre as moléculas investigadas (campferol, isocampferídio, ácido protocatecuico e amburosídio A), o campferol e o isocampferídio (3-metilflavonol) foram citotóxicos para algumas linhagens de células tumorais, bem como para larvas de ouriços (*Lytechinus variegatus*), enquanto o ácido protocatecuico apresentou atividade hemolítica. Não se observaram efeitos tóxicos para o amburosídio A (COSTA-LOTUFO *et al.*, 2003). As conclusões desse estudo foi ratificado por estudos mais recentes (LEAL *et al.*, 2005; LEAL, 2006), quando o amburosídio A não interferiu na viabilidade tanto de células mesencefálicas quanto de hepatócitos de ratos. Por outro lado, nesse mesmo estudo o isocampferídio reduziu significativamente a viabilidade das células hepáticas de ratos, na concentração de 100 µg/mL; entretanto, Banskota e cols. (2000) mostraram efeito hepatoprotor dessa molécula, em células de camundongos.

Estudo toxicológico (SÁ-LEITÃO, 2009) preliminar do extrato seco padronizado de *A. cearensis* mostrou que a administração diária deste produto, por via oral na dose de até 750 mg/kg, durante 30 dias, não induziu alterações nos parâmetros bioquímicos e hematológicos, em ratos, ratificando a relativa segurança da planta determinada anteriormente (LEAL *et al.*, 1997).

Os estudos farmacológicos da cumarina, de uma fração flavonoídica e do extrato hidroalcoólico obtido a partir da casca do caule da *Amburana cearensis* realizados por Leal e colaboradores (1995; 1997) mostraram atividade anti-inflamatória determinada por modelos de edema de pata, induzido por carragenina ou dextrano em ratos, e da peritonite induzida por carragenina, também em ratos. Tanto o extrato, quanto a cumarina e a fração flavonoide, que possui como composto majoritário o isocampferídio, mostraram atividade antiedematogênica e reduziram o acúmulo de células inflamatórias no peritônio dos animais. Corroborando estes resultados, mais recentemente Marinho e colaboradores (2003) demonstraram que a administração do EHA de *A. cearensis* (400 mg/kg, v.o. e 200 mg/kg, i.p.) e da cumarina (10 ou 20 mg/kg), em camundongos Balb/c, promoveu efeito antiedematogênico no modelo de



edema de pata, induzido por ovalbumina, além de redução do aumento da permeabilidade capilar, induzida por ácido acético, em camundongos.

Tanto o EHA quanto a cumarina de *A. cearensis* mostraram, de maneira concentração-dependente, efeito relaxante na contração induzida por adrenalina, acetilcolina ou cloreto de bário, em ducto deferente de rato. Além disso, o EHA, a cumarina e a fração flavonoide da planta foram capazes de relaxar o músculo traqueal de cobaia, pré-contraído tanto por carbacol quanto por histamina ou KCl. Entretanto, a cumarina mostrou-se mais potente em relação à fração flavonoide e ao EHA (LEAL *et al.*, 2003).

O estudo empregando o modelo animal edema de pata com o glucosídeo fenólico amburosídeo e o flavonóide isocampferídio A, isolados de *A. cearensis*, apresentou atividade antiinflamatória por meio da redução do edema de pata, induzido por carragenina, dextrana, prostaglandina E<sub>2</sub>, histamina ou serotonina, em camundongos. Tal atividade antiedematogênica foi confirmada pelas atividades dessas moléculas em prevenir o aumento da permeabilidade vascular e o acúmulo de células inflamatórias, nos modelos de edema de pata e peritonite, em camundongos (LEAL, 2006; LEAL *et al.*, 2009). Pelo menos parte desse efeito está relacionada à capacidade destes compostos de modular mecanismos pró-inflamatórios de neutrófilos, particularmente relacionados à ativação destas células e à secreção de mediadores inflamatório, como mieloperoxidase e TNF- $\alpha$  (LEAL *et al.*, 2009). Estudo realizado em traqueia isolada de rato mostrou que o isocampferídio possui atividade músculo-relaxante que está relacionada especialmente a sua habilidade em promover abertura dos canais de K<sup>+</sup> (LEAL *et al.*, 2006a; 2006b). Estes dados ratificam os efeitos farmacológicos da fração flavonóide, determinados anteriormente (LEAL *et al.*, 2003).

Além do exposto acima, o amburosídeo A possui outras atividades farmacológicas, como antioxidante, neuroprotetora, antiprotozoária, antifúngica, antibacteriana e antimalárica, quando se observou que, nesta atividade, o AMB na dose de 50 mg/kg/dia reduziu a parasitemia causada pelo *Plasmodium berghei* (LEAL *et al.*, 2005; LEAL, 2006; LEAL *et al.*, 2008; BRAVO *et al.*, 1999). Já o isocampferídio tem demonstrado também potencial antineoplásico, devido a seus efeitos antiproliferativos contra ovos de ouriço-do-mar (*Lytechinus variegatus*) e linhagens de células tumorais (COSTA-LOTUFO *et al.*, 2003).

Pesquisas realizadas por Trevisan e colaboradores (2003) demonstraram que o extrato etanólico das cascas do caule de *A. cearensis* inibiu a enzima acetilcolinesterase.

Ainda, Figueredo e colaboradores (2012) observaram que o extrato não-padronizado das folhas do cumaru possuía atividade antibacteriana discreta.

O amburosídeo A, glucosídeo fenólico, juntamente com a cumarina constituem os compostos bioativos majoritários, presentes na casca do caule do cumaru (CANUTO & SILVEIRA, 2006) e, além disso, observando especialmente os potenciais anti-inflamatório, antioxidante e/ou efeito relaxante, em músculo liso traqueal de roedor, do amburosídeo A e da cumarina (CASLEY-SMITH *et al.*, 1993; LEAL *et al.*, 2000), essas moléculas foram selecionadas como marcadores químicos para o controle de qualidade de matérias-primas ativas e produto acabado (fitoterápico), obtidos a partir da casca do caule de *A. cearensis*. Neste contexto, foram produzidas cápsulas do extrato seco (*spray drying*) de *A. cearensis* padronizadas (marcadores: cumarina e amburosídeo A) por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), e submetidas a novos testes toxicológicos e farmacológicos, por tratar-se de um novo fitoproduto.

Na avaliação farmacológica *in vivo*, Lopes (2010) mostrou que a cápsula do extrato seco de *A. cearensis* (CESAC) padronizada possui atividade anti-inflamatória, nos modelos experimentais de edema de pata, peritonite e de broncoprovocação induzida por antígeno, em roedores.

Ainda, observando a importância de se estabelecer fonte sustentável desta espécie, visando a seu emprego como matéria-prima farmacêutica, nos últimos anos têm sido realizados estudos agrônômicos, químicos, farmacológicos e farmacêuticos com *A. cearensis* cultivada. (CANUTO, 2010; LEAL *et al.*, 2011; LIMA, 2013). Neste sentido, foram estabelecidas as condições de cultivo da planta, data da coleta, características químicas com identificações de metabólitos secundários majoritários (cumarina e ácido vanílico). Isto, além da determinação das atividades antinociceptiva e anti-inflamatória da planta cultivada, em camundongos.

Estudo clínico do xarope de cumaru (SOARES *et al.*, 2007) realizado com voluntários sadios do sexo masculino revelaram que a administração diária (2 vezes ao dia) do produto, durante 28 dias, causou variações em alguns parâmetros bioquímicos ou hematológicos (hemoglobina, hematócrito, plaquetas, sódio, bilirrubina, ureia), mas esses valores retornaram aos níveis normais, durante ou logo após o estudo. Além disto, as variações observadas mostraram valores que se mantiveram dentro dos limites de normalidade. Assim, os testes clínicos, laboratoriais e eletrocardiográficos, realizados durante o estudo clínico preliminar do xarope de cumaru, não mostraram sinais de toxicidade do xarope.

Estudo clínico aleatório em pacientes asmáticos demonstrou que, durante a administração do xarope de cumaru, a proporção de pacientes com melhora global dos sintomas da asma foi maior do que no grupo placebo. Somente os parâmetros espirométricos: capacidade vital forçada (CVF) e volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF1) mostraram diferença intergrupos, no pós-tratamento. Os testes hematológicos e do soro realizados no pré-tratamento e pós-tratamento com o xarope não mostraram diferenças com significância estatística. Tais resultados evidenciaram que a administração do xarope de cumaru proporcionou melhora significativa dos sintomas da asma, sem causar toxicidade sistêmica (CARVALHO *et al.*, 2012).

#### **1.3.4 Estudos Farmacêuticos da *Amburana cearensis***

Nos últimos anos (2008 – 2013) o nosso laboratório tem investido em estudos farmacêuticos (ARARUNA, 2008; 2013; LEAL *et al.*, 2011) empregando *Amburana cearensis* como matéria-prima para o desenvolvimento de formulações farmacêuticas padronizada sob forma sólida e líquida. Isto, com observância da legislação para registro de fitoterápicos no Brasil (BRASIL, 2010). Neste sentido, inicialmente foi desenvolvido e validado método analítico por CLAE, para identificação e determinação do teor dos marcadores químicos (cumarina e amburosídeo A) em matérias-primas e produto acabado, fitoterápico.

Foram desenvolvidas todas as etapas de produção de um produto intermediário, extrato seco por *spray drying*, desde a padronização da forma de obtenção da matéria prima vegetal ao produto final. A forma de preparação da droga vegetal a partir da casca do caule e caracterização farmacognóstica foi determinada, onde o método de secagem em estufa com circulação e renovação de ar a condição selecionada que apresentou um teor de umidade em torno de 8%, 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) enquanto a concentração dos marcadores químicos Amburosídeo A e Cumarina foi 0.14 mg/mL e 1 mg/mL, respectivamente na droga vegetal (ARARUNA, 2008). Prosseguindo os estudos, foi determinado o método de produção do extrato etanólico com auxílio de um planejamento fatorial  $2^3$ . Nestas, condição foi estabelecida a condição ideal para a produção da solução extrativa que compreende: volume de

extração 200 mL; tempo de maceração/percolação: 24 h e solução extratora: EtOH - 100%).

A análise por CLAE desse produto revelou que o método de secagem, selecionado com auxílio de um planejamento fatorial, não provocou alterações no perfil cromatográfico, em relação à solução extrativa, quando os tempos de retenção do amburosídeo A e da cumarina no extrato etanólico ou extrato seco de *A. cearensis* não houve variação. Além disso, os teores de cumarina e amburosídeo A obtidos mantiveram-se dentro das especificações necessárias para a atividade farmacológica da planta.

## 2. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

*Amburana cearensis* (cumaru) é uma árvore cuja casca do caule tem sido amplamente utilizada nas práticas caseiras da medicina popular nordestina, sob a forma de chá como auxiliar no tratamento de problemas respiratórios como a asma, tosse e bronquite (MATOS,1994). Programas de Fitoterapia no Ceará, incluindo o Estadual (SESA, CE) e municipais como, Fortaleza, Pereiro, Quixeramobim e Viçosa, tem produzido o xarope de cumaru empregando como matéria-prima ativa o extrato hidroalcoólico da planta, não padronizado. O xarope de cumaru tem sido dispensado por unidades de saúde, especialmente relacionadas a atenção básica, e indicado como auxiliar no tratamento da asma. Ainda, o cumaru trata-se uma espécie de interesse para a Indústria Farmacêutica, sendo inclusive comercializado o xarope da planta, mesmo sem registro junto ao órgão competente.

A asma é uma doença inflamatória crônica, sendo considerada um problema mundial de saúde acometendo cerca de 300 milhões de indivíduos. Estima-se que no Brasil exista aproximadamente 20 milhões de asmáticos, se for considerada uma prevalência global de 10%. Em 2011 foram registradas pelo DATASUS 160 mil hospitalizações em todas as idades, dado que colocou a asma como a quarta causa de internações (Ministério da Saúde do Brasil, 2012). Nesse contexto, vale destacar que a farmacoterapia atual para o tratamento da asma têm apresentado efeitos colaterais importantes o que justifica a relevância em investir-se na pesquisa de novos fármacos seguros e eficazes a serem empregados no tratamento da asma (SBPT, 2012; COOKSON, 1999; KUMAR, 2001).

Estudos (LEAL *et al.*, 2003; LEAL, 2006; ALVES, 2010; LOPES, 2010; CANUTO, 2006) realizados pelo nosso grupo de pesquisa têm mostrado a natureza química, a baixa toxicidade e as atividades antinociceptiva, antiinflamatória e antiespasmódica do extrato e constituintes químicos do cumaru em roedores, com correlação entre estas atividades e a presença de cumarina e amburosídio A, compostos majoritários na planta (0,2% e 0,3%, respectivamente) . Além disso, estudos clínicos preliminares têm mostrado a segurança relativa e o potencial antiasmático do cumaru. Neste contexto, nos últimos anos o nosso laboratório tem investido no desenvolvimento de insumos farmacêuticos padronizados produzidos a partir da casca do caule do cumaru, incluindo desde a preparação e caracterização da droga vegetal à otimização na produção do extrato etanólico da planta (ARARUNA, 2009; ARARUNA *et al.*, 2011; LEAL *et al.*, 2011).

Diante do exposto, pretende-se no presente trabalho prosseguir os estudos farmacêuticos com *Amburana cearensis* vislumbrando agregar novas tecnologias aos fitoprodutos obtidos a partir da planta, mas mantendo a segurança e o potencial farmacológico desta para o tratamento de doenças inflamatórias. Para a apresentação do presente estudo, este foi dividido em três artigos:

Artigo 1: Validação de método analítico para a quantificação dos marcadores químicos, amburosídio A e cumarina de *Amburana cearensis* por HPLC-PDA

Artigo 2: Otimização do processo de produção do extrato seco por *spray drying* de *Amburana cearensis*.

Artigo 3: Caracterização do extrato seco de *Amburana cearensis* (*spray drying*) e avaliação farmacológica

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Geral

Realizar o desenvolvimento e a caracterização do extrato seco por *spray drying* de *Amburana cearensis*, incluindo validação de método analítico e avaliação farmacológica não clínica.

#### 3.2 Específicos

- Estabelecer e validar o método para identificação e quantificação de marcadores químicos (AMB e CM) no extrato seco por *spray drying* de *Amburana cearensis* por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodo (CLAE-DAD);
- Realizar delineamento experimental por meio do planejamento fatorial  $2^3$ , para otimização das condições de obtenção do extrato seco por *spray drying* de *Amburana cearensis*.
- Realizar a caracterização tecnológica do extrato seco de *Amburana cearensis*;
- Avaliar a segurança e o potencial antioxidante e antinociceptivo do extrato seco de *Amburana cearensis*;

**DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A HPLC-PDA METHOD FOR  
STANDARDIZATION OF EXTRACTS FROM *Amburana cearensis* A.C. SMITH**

SANDRA M. ARARUNA.<sup>1</sup>, EDILBERTO R. SILVEIRA<sup>2</sup>, KIRLEY M. CANUTO<sup>3</sup>,  
LUZIA KALYNE A. M. LEAL<sup>1</sup>

1. Centro de Estudos Farmacêuticos e Cosméticos - CEFAC, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil. 2. Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil. 3. Embrapa Agroindústria Tropical, Rua Dra. Sara Mesquita, 2270, CEP 60511-110 – Fortaleza, Ceará, Brasil.

Corresponding author:

Dr. Luzia Kalyne A. M. Leal

Centro de Estudos Farmacêuticos e Cosméticos – Laboratório de Farmacognosia.

Departamento de Farmácia. Universidade Federal do Ceará

Rua Capitão Francisco Pedro, 1210. Fortaleza, 60430-270, Brasil

Tel: +55-85-3366-8294; Fax: +55-85-3366-8257

E-mail: [kalyne@ufc.br](mailto:kalyne@ufc.br)

## Abstract

This work describes a validation of new HPLC-RP method for the simultaneous determination of coumarin (CM) and amburoside (AMB) in extracts and tablets of *Amburana cearensis*, a medicinal plant used for treatment of respiratory diseases in northeastern Brazil. The method uses an X-terra C18 column at 40°C temperature using a isocratic elution. The mobile phase consisted of a mixture of acetonitrile and a buffer of ammonium acetate. The DAD detector was set at 261 and 277 nm for AMB and CM respectively. The validation study was performed fulfilling the ANVISA guidelines in order to prove that the new analytical method meets the reliability characteristics, such as specify, linearity, precision, accuracy and robustness. The retention times of the markers for the above conditions were 4.8 and 10.0 minutes for AMB and CM, respectively. The linearity responses were determined by injecting seven different concentrations of the standards, and the obtained linear correlations were: 0.9997 and 0.9994 for AMB and CM, respectively. Accuracy of the method was determined by a recovery study conducted at three different levels, and the average recovery were 101.63 % and 99.73 % for AMB and CM, respectively. Precision was determined for all samples and the results were lower than 5 %. The method was applied for the analysis of ethanol extract 0.15 mg/mL ( $\pm 0.07\%$ ) and 0.025 mg/mL ( $\pm 0.06$ ) dry extract 74.54 mg/g ( $\pm 1.45\%$ ) and 26.23 mg/g ( $\pm 1.20$ ) and tablets 6.23 mg/80mg ( $\pm 1.83\%$ ) and 2.24 mg/80mg ( $\pm 0.38$ ) of *Amburana cearensis* in order to quantify the active principles/markers AMB and CM, respectively, of this products and it was proved to be a suitable for rapid and reliable quality control method.

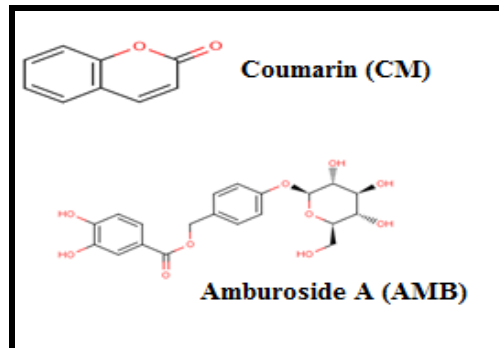
**Keywords:** *Amburana cearensis*, HPLC, Amburoside A, Coumarin, quality control



## INTRODUCTION

*Amburana cearensis* (Fr All) A C Smith (Fabaceae) is a tree common to the Brazilian Northeastern "caatinga" extensively used as medicinally in the treatment of respiratory diseases (1,2,3). Traditionally, the tea from the trunk bark of *A. cearensis* known popularly as "cumaru" is used for the treatment of cough, bronchitis and asthma (4).

The major constituents of the trunk bark from *A. cearensis* are coumarin (1,2 – benzopyrone) and amburoside A (phenol glucoside) (**Figure 1**); others chemical compounds such as protocatechuic acid, isokaempferide, kaempferol, afrormosin and 4'-methoxyfisetin are also reported (5-6). Some studies determined the antinociceptive, anti-inflammatory and antispasmodic effects of hydroalcoholic extract, coumarin and amburoside A obtained from *A. cearensis* trunk bark in rodents (7-8). For this reason, the biological activities showed by plant extract are related partially to the presence of these main compounds/chemical markers. In a pilot clinical trial with mild to moderate asthmatic patients, the syrup prepared with extract of *A. cearensis* reduced obstruction of the airways, with increases in forced expiratory volume, forced vital capacity and maximum expiratory flow (9).



**Figure 1.** Chemical structures of amburoside A and coumarin in *Amburana cearensis*

In Brazil, the use of derived products from medicinal plants has attracted more and more the attention of the pharmaceutical industries for the production of phytomedicines. In this context it's important to establish the toxicological and pharmacological profile as well as the quality control of the whole production process for these medicines (10). To guarantee the constancy of the plant constituents in herbal medicines, analytical methods are helpful ways to reach this goal and the High Performance Liquid Chromatography (HPLC) is a well-established technique and has been used successfully in studies with plants (11).

According to the potential of *Amburana cearensis* to become an herbal medicine, the present work aimed to develop and validate a HPLC-DAD method for the quality evaluation through simultaneous determination of coumarin and amburoside A in derivative products of *A. cearensis*. The parameters evaluated are stated by the Brazilian Agency of Sanitary Vigilance (ANVISA) guidelines in order to achieve an analytical method with suitability, reliability and feasibility (12).

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Plant material**

Trunk bark of *Amburana cearensis* was collected from Quixeramobim, Ceará, Brazil. Exsicates (numbers 837 and 847) of the species were deposited in the Herbário Prisco Bezerra at the Universidade Federal do Ceará. The trunk bark of *A. cearensis* was dried in an oven with circulation and continuous renewal of air during 48 h at a temperature of  $35.0 \pm 5$  °C. After drying, the material was pulverized and the moisture of the moderately coarse powder was of  $8.23 \pm 0.92$  % (13).

### **Chemicals**

Coumarin (Sigma-aldrich; purity: 99.9%); Amburoside A (CENAUREMN/UFC; purity: 97.3%), Ammonium acetate, Methanol, Potassium Phosphate and Acetonitrile, were supplied by Merck Specialty Chemicals, Mumbai, India and Mallinckrodt Baker, United states, USA. All the reagents were of analytical and HPLC grade. All the solutions were prepared in Milli Q water (Millipore, Billerica, MA, USA). The excipient used was Colloidal silicon dioxide (Aerosil 200<sup>®</sup>, Degussa, São Paulo, Brazil).

### **Preparation of the Spray Dryer Powder (SDP) from the EEtOH of *Amburana cearensis***

The extract of *A. cearensis* was prepared by maceration/percolation of trunk bark into EtOH in the proportion of drug:solvent of 1:1. The corresponding extractive solution containing  $1.8 \pm 1.2$ % (w/v) of dry residue was employed to prepare the SDP according to the method previously described (13). The SDP has in its composition colloidal silicon dioxide 30% in the final product. The ethanol extract (EtOHE) was dried using a mini spray-dryer model LM MSD 1.0 (Labmaq do Brazil Ltda, Brazil) with capacity of

drying up to 1.0 L/h. The atomization was carried out with a two-fluid 1.0 mm pneumatic nozzle, and the dryer was operated in concurrent flow.

### **Instrumentation and Chromatographic Condition**

The analytical separation was performed in a high performance liquid chromatographic–diode array system (HPLC-PAD) which consisted of Waters Alliance HPLC system, equipped with a photodiode array detector a model 2996, Rheodyne injector fitted with a 20  $\mu$ L loop and auto injector, column (4.6  $\times$  250 mm, 5  $\mu$ m size) with a C-18 guard column was used. HPLC data acquisition was done by Empower software.

### **High Performance Liquid Chromatography Analysis**

The optimization experiments allowed establishing the best conditions for chromatographic separations of chemicals in *A. cearensis* in shorter time space, using as reference previous methods (7,14).

The principle was made the selection of solvents for the mobile phase composition that best fit the requirements for an ideal chromatographic separation, i.e., to present the resolution chromatographic parameters, tail factor, asymmetry within the limits required by the USP -35 (15). Among the solvents investigated acetonitrile was selected for best symmetry present in the chromatograms related to markers and the addition of 5 mM ammonium acetate mobile phase to improve the tailing factor of the peak of the markers. After the scan has been performed for selecting the wavelength for each chemical marker of *A. cearensis*, the wavelength selected were 261 and 277 nm for CM and AMB, respectively.

### **Preparation of Standard Solutions**

A stock solution of AMB and CM reference standard was prepared by dissolving an accurately weighed 10 mg of AMB and CM in 10 mL of mobile phase in a volumetric flask. Various concentrations of the standard solution were diluted to obtain final concentrations at 78, 98, 195, 290, 390, 448, and 487  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> with mobile phase.

## Preparation of Sample Solutions

Each dry extract from *Amburana cearensis* was accurately weighed the equivalent to about 10 mg of AMB and CM and transferred to a 10 mL volumetric flask. Mobile phase was added to volume (final concentration:  $1.000 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Aliquot of the solution (3.9 mL) was diluted with mobile phase in a 10 mL volumetric flask to make a concentration of  $390 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Prior to analysis, the solutions were filtered through  $0.45 \mu\text{m}$  membrane filters.

## Stability of standard solution

The solutions used to assess the stability of the chemical markers AMB and CM were prepared at a concentration of 100% ( $0.039 \text{ mg / mL}$ ) curve linearity and were then stored in a freezer at  $-20^\circ \text{C}$  and ambient temperature. Each solution was analyzed at 1, 8 and 15 days. Finally, the results obtained were compared to those obtained by the analysis solution of freshly prepared (time zero).

## Validation of the Method

Validation of the analytical method was done according to the International Conference on Harmonization guideline (ICH) (16) and the criteria proposed by the National Agency for Sanitary Surveillance (ANVISA) (12). The method was validated for specificity, linearity, precision, accuracy and robustness.

Specificity for AMB A and CM were determined from the peak purity data derived from the PDA, in association with the software resource provided by Empower software, for AMB A and CM eluting from the HPLC.

For linearity validation, seven of different concentrations (78, 98, 195, 295, 390, 448 and  $487 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) of the standards solution of AMB and CM were injected into the HPLC column and analyzed using an HPLC method as described above. Triplicate analyses were performed for all samples and on 3 different days. The standard curves were analyzed using the linear least-squares regression equation derived from the peaks area from the chromatogram versus concentrations of standards.

For precision validation the same sample of spray-drying powder of *A. cearensis* ( $390 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) in six replicates at the same day, using same instrumentation and by the

same analyst were prepared and analyzed by HPLC system. Concentrations of the two markers (CM and AMB) from the experiments were individually calculated using the linear regression equation of the standard curve. Intermediate precision values were obtained by analyses for different analysts and also per day over 2-days period. Precision was expressed in terms of the relative standard deviation (RSD) and the maximum acceptable value of it was set at 5 %. In the accuracy study, three samples were prepared by adding a known amount of each standard compound, which represented 70%, 100% and 120% of the concentration, into a known amount of dry extract. The recovery was calculated by comparison to a blank sample (dry extract unspiked).

In the robustness assay, the samples of the dry extract were submitted to procedure as described in the preparation of sample solutions section. An aliquot (20  $\mu$ L) was quantified by HPLC using the described method and employing different conditions of the HPLC method to determine the method robustness. Two different values of flow rate (0.9 and 1.1 mLmin<sup>-1</sup>), pH (3.3 and 3.4) as well the analysis in two different chemical nature columns (X-Brigde (RP-18) e X-Terra (RP-18)) were employed to determine the method robustness. The robustness was evaluated in terms of variation in retention time and AMB and CM concentrations. The maximum acceptable value of RDS was set at 5%.

### **Statistical analysis**

The results were expressed as mean $\pm$  standard deviation (SD) and relative standard deviation (RSD). Calculation of RSD was also carried out with Excel 2000 (Microsoft, USA). Linearity analysis was performed according to linear least-squares regression with Excel 2000 (Microsoft,USA). The means were compared using Test-F: compare variances. Differences were considered statistically significant when  $p < 0.05$ .

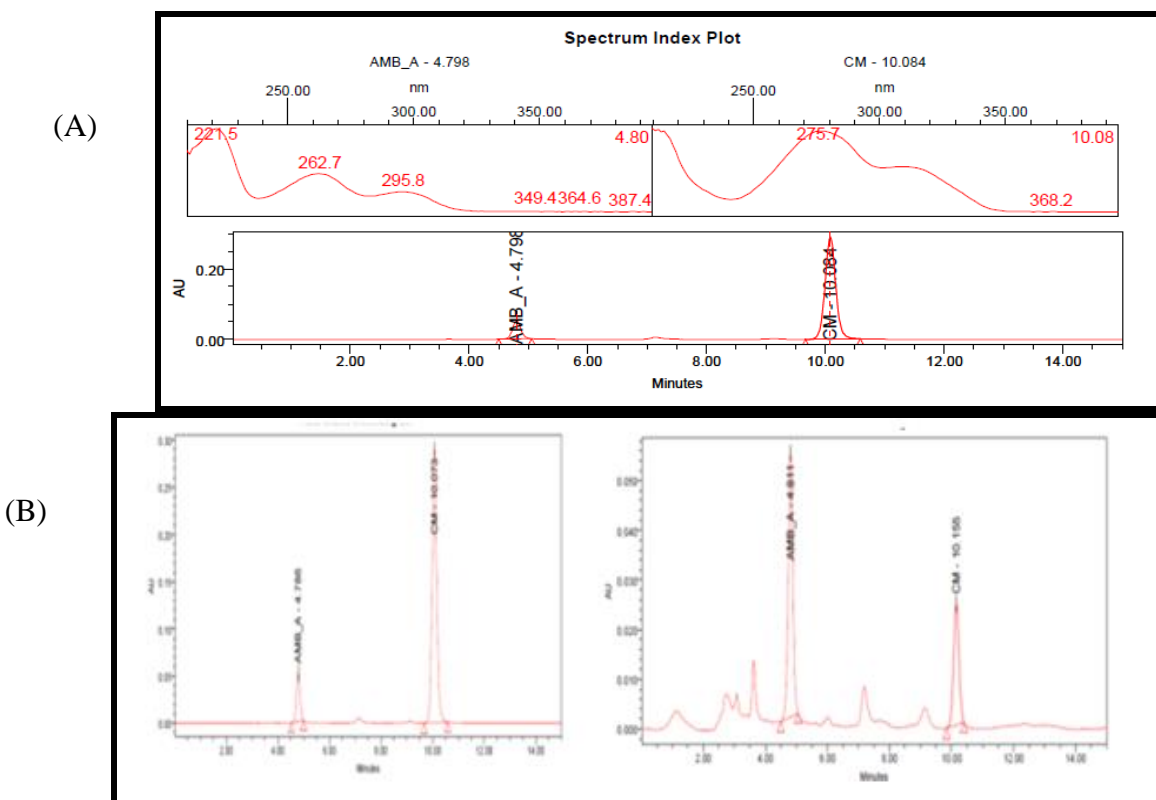
### **Results and Discussion**

Among the main analytical techniques employed today for the quantification of products of plant origin, high performance liquid chromatography is one of the most referenced by the official codes (pharmacopoeias and compendia) for this purpose, because of its precision, accuracy, and especially their rapidity and sensitivity (17). In this regard, this methodology can be employed to monitor the stability of the synthetic

and herbal medicines with the possibility of quantification of degradation products (18-19). In this sense, was developed and validated an analytical method for quantification of chemical markers AMB and CM present in pharmaceutical formulations obtained from *Amburana cearensis*.

Chromatography techniques for separation and analysis of coumarinic plants such as *Justicia pectoralis* and *Mikania glomerata* have been developed (20). Reversed-phase C18 columns were most common and mobile phases usually consisted of an acidic buffer to suppress ionisation of the acidic groups and an organic solvent (commonly methanol or acetonitrile). Recently studies (6,14) developed by our research group used an HPLC method for analysis coumarin, amburoside A, protocatechuic acid and vanillic acid in ethanol extract of *Amburana cearensis* wild and cultivated. For example, Et<sub>3</sub>N - H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (pH = 3) / MeOH was used in a 30 min gradient elution ranging from 20% to 50% MeOH (6).

In the present study the optimization of the chromatographic conditions for HPLC analysis of the dry extract of *Amburana cearensis* allowed to separate, detect and quantify the chemical markers (AMB and CM) with good resolution (resolution value > 1.5). This actual HPLC method included some changes in elution mode (isocratic), wavelength and mobile phase (without the use of phosphate buffer) when related previous method (6) (**Figure 2**).



**Figure 2.** View  $\lambda_{\max}$  chemical markers amburoside A (AMB) and coumarin (CM) from *Amburana cearensis* by HPLC-PDA including HPLC-PDA chromatograms of AMB and CM (retention time: 4.7 and 10.0 min, respectively) (panel A). HPLC-PDA chromatograms of chemical markers (AMB and CM) and dry extract from *Amburana cearensis*.

The stability of the standards solution (AMB and CM) were evaluated at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  and room temperature during 15 days. The results showed that the content of chemical markers stored at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  were stable for 7 days. After this period, the content of actives decreases in until 5% ( $\pm 1.03$ ) e 7% ( $\pm 1.25$ ) at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  or room temperature, respectively. According to the ICH are considered stable samples that obtain miss the content of active less than 2%.

The method was validated for selectivity and specificity, linearity, precision, accuracy and robustness.

The selectivity and specificity of the analytical method was confirmed from the purity angle and the purity threshold of AMB and CM obtained using the Empower software for the standards and for each of the extracts assayed. The response of the UV detector at 261 and 277 nm were linear from 78 to 487  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectively for AMB and CM. The lack of interference in the chromatogram in the time of retention of chemical markers associated with the test of comparison of spectral profiles and assessment of peak purity proves the specificity/selectivity of the method (data not shown).

Linearity was determined for AMB and CM in the concentration range between 78 – 487  $\mu\text{g/mL}$ . Three different calibration curves were recorded for AMB and CM. The regression equation found were  $y = 7\text{E-}08x + 0.0009$  ( $r = 0.9997$ ) and  $y = 0.000000011x + 0.001018711$  ( $r = 0.9994$ ) for AMB and CM, respectively. According Ribani et al(2004) (21) a coefficient of correlation greater than 0.999 is considered as evidence of an ideal fit data for the regression line. Statistical analysis ANOVA showed that F calculated for the linear regression was significant at the 1% level of probability, showing that it is highly likely that there is a strong linear relationship between the y and x values (**Table 1 and 2**).

**Table 1.** Statistical analysis of variance (ANOVA) for amburoside A assay linearity

Sources of Variation	df	SS	MQ	F	F1%
<b>Regression</b>	1	3.1386E+11	3.14E+11	17370.23**	16.26
<b>Residual</b>	5	90344639,6	18068928		
<b>Total</b>	6	3.1395E+11			

\*\*Significant at 1% probability

**Table 2.** Statistical analysis of variance (ANOVA) for coumarin assay linearity

Sources of Variation	df	SS	MQ	F	F%
<b>Regression</b>	1	1.3324E+13	1.33E+13	44855.33**	16.26
<b>waste</b>	5	1485223385	2.97E+08		
<b>Total</b>	6	1.33255E+13			

\*\*Significant at 1% probability

In addition, the correlation coefficients for AMB and CM obtained in the present study were similar to those required by ANVISA ( $r= 0.99$ ), and within the limits set by the FDA ( $r= 0.999$ ) (22). However, according to Pimentel Neto (2004) linearity should not be evaluated only by analyzing the correlation coefficient, the graph of waste according to these authors is of great importance to predict trends in the method (23).

There si due test as described by Taverniers, Loose and Bockstaele, represents the difference between the y values found and predicted by the regression equation generated (24). If the values of residues are randomly distributed, the linearity of the analytical method is confirmed. The graph of waste generated from the data of the present study showed linearity values randomly dispersed along the y-axis, demonstrating the linearity of the method (data not shown).

The interday and intraday precisions of AMB and CM are presented in **Table 2**. The results showed acceptable precision of the method, with CV values lower than 5% (12). Following the spiking of AMB and CM into the dry extract of *A. cearensis* sample solution recoveries for these compounds were examined in order to validate the accuracy of the analytical method used. The results are described in **Table 3**, and a good related recovery rates for the two compounds were from 97.9 to 103.9 % with a coefficient of variation less than 1.6 %. The literature (25) considered recovery values between 90 and 107 % acceptable for quantification of bioactive compounds in medicine.



**Table 3.** Validation of precision of analytic method of amburoside A and coumarin from *Amburana cearensis*

Markers	Theoretical concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	Intra-day precision		Inter-day precision	
		Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	CV (%)	Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	CV (%)
AMB	0.0390	0.0385	$\pm 2.90$	0.038	$\pm 2.35$
CM	0.0390	0.0390	$\pm 0.00094$	0.038	$\pm 1.93$

All values are mean  $\pm$  S.D. obtained by triplicate analyses. All values are mean  $\pm$  S.D. to be obtained by triplicate analyses for 2 days. Coefficient of variation (CV) = (S.D./mean) $\times$ 100%.

The robustness test presented variation in the retention time and concentration of AMB and CM showing that the present method is sensitive to small variations of flow rate and mobile phase composition (data not shown).

## Conclusions

The present analytical method developed has reliability characteristics, such as specificity, linearity, precision and accuracy and can be used for routine quality analysis of simultaneous quantification of two bioactive compounds, amburoside A and coumarin, responsible at least in part for the pharmacological properties of *Amburana cearensis* for the treatment of asthma. In addition, it is important to emphasize that studies like this support the pharmacological studies nonclinical and clinical of herbal medicines.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil), Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP, Brazil) and Banco do Nordeste do Brasil.

**REFERENCES**

1. BRAGA, R. **Plantas do Nordeste especialmente do Ceará**, 3ed., Imprensa Oficial, Fortaleza, Brazil, 1976.
2. LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas** . 2ed. Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum, 544p., 2008.
3. CORRÊA, P.M. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Brasília: Ministério da Agricultura, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, 1984. v. 2., p.475.
4. MATOS, F. J. A. **Farmácias vivas: sistema de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades**. 4ª ed., Fortaleza: Editora UFC, 2002. 267 p.
5. CANUTO K.M, SILVEIRA E.R 2006. Constituintes Químicos da Casca do Caule de *Amburana cearensis* A.C.Smith. *Quím. Nova*, vol.29, No. 6, 1241-1243.
6. CANUTO K.M 2007. **Aspectos químicos do estudo interdisciplinar (Química-Agronomia-Farmacologia) de *Amburana cearensis* A.C. Smith**. Fortaleza. Tese de Doutorado, Programa de Pós-graduação em Química, UFC.
7. LEAL, L. K. A. M., G.S.B; SILVEIRA, E.R., CANUTO, K.M., RIBEIRO, R. A., NECHIO, M., FONTENELE, J. B., 2003. Anti-inflammatory and smooth muscle relaxant activities of the hydroalcoholic extract and chemical from *Amburana cearensis* A.C.Smith. **Phytotherapy Research**, USA, 17:335-340.
8. LEAL, L.K.A.M., SILVEIRA, E.R., CANUTO, K. M., MATOS, F.J.A., VIANA, G.S.B., 2006. 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, v. 11, p. 333-353.
9. CARVALHO, E. M. *et al.* 2012 Efficacy and safety of cumaru syrup as complementary therapy in mild persistent asthma: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. **Braz. J. Pharm. Sci.**, São Paulo, v. 48, n. 4.
10. PINTO, A.C. *et al.* Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. *Quím. Nova*. 2002, vol.25, suppl.1, pp. 45-61
11. WOLFENDER J-L. 2009. HPLC in Natural Product Analysis: The Detection Issue **Planta Med**; 75: 719–734
12. BRASIL. SANITÁRIA, A. N. D. V. Resolução-RE n. 899, de 29 de maio de 2003. Dispõe sobre o Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 02 jun. 2003.

13. ARARUNA S.M 2008. **Desenvolvimento, Padronização (CLAE-DAD) e Avaliação Pré-Clínica do Extrato Seco por spray dried de *Amburana cearensis* A. C. Smith (Cumaru)**. Fortaleza. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, UFC.
14. LEAL, L. K. A. M.; BELARMINO, V.Q; MOURA, R. R.; MOURA, M. L. R.; SILVEIRA, E. R.; VIANA, G. S. B .Validated HPLC-PDA method for the determination of coumarin and AMB 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.**
15. UNITED STATES PHARMACOPEIA 35-NF 29. 2012. Ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention.
16. INTERNATIONAL CONFERENCES ON THE HARMONIZATION (ICH). Validation of Analytical Procedures. Text and Methodology - Q2(R1). Geneva, 2005.
17. WATSON, D.G. High pressure liquid chromatography. In: \_\_\_\_ *Pharmaceutical analysis. A textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists*. 2 ed. **Edinburgh**: Elsevier Churchill Livingstone, 2005. cap. 12. p. 237-274.
18. BITTENCOURT, M. S. **Cefixima: validação de métodos analíticos e estudo preliminar de estabilidade**: 2003. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.
19. QUATTROCCHIO, O. A.; ANDRIZZ, S. A.; LABA, R. F. **Introducción a la HPLC. Aplicación y Práctica**. Argentina: Farro S.A., 1992.
20. FONSECA, F.N.; SILVA, A.H. and LEAL, L.K.A.M.. *Justicia pectoralis Jacq*: Acanthaceae: preparation and characterisation of the plant drug including chromatographic analysis by HPLC-PDA. **Rev. bras. farmacogn.** 2010, vol.20, n.6,pp. 871-877
21. RIBANI, M. *et al.* Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química nova**, v.27, n.5, p.771-780, 2004.
22. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Technical review guide: validation of chromatographic methods. Rockville, 2001.
23. PIMENTEL, M. F.; BARROS NETO, B. Calibração: uma revisão para químicos analíticos. **Química Nova**, v.19, n.3, p.268-277, 1996.
24. TAVERNIERS, I; LOOSE, M. D.; BOCKSTELE, E. V. Trends in quality in the analytical laboratory. II. analytical method validation and quality assurance. **Trends in analytical chemistry**, v.23, n.8, p.535-552, 2004.
25. HUBER, L. Validation of analytical methods: review and strategy. Oberkirch, 2001.



Aop13612

Received 30 Jun 2012  
Accepted 21 Sep 2012**Keywords:**

*Amburana cearensis*  
HPLC  
pharmaceutical technology  
plant extract  
spray-drying

ISSN 0102-695X

## Influence of process conditions on the physicochemical characteristics of cumaru (*Amburana cearensis*) powder produced by spray drying

Sandra M. Araruna,<sup>1</sup> Aline H. Silva,<sup>1</sup> Kirley M. Canuto,<sup>3</sup> Edilberto R. Silveira,<sup>2</sup> Luzia Kalyne A. M. Leal<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Estudos Farmacêuticos e Cosméticos, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, Brazil,

<sup>2</sup>Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Brazil,

<sup>3</sup>Embrapa Agroindústria Tropical, Brazil.

**Abstract:** The aim of the work was to study the spray-drying of ethanolic extract from *Amburana cearensis* (Allemão) A.C. Sm., Fabaceae, in order to obtain powders with better pharmacological and technological properties for herbal medicine. A 2<sup>3</sup> fractional factorial statistical design was used to find adequate spray-drying operating conditions (inlet air temperature; feed flow rate and air flow rate) to produce *A. cearensis* powder with adequate concentration of active principles (amburoside and coumarin), low moisture content and high process yield. The HPLC analyses showed that the spray-drying powder of *A. cearensis* production did not cause alterations in the chromatographic profile when related to the fluid extract. The most significant factor that affected the amburoside concentration was air flow rate, while the concentration of coumarin, a thermolabile molecule, was influenced mainly by inlet air temperature. The moisture content of spray-drying powder of *A. cearensis* varied from 3.72 to 5.85% (w/w), while the maximal process yield was 41.1% (w/w). The present study demonstrates for the first time the best operating conditions to produce *A. cearensis* extract powders that were adequate when related to the coumarin and amburoside concentrations and moisture content. However, additional studies are still needed to improve mainly their technological characteristics.

### Introduction

Cumaru (*Amburana cearensis* (Allemão) A.C. Sm., Fabaceae) is a typical tree from "Caatinga", a kind of vegetation found in the Brazilian semi-arid region. Cumaru is frequently used by the traditional medicine for the treatment of respiratory diseases including asthma. Phytochemical studies of its trunk bark allowed the isolation of several compounds such as isokaempferide, kaempferol, afrormosin, coumarin (CM) and other phenols compounds including amburoside A (AMB) (Canuto & Silveira, 2000; Canuto et al., 2006; Canuto, 2007).

Toxicological study carried out with the extract from the trunk bark of *A. cearensis* administered to rats by the oral route did not show any toxic effects (Leal et al., 2003a). The cytotoxicity of kaempferol, isokaempferide, amburoside A and protocatechuic acid from *A. cearensis* were evaluated on tumor cell lines and on the sea urchin egg development, as well as their lytic properties on mouse

erythrocytes. The results showed that isokaempferide and kaempferol, but not AMB and protocatechuic acid, inhibited the sea urchin egg development as well as tumor cell lines (Costa-Lotufo et al., 2003). Previous studies (Leal et al., 2003b; Leal et al., 2006; Leal et al., 2008) showed that the anti-inflammatory and antioxidant activities of hydroalcoholic (HAE), CM, AMB and/or isokaempferide from *A. cearensis* seem to occur by an inhibitory action on the release of inflammatory mediators, and/or alternatively by interfering with some phase of neutrophil migration into the inflammatory focus. In addition, *A. cearensis*, CM and isokaempferide also have a relaxing activity on rodents' tracheal muscles (Leal et al., 2000; Leal et al., 2006).

Cumaru has a great economical importance in the Northeast Brazil, where syrup of cumaru is the pharmaceutical form produced by the industry using liquid extract as active ingredient. The pharmacological potential of cumaru is related at least in part with the presence of coumarin and amburoside A (chemical markers) in plant.

The chemical and pharmaceutical food industries have been investing substantially in the last few years in the development of dried products mainly by presenting technological advantages in relation to fluid products. One of the most used drying methods has been the spray drying, which can be used on active pharmaceutical raw material drying, including molecules (Sansone et al, 2009), proteins (Gonnisson et al, 2008) and plant extracts (Couto, 2005; Gallo et al, 2011). In addition, this technique has also been used in the development of microparticles or nanoparticles of active principles (Zhao et al., 2011; Sansone et al., 2009).

The drying process by spray drying involves the generation of droplets from solutions (aqueous or organic), suspensions or emulsion, which are immediately transformed into a powder through the action of hot air, for example (Masters, 1991; Gonnisson et al, 2008). The drying method for spray drying is actually considered one of the most important processes for industry, especially because of some advantages presented by this system such as the capability of production of powders with specific size and moisture content, independent of the dryer capacity and of the sensibility to the heat of the product; applicability to thermo labile products and the production of powders with minimum quantity of residual solvent which specifications remain stable during the entire drying process (Masters, 1991; Chan et al., 2008).

Spray drying technique has been extensively used in the development of dried plant extracts both by pharmaceutical industries and by research centers. In this context, among studied species can be related *Rhamnus purshiana* (Gallo et al, 2011), *Phyllanthus niruri* (Couto, 2005), *Achyrocline satureioides* (Petrovick, 2006) and *Ginkgo biloba* (Zhang et al., 2010), which have been used as active raw material in the produce of dried plant extracts. However, the successful development of these products, *i.e.* desired technological characteristics with maintenance of their pharmacological properties, requires a detailed study including selection of suitable drying adjuvant setting and adequate operating conditions. In this context, to meet the requirements of the dried product, close attention must be given to operate variables for spray driers that can significantly influence in the quality of the product such as inlet air temperature, liquid flow rate and air flow rate (Gallo et al., 2011).

Thus, considering the chemical, toxicological and pharmacological characteristics of *A. cearensis*, besides its economic value for pharmaceutical industry, the objective of the present study was to investigate the best operational conditions for the production of *A. cearensis* dried extract in order to obtain a product with better pharmacological and technological characteristics and better process yield.

## Material and Methods

### Plant material

Trunk bark of *Amburana cearensis* (Allemão) A.C. Sm., Fabaceae, was collected from Quixeramobim, Ceará, Brazil. Exsicates (numbers 837 and 847) of the species were deposited in the Herbário Prisco Bezerra at the Universidade Federal do Ceará. The trunk bark of *A. cearensis* was dried in an oven with circulation and continuous renewal of air during 48 h at a temperature of 35.0±5 °C. After drying, the material was pulverized and the moisture of the moderately coarse powder was of 8.23±0.92% (Araruna, 2008).

### Chemicals

Coumarin (Sigma-aldrich; purity: 99.9%); Amburoside A (Cenauremn/UFC; purity: 97.3%); ammonium acetate and acetonitrile were supplied by Merck Specialty Chemicals, Mumbai, India and Mallinckrodt Baker, United states, USA. All the reagents were of analytical and HPLC grade. All the solutions were prepared in Milli Q water (Millipore, Billerica, MA, USA). The excipient used was Colloidal silicon dioxide (Aerosil 200®, Degussa, São Paulo, Brazil).

### Preparation of the Spray Dryer Powder (SDP) from the EEtOH of *Amburana cearensis*

The extract of *A. cearensis* was prepared by maceration/percolation of trunk bark into EtOH in the proportion of drug:solvent of 1:1. The corresponding extractive solution containing 1.8±1.2% (w/v) of dry residue was employed to prepare the SDP according to the method previously described (Araruna, 2008). The SDP has in its composition colloidal silicon dioxide 30% in the final product. The ethanol extract (EEtOH) was dried using a mini spray-dryer model LM MSD 1.0 (Labmaq do Brazil Ltda, Brazil) with capacity of drying up to 1.0 L/h. The atomization was carried out with a two-fluid 1.0 mm pneumatic nozzle, and the dryer was operated in concurrent flow.

### Experimental design

An 2<sup>3</sup> experimental design with center points was used to optimize the production of the SDP from EEtOH of *A. cearensis*. The influence of three variables was investigated (feed flow rate: 0.6, 0.8, 1.0 L/h; air flow rate: 30.0, 35.0, 40.0 L/h and inlet air temperature: 100, 120, 130 °C) on production of SDP, employing as the responses the concentration of CM and AMB, moisture content and process yield. All the experimental runs were performed in randomized order and by triplicate to eliminate possible

sources of bias.

#### The physicochemical characterization of the SDP of *Amburana cearensis*

##### Moisture content (MC)

The SDP of *A. cearensis* moisture content was determined by Karl Fischer method (model DL31, Mettler Toledo). Sample moisture content analysis was performed immediately after the spray-drying step (Farmacopeia Brasileira, 2010). This procedure was repeated three times with three distinct samples and the results are expressed as the mean and coefficient of variation.

##### High Performance Liquid Chromatography analysis

The simultaneous quantification of CM and AMB (chemical markers) in the SDP from EEtOH of *A. cearensis* was determined according to the method validated previously by our laboratory (Araruna et al., 2011).

##### Process yield

Spray drying yield was evaluated through the determination of recovered product given by the ratio between the total recovered product mass and the mass of extract initially fed into the system, and it was expressed by the following equation (Léon-Martinez et al., 2010):

$$y = \frac{(W_2 - W_1) - X_{wb}(W_2 - W_1)}{M_v T_s} \times 100$$

where  $y$  is the powder yield (%).  $X_{wb}$  is the moisture content in wet basis (wb).  $M_v$  is the volume of extract feed (L).  $T_s$  is the content of total solids (g dry matter/L), while  $W_1$  and  $W_2$  are the weight (g) of the powder receptacle before and after spray drying, respectively.

##### Statistical analysis

The data were analyzed with the aid of the program Statistic 6.0. (USA). The results were expressed as mean $\pm$ SD and coefficient of variation. The means were compared using ANOVA, followed by Tukey for multiple comparisons as a *post hoc* test. The significance level was set at  $p < 0.05$ .

## Results and Discussion

The present study showed the influence of some spray-drying operating conditions in the production of SDP from EEtOH of *Amburana cearensis* (Allemão) A.C.

Sm., Fabaceae, a species with pharmacological potential for treatment of respiratory diseases such as asthma.

Chromatographic analyses of the EEtOH of *A. cearensis* by HPLC-PDA showed among other peaks, two with retention time of 4.8 and 10.0 min, which were similar for AMB and CM (chemical markers) at the same experimental conditions (Figure 1).

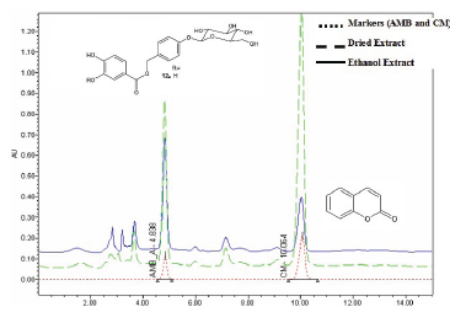


Figure 1. Chromatogram profile of the ethanol extract, SDP, amburoside and coumarin from *Amburana cearensis*.

The HPLC-PDA analysis showed that the SDP of *A. cearensis* production did not cause alterations in the chromatographic profile when related to the EEtOH (Figure 1). The retention time of CM and AMB in the EEtOH or SDP from *A. cearensis* were 10.06 and 4.84 min, respectively. The identification and quantification of these two active principles of *A. cearensis* are very important for quality control and efficacy of this active raw material.

According to the literature, adherence of plant extract in the walls of the drying chamber of spray dryer may be related to the conditions adopted in the drying process, the low efficiency of the cyclone used in the collection of the powder and the excipients used (Masters, 1985; List & Schimdt, 1989). In the present study there was no adherence of particles of solids on the walls of the drying chamber during the production of the SDP of *A. cearensis*. This result is possibly related at least in part with the use of colloidal silicon dioxide as excipient in the formulation of the SDP of *A. cearensis*.

Table 1 and Figure 2 show the effects of the selected factors (inlet air temperature, air flow rate and feed flow rate) in the development of the SDP of *A. cearensis* using as response concentration of markers, moisture content and yield process. Table 1 shows the AMB concentration achieved for each experiment. The lowest AMB concentration was on experiment 6 (63.37 $\pm$ 2.68 mg/g) while the highest one was on experiment 2 (82.87 $\pm$ 1.10 mg/g). The ANOVA analysis indicated that the most significant factor that affected the AMB concentration was air flow rate, -F-value 40.2,  $p < 0.0001$



**Influence of process conditions on the physicochemical characteristics of cumaru (*Amburana cearensis*) powder produced by spray drying**

Sandra M. Araruna et al.

(sample 2:  $82.87 \pm 1.10$  mg/g; sample 6:  $63.37 \pm 2.68$  mg/g). This variable was followed by feed flow rate and inlet air temperature (Table 1; Figure 2). The CM concentration in the SDP was significantly influenced by the all investigated factors. Furthermore, interactions were observed between factors. In this context, CM concentration values in the SDP showed a great variation, from 4.48 to 26.23 mg/g.

Previous studies developed by our laboratory (Leal et al., 2003b; Leal et al., 2008) showed that CM and AMB have anti-inflammatory and/or antioxidant activities in rodents at the dose from 20 to 50 mg/kg, *p.o.*, respectively, besides other pharmacological effects of these molecules. As described in Table 1 the higher concentration of CM in the SDP of *A. cearensis* was obtained in the experiment 7 (CM:  $26.23 \pm 1.20$  mg/g), which was shown in about 75 mg/g of AMB. Therefore, considering the active dose of CM and AMB, the SDP of *A. cearensis* obtained in experiment 7 seems to be most suitable for the development of phytomedicine.

According to Table 1, the moisture content of SDP of *A. cearensis* varied from 3.72 to 5.85%. This response

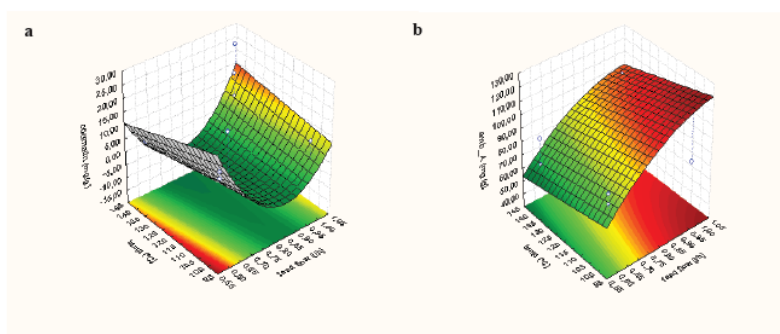
was significantly influenced by all the variables, especially the feed flow rate followed by inlet air temperature and air flow rate. Powder moisture content was observed to increase when the feed flow rates increase and decrease when inlet air temperature increased. However this last result was dependent of the feed flow rate. These results corroborate with previous studies. According to Tonon et al. (2008) at higher inlet air temperatures, there is a greater temperature gradient between the atomized feed and the drying air, resulting in a greater driving force for water evaporation, thus producing powders with lower moisture content. Grabowski et al. (2006) also observed a reduction of powder moisture content with increasing temperatures, studying the spray drying of sweet potato puree.

At the present study the feed flow rate was the variable that showed the greatest influence on moisture content of the SDP of *A. cearensis*. The feed flow rate negatively affected powder moisture content. According to Kurozawa et al. (2009) higher flow rates imply in a shorter contact time between the feed and the drying air, making the heat transfer less efficient and resulting in lower water evaporation.

**Table 1.** Experimental matrix according to  $2^3$  factorial design and studied responses.

Assay	Temp (°C)	Feed flow (L/h)	Air flow (L/h)	AMB (mg/g)	CM (mg/g)	Yield (%)	Moisture content (%)
1	100	0.6	30	$82.77 \pm 1.36$	$10.48 \pm 1.98$	$19.88 \pm 0.96$	$4.58 \pm 0.44$
2	140	0.6	30	$82.87 \pm 1.10$	$4.52 \pm 0.46$	$33.98 \pm 0.50$	$3.83 \pm 1.81$
3	100	1	30	$72.8 \pm 2.85$	$7.92 \pm 2.29$	$16.75 \pm 1.90$	$5.05 \pm 0.33$
4	140	1	30	$68.97 \pm 1.22$	$14.98 \pm 1.56$	$13.63 \pm 2.15$	$4.92 \pm 0.34$
5	100	0.6	40	$75.45 \pm 1.72$	$13.20 \pm 2.01$	$24.07 \pm 0.91$	$5.85 \pm 0.69$
6	140	0.6	40	$63.37 \pm 2.68$	$4.48 \pm 2.38$	$19.43 \pm 2.77$	$4.92 \pm 0.41$
7	100	1	40	$74.54 \pm 1.45$	$26.23 \pm 1.20$	$41.10 \pm 1.45$	$5.31 \pm 0.92$
8	140	1	40	$75.61 \pm 0.77$	$6.05 \pm 1.16$	$19.84 \pm 3.54$	$3.72 \pm 1.20$
9	120	0.8	35	$79.21 \pm 2.09$	$9.85 \pm 0.96$	$33.61 \pm 1.55$	$4.92 \pm 0.41$

The values represent the mean $\pm$ SD. The analyses were performed in triplicate. AMB: amburoside A; CM: coumarin.



**Figure 2.** Spray Dryer Powder from *Amburana cearensis*: response surfaces for coumarin (a) and amburoside A (b) for optimization of drying conditions.

Table 1 shows the influence of inlet air temperature, feed flow rate and air flow rate on the spray drying process yield. This response was significantly influenced by all the variables alone, but also by interaction between them. The lowest yield was for experiment 4 ( $13.63 \pm 2.15\%$ ) while the highest one was for experiment 7 ( $41.1 \pm 0.6\%$ ). The dry process of the fluid extract of *A. cearensis* performed at the present study reaching a yield higher than the previous method developed by our laboratory (Araruna, 2008). However additional studies are still needed to improve the yield of this dry process.

### Conclusion

The results of the present study showed that all operating conditions alone or combined influenced the physicochemical characteristics of the SDP of *Amburana cearensis*. Among the parameters investigated, the inlet air temperature and feed flow rate were one of the operating variables with more impact on CM concentration. On the other hand, the inlet air temperature did not show an important influence on AMB concentration.

The present study allowed for the first time the determination of the operating conditions-e.g. experiment 7-to produce *A. cearensis* extract powders that were adequate when related to the active principle concentrations (CM and AMB) and moisture content. In this sense, this work opens several investigative perspectives in view to optimize the product and add new technological characteristics.

### Acknowledgments

This work was supported by CAPES, CNPq, Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico and Banco do Nordeste do Brasil.

### References

- Araruna SM, Leal LKAM, Canuto KM, Silva AH, Silveira ER 2011. Desenvolvimento e validação de método (CLAE-DAD) para o controle de qualidade das cápsulas de *Amburana cearensis* (cumaru): dosagem de amburosídeo A (AMB) e cumarina (CM). 1º Workshop Brasileiro de Tecnologia Farmacêutica e Inovação-Novas tecnologias e os desafios da parceria Universidade/Empresa, Aracaju.
- Araruna SM 2008. Desenvolvimento, Padronização (CLAE-DAD) e Avaliação Pré-Clinica do Extrato Seco por spray dried de *Amburana cearensis* A. C. Smith (Cumaru). Fortaleza. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, UFC.
- Canuto KM, Silveira ER 2006. Constituintes químicos da casca do caule de *Amburana cearensis* A.C.Smith. *Quim Nova* 29: 1241-1243.
- Canuto KM, Lima MAS, Silveira ER 2010. Amburosídeos C-H and 6-O-protocatechuoyl coumarin from *Amburana cearensis*. *J Braz Chem Soc* 21: 1746-1753.
- Canuto KM 2007. Aspectos químicos do estudo interdisciplinar (Química-Agronomia-Farmacologia) de *Amburana cearensis* A.C. Smith. Fortaleza. Tese de Doutorado, Programa de Pós-graduação em Química, UFC.
- Chan LW, Tan LH, Heng PW 2008. Process analytical technology: application to particle sizing in spray drying. *AAPS PharmSciTech* 9: 259-66.
- Costa-Lotuf LV, Jimenez PC, Wilke DV, Leal LKAM, Cunha GM, Viana GSB 2003. Antiproliferative effects of several compounds isolated from *Amburana cearensis* A.C.Smith. *Z Naturforsch C* 58: 675-680.
- Couto AG 2005. Desenvolvimento tecnológico de comprimidos a partir do granulado do produto seco por aspersão de *Phyllanthus niruri* e controle de qualidade da matéria-prima vegetal a partir do seu cultivo. Tese de doutorado, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS.
- Farmacopéia Brasileira, 5ª edn (2010). *Atheneu*, São Paulo, Brazil.
- Gallo L, Llabot JM, Allemandi D, Bucalá V, Pinã J 2011. Influence of spray drying operating conditions on *Rhamnus purshiana* (Cáscara sagrada) extract powder physical properties. *Powder Technol* 208: 205-214.
- Gonnissen Y, Verhoeven E, Peeters E, Remon JP, Vervaet C 2008. Coprocessing via spray drying as a formulation platform to improve the compactability of various drugs. *Eur J Pharm Biopharm* 69: 320-334.
- Grabowski JA, Truong VD, Daubert CR 2006. Spray drying of amylase hydrolyzed sweet potato puree and physicochemical properties of powder. *J Food Sci* 71: E209-E217.
- Kurozawa LE, Morassi AG, Park KJ, Hubinger MD 2009. Spray drying of protein hydrolysate of chicken breast meat. In 4th InterAmerican drying conference Montreal, Canada.
- Leal LKAM, Ferreira AAG, Bezerra GA, Viana GSB, Cunha KMA, Pessoa C, Moraes MFJA 2000. Antinociceptive, antiinflammatory and bronchodilator activities of Brazilian medicinal plants containing coumarin: a comparative study. *J Ethnopharmacol* 70: 151-159.
- Leal LKAM, Oliveira FG, Fontenele JB, Ferreira MAD, Viana GSB 2003a. Toxicological study of hydroalcoholic extract from *Amburana cearensis* in rats. *Pharm Biol* 41: 308-314.
- Leal LKAM, Nechio M, Silveira ER, Canuto KM, Fontenele RA, Viana GSB 2003b. Anti-inflammatory and smooth muscle relaxant activities of the hydroalcoholic extract and chemical constituents from *Amburana cearensis* A. C. Smith. *Phytother Res* 17: 335-340.
- Leal LKAM, Silveira ER, Canuto KM, Matos FJA, Viana GSB 2006. Overview of chemical, toxicological and pharmacological studies with *Amburana cearensis* A.C.



**Influence of process conditions on the physicochemical characteristics of cumaru (*Amburana cearensis*) powder produced by spray drying**  
*Sandra M. Araruna et al.*

- Smith and its active constituents. In: Govil JN, Sing VK, Arunachalam C. (Org.). *Recent Progress in Medicinal Plants*. 1 ed. Houston: Studium Press, LLC, 11: 333-353.
- Leal LKAM, Fonseca F, Pereira F, Canuto KM, Felipe C, Fontenele J, Pitombeira M, Silveira ER, Viana GSB 2008. Protective effects of amburosíde A, a phenol glucosíde from against CCl<sub>4</sub>-induced hepatotoxicity in rats. *Planta Med* 74: 497-502.
- León-Martínez FM, Méndez-Lagunas LL, Rodríguez-Ramírez J 2010. Spray drying of nopal mucilage (*Opuntia ficus-indica*): Effects on powder properties and characterization. *Carbohydr Polym* 81: 864-870.
- List PH, Schimdt PC 1989. *Phytopharmaceutical Technology*. Boca Raton: CRC.
- Masters K 1985. *Spray Drying Handbook*, 4<sup>a</sup> ed., George Godwin, London.
- Masters K 1991. *Spray Drying Handbook*, 5<sup>a</sup> ed., George Godwin, London.
- Petrovick GF 2006. Desenvolvimento e avaliação tecnológica de granulado revestido contendo produto seco por spray drying de *Achyrocline satureioides* (Lam) D.C. Asteraceae (marcela). Dissertação de mestrado, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS.
- Sansone F, Aquino RP, Del Gaudio RP, Colombo P, Russo P 2009. Physical characteristics and aerosol performance of naringin dry powders for pulmonary delivery prepared by spray-drying. *Eur J Pharm Biopharm* 72: 206-213.
- Tanon RV, Barbet C, Hubinger ND 2008. Influence of process conditions on the physicochemical properties of açai (*Euterpe oleraceae* Mert.) powder produced by spray drying. *J Food Eng* 88: 411-418.
- Zhao LM, Shi LE, Zhang ZL, Chen JM, Shi DD, Yang J, Tang ZX 2011. Preparation and application of chitosan nanoparticles and nanofibers. *Braz J Chem Eng* 28: 353-362.
- Zhang CH, Huang LX, Wang CP, Mujumdar AS 2010. Experimental and numerical investigation of spray-drying parameters on the dried powder properties of *Ginkgo biloba* seeds. *Dry Technol* 3: 380-388.

**\*Correspondence**

Luzia Kalyne A. M. Leal  
 Centro de Estudos Farmacêuticos e Cosméticos, Laboratório de Farmacognosia, Departamento de Farmácia. Universidade Federal do Ceará  
 Rua Capitão Francisco Pedro, 1210, 60430-270 Fortaleza-CE, Brazil  
 kalyne@ufc.br  
 Tel: +55 85 3366 8294  
 Fax: +55 85 3366 8257

**Technological characteristics and pharmacological evaluation of the dry extract from *Amburana cearensis* (CUMARU) by spray drying**

S.M.Araruna<sup>a</sup>; T.M.Pierdoná <sup>b</sup>; E.R.Silveira<sup>c</sup>; A.P.Ayala<sup>d</sup>; K.M.Canuto<sup>e</sup>; L.K.A.M.

Leal<sup>a</sup> \*

<sup>a</sup>Center for Pharmaceutical and Cosmetic Studies, Department of Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Odontology and Nursing; <sup>b</sup>Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceará, Brazil <sup>c</sup>Department of Organic Chemistry, Federal University of Ceara <sup>d</sup>Department of Physics, Federal University of Ceara. <sup>e</sup>Embrapa Agroindústria Tropical.

\*Corresponding author:

Dr. Luzia Kalyne A. M. Leal

Center for Pharmaceutical and Cosmetic Studies, Department of Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Odontology and Nursing; Rua Capitão Francisco Pedro, 1210. Fortaleza, 60430-270, Brasil

Tel: +55-85-3366-8294; Fax: +55-85-3366-8257

E-mail address: [kalyne@ufc.br](mailto:kalyne@ufc.br)

## Introduction

*Amburana cearensis* A. C. Smith, Fabaceae, is a tree commonly known as cumaru, which is widely used in the Northeast of Brazil for treating respiratory diseases, such as asthma. Chemical studies (Canuto and Silveira, 2006; Canuto, 2007; Diaz, 1999) of *A. cearensis* led the isolation of several molecules including 3,4-dihydroxybenzoic acid (protocatechuic acid), 3-methoxy-4-hydroxy benzoic acid (vanillic acid), a mixture of glucosylated  $\beta$ -sitosterol and stigmasterol, coumarin (CM), five flavonoids (isokaempferide, kaempferol, quercetin, afrormosin and 4'-methoxyfisetin) and the phenol glucosides, amburosides A (AMB) and B.

A toxicological study carried out with the hydroalcohol extract from the trunk bark of *A. cearensis* administered to rats by the oral route did not show any toxic effects or to interfere with the pregnancy rate and development of the 1<sup>st</sup> as well as the 2<sup>nd</sup> generation of the animals (Leal *et al*, 2003). Costa-Lotufo (Costa-Lotufo, *et al*, 2003) showed that isokaempferide and kampferol, but not AMB and protocatechuic acid from *A. cearensis*, inhibited the sea urchin egg development as well as tumor cell lines. However, only the protocatechuic acid induced lysis of mouse erythrocytes. Previous pharmacological studies report anti-inflammatory, antioxidant, smooth muscle relaxant, antinociceptive, neuroprotection and platelet antiaggregant effects of HAE and/or chemical constituents from *A. cearensis*, including AMB and CM (Leal *et al*, 1995, 1997, 2000, 2001, 2003a, 2003b, 2003c, 2005, 2006a, 2006b, 2008).

The use of standardized plant extracts dried in the production of herbal medicines, such as *Ginkgo biloba*, *Hypericum perforatum* and *Piper methysticum*, is becoming increasingly widespread in the pharmaceutical industry (Calixto, 2000). The *spray drying* technique is one of the most important drying methods. The idea of *spray drying* consists on the transformation of a fluid state into a dried particulate form by

spraying a solution hot drying medium (Masters, 2002; Sollohub and Cal, 2010). This technique offers the advantages of using relatively low temperatures and short particle residence times (5–100 s). In consequence, the *spray drying* process is a drying method for drying heat sensitive substances, allowing the formation of particles with the desired physic-chemical and morphological properties (Masters, 1991; Rodriguez *et al*, 2005; Vehring, 2008).

Considering the pharmacological potential of *A. cearensis* and targeting its industrial utilization, the objective of this study was to produce and characterize the spray-dried powder (SDP) from the ethanol extract of *A. cearensis* regarding its rheological property, particle size and morphology and physic-chemical characteristics.

## **Material and methods**

### *Plant material*

The trunk bark of *Amburana cearensis* was collected from Quixeramobim, Ceará, Brazil. Voucher specimens (numbers 837 and 847) were deposited in the Herbário Prisco Bezerra at the Universidade Federal do Ceará (UFC). The trunk bark of *A. cearensis* was dried in an oven with circulation and continuous renewal of air for 48 h at a temperature of  $35.0 \pm 5$  °C. After drying (moisture content:  $8.23 \pm 0.92$  %) the material was pulverized.

### *Chemicals*

Coumarin (Sigma-aldrich; purity: 99.9%); Amburoside A (CENAUREMN/UFC; purity: 97.3 %), Ammonium acetate and Acetonitrile, were supplied from Merck Specialty Chemicals (Mumbai, India) and Mallinckrodt Baker (USA), respectively. All the reagents were of analytical and HPLC grade. Solutions were prepared in Milli Q water (Millipore, Billerica, MA, USA). The excipient used was Colloidal silicon dioxide, Aerosil 200<sup>®</sup>, Degussa (São Paulo, Brazil)

### *Animals*

Male Swiss mice (25-30 g) were from the Central Animal House of the Federal University of Ceará, Brazil. The animals were housed at  $24 \pm 2$  °C, under a 12-h light/12-h dark cycle, and had free access to a standard pellet diet (Purina chow) and tap water. They were deprived of food for 8 h before the experiments, except for drinking water. The animals were treated in accordance to the current law and the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. The Project was previously approved by the Animal's Ethics Committee of the Faculty of Medicine of the Federal.

### ***Fluid plant extract preparation***

The fluid extract of *A. cearensis* was prepared by maceration and percolation of the trunk bark with ethanol in the proportion of drug:solvent was 1:1 (w/v). The corresponding extractive solution containing  $1.8 \pm 0.01$  % (w/v) of solid residue.

### *Spray drying sample preparation*

The dry extract was produced according to the method described by Araruna (Araruna, 2008) modified. The ethanol extract from *A. cearensis* and colloidal silicon dioxide were the ingredients used to prepare the dispersion to be spray-dried. The colloidal silicon dioxide: solid residue was 0.3:1.0. The dry extract was produced using a mini *spray-dryer* model LM MSD 1.0 (Labmaq do Brazil Ltda, Brazil) with capacity of drying up to 1.0 L/h. The drying method developed previously in our laboratory (Araruna, 2008) was optimized.

### *High Performance Liquid Chromatography analysis*

The simultaneous quantification of CM and AMB (chemical markers) in the SDP from ethanol extract of *A. cearensis* was determined according the method

validated previously by our laboratory (Araruna, 2011). The analysis were achieved on an Alliance HPLC-PDA system (Waters, USA) under the following conditions: C18 column, mobile phase (ACN: 5mM Ammonium acetate: pH 3.4), isocratic elution, injection volume of 20  $\mu$ L, flow rate 1.0 mL/min and  $\lambda=$  261 and 272 for AMB and CM respectively. Aliquots of the extract were diluted in the mobile phase and filtered through a 0.45  $\mu$ m filter unit (Millipore, USA).

#### *Moisture content (MC)*

The powder moisture content was determined by the Karl Fischer method (model DL31, Mettler Toledo). Sample moisture content analysis was performed immediately after the *spray drying* step (Farm.Bras, 2011). This procedure was repeated three times with three distinct samples and the results are expressed as the mean and coefficient of variation.

#### *Yield*

*Spray drying* yield was evaluated through determination of the recovered product, given by the ratio between the total recovered product mass and the mass of extract initially fed into the system, and is expressed by the following equation (León-Martínez, 2010):

$$y = \frac{(W_2 - W_1) - X_{wb}(W_2 - W_1)}{M_V T_s} 100$$

where  $y$  is powder yield (%),  $X_{wb}$  is the moisture content in wet basis (wb),  $M_V$  is the volume of the feed extract (L),  $T_s$  is the content of total solids (g dry matter/L), and  $W_1$  and  $W_2$  are the weight (g) of the powder receptacle before and after spray drying, respectively.

#### *Bulk and tapped density, Carr's index and Hausner ratio*

In order to determine the density of the SDP from ethanol extract of *A. cearensis*, the powder 1.0119 g was gently poured into a 10 cm<sup>3</sup> graduate cylinder. Bulk density (DB) was calculated as the ratio between the weight (g) of the sample contained in the cylinder and the volume occupied (10 cm<sup>3</sup>). Tapped density (DT) was estimated by tapping the cylinder until no measurable change in the volume was noticed (USP, 2012). This procedure was repeated three times with three distinct samples and the results are expressed as the mean and coefficient of variation.

The Carr's index and Hausner ratio were determined using bulk and tapped density values (Callahan, 1982).

#### *Angle of repose*

The angle of repose ( $\alpha$ ) was determined by pouring a pre-defined mass of SDP through a funnel located at a fixed height on a graph paper flat horizontal surface and measuring the height (h) and radius (r) of the conical pile formed. The tangent of the angle of repose is given by the h/r ratio. This procedure was repeated three times with three distinct samples and the results are expressed as the mean and coefficient of variation (USP, 2012).

#### *Water Activity*

The water activity of SDP from *Amburana cearensis* was measured using an AquaLab Lite (Decagon Devices Inc, Pullman, EUA) water activity meter immediately after the drying process. The results were expressed as a mean of three determinations.

### *Hygroscopicity*

The hygroscopicity of the SDP from EEtOH of *A. cearensis* as determined using the experimental model described by Callahan (Callahan, 1982). The samples (1.0 g) were exposed to various relative humidity (RH) achieved using the atmospheres saturated with salt solutions (Greenspan, 1997) at  $25 \pm 1$  °C and 8; 32.5 and 75 % RH – given by a saturated aqueous solution of KOH, MgCl<sub>2</sub> and NaCl, respectively. After 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 and 14 days of exposition of different RH the moisture content of the samples was determined gravimetrically. This procedure was repeated three times with three distinct samples and the results are expressed as the mean and coefficient of variation.

### *Scanning Electron Microscopy*

Scanning electron microscopy (SEM) was utilized in order to assess the morphological characteristics of the raw materials and recrystallized samples. The samples were fixed on aluminum stubs with a double-sided tape and gold sputter-coated. They were examined by through a Tescan microscope (Model XMU, VEGA II) using an accelerating voltage of 30 kV at a working distance of 15 mm.

### *Analysis of particle size distribution by laser diffraction*

The particle size distributions and mean diameter of the SDP from *Amburana cearensis* was determined by laser diffraction in a Beckman Coulter LS 13 320 using the Tornado Dry Powder System (DPS) mode with a particle measurement capacity of the widest dynamic range, from 0.375 to 2.000  $\mu\text{m}$ .



## Pharmacological experiments

### *DPPH radical scavenging activity*

The determination of scavenging activity of DPPH free radical was evaluated using the method of Saint-Cricq et al., 1999. A solution of DPPH (0.3 mM) in methanol: ethanol (1:1) was prepared, and 292 $\mu$ L of this solution was mixed with 8 $\mu$ L of *spray drying powder* (SDP) extract of *Amburana cearensis* (100, 200 and 400 $\mu$ g/mL),  $\alpha$ -tocopherol (50  $\mu$ g/mL, standard drug) or vehicle (DMSO 3%, control). After mixing gently and standing at room temperature for 30 min, the optical density of the reactant was measured spectrophotometrically at 517 nm and the radical scavenging activity was expressed as percent inhibition:

$$DPPH \text{ inhibition } (\%) = \left[ A_0 - \left( \frac{A_c}{A_0} \right) \right] \times 100$$

Where  $A_0$  is the absorbance of control and  $A_c$  is the absorbance of samples.

### *Superoxide anion ( $\cdot O_2$ ) scavenging activity*

The enzyme activity was determined according to the method of Oswald et al., 1992, by measuring their ability to inhibit the photochemical reduction of nitro blue tetrazolium (NBT). For the assay, 200 $\mu$ L of *spray drying powder* (SDP) of *Amburana cearensis* (100, 200 and 400 $\mu$ g/mL), ascorbic acid (50 $\mu$ g/mL, standard drug), vehicle (3% DMSO) or water (control) were added to the solutions of methionine (0.13 mM), EDTA (0.54 mM) potassium phosphate buffer (0.1 M, pH 7.0), riboflavin (1 mM) and NBT (0.44 mM). The tubes were exposed to fluorescent light (80 W) for 30 minutes. Samples prepared following the same procedure were kept in the dark. The absorbance of the solution was measured in a spectrophotometer (560nm) in both samples (illuminated and not illuminated) and the difference between the two absorbencies was

taken into account for determining the activity of SOD. In this method, riboflavin photochemical-reduced generates  $\cdot O_2$ , which reduces the NBT. In the presence of SOD this reduction is inhibited.

*Effects of dry extract of Amburana cearensis (DEAC) on the nociception induced by formalina in mice.*

Mice were treated with DEAC (100 and 200 mg/kg, p.o.), morphine (MOR, 10 mg/kg, s.c.) or vehicle (control group) or saline (normal group), 60 or 30 minutes prior the administration of 20  $\mu$ L formalin (1 %, s.c.) in the right paw, and the time (s) each mouse spent licking the injected paw was recorded.

*Statistical analysis*

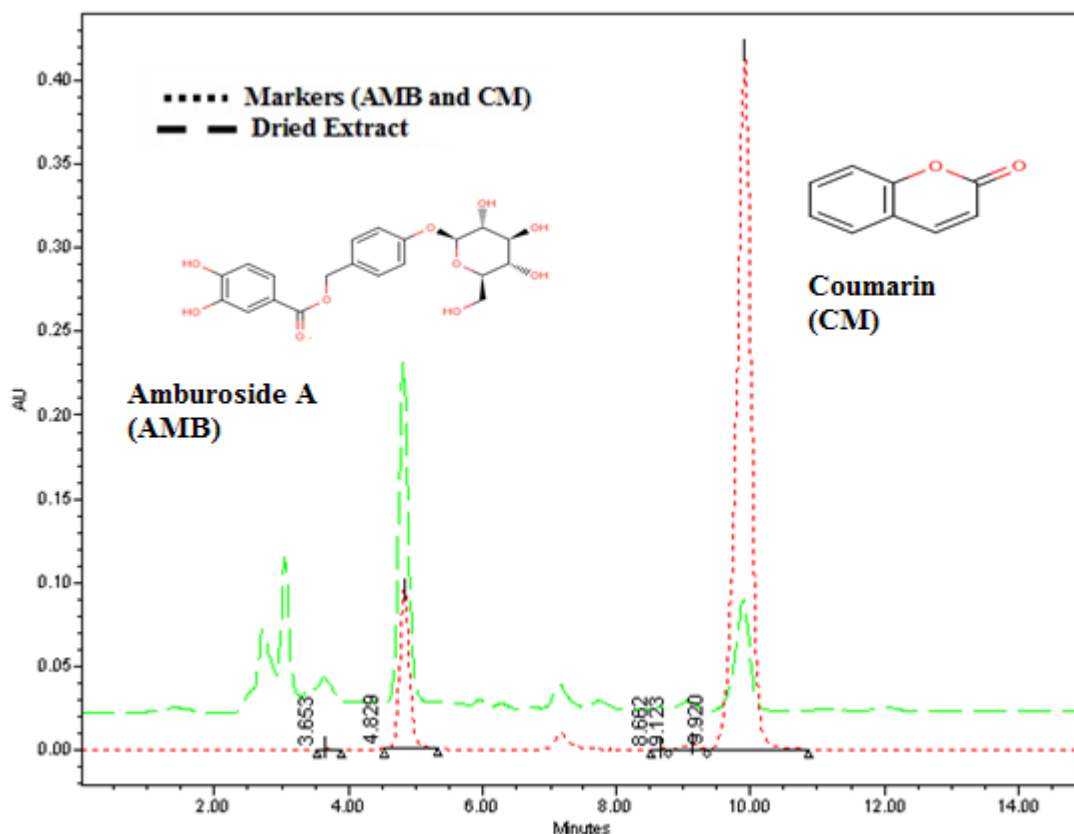
The results are expressed as mean  $\pm$  standard deviation and coefficient of variation. Statistical analyses of the results were carried out by unpaired Student's t-test (GraphPad Prism program, USA). The level of significance was set to  $p < 0.05$ .

## **Results and discussion**

### ***Characterization of the spray dried powder (SDP)***

*HPLC analysis*

The chromatographic analysis showed that the SDP of *A. cearensis* production did not cause alterations in the chromatographic profile when related to the chemical markers AMB and CM (**Figure 1**). The retention time of CM and AMB in the SDP from *A. cearensis* were 10.064 and 4.838 min, respectively.



**Figure 1.** Chromatogram profile of Extract Dried Powder (SDP) and chemical markers AMB and CM from *A. cearensis*

As shown in **Table 1**, the SDP showed a content of CM and AMB of  $26.23 \pm 0.31$  and  $74.54 \pm 1.08$  mg/g, respectively. These results reveal that the SDP obtained through of the present method showed a content of chemicals markers significantly higher when related to previous method (CM:  $12.44 \pm 0.29$ ; AMB:  $48.27 \pm 0.8$  mg/g) developed by our laboratory (Araruna, 2008). These results are possibly related to modification of the previous method, performed by determining the optimal conditions of operation of the spray-dryer, which involved a  $2^3$  factorial planning with centre points, where the influence of three variables on production of the drying extract was examined, employing as the outcome the concentration of CM and AMB determined by HPLC-PDA.

**Table 1.** Physicochemical characterization of the SDP of *Amburana cearensis* by spray drying

Parameters	Optimization Without SDP	Optimizes With SDP
Bulk density (g/mL)	0.17133 ± 0.89	0.1975 ± 2.5
Tapped density (g/mL)	0.2065 ± 0.34%	0.2327 ± 1.16
Carr's Index (%)	17.04	15.10
Hausner Factor	1.2054	1.177
Angle of repose (°)	25	26
AMB assay (mg/g)	48.5 ± 1.6	74.54 ± 1.45
CM assay (mg/g)	12.49 ± 1.78	26.23 ± 1.20

\* Average value represents the average of five determinations

The identification and quantification of these two active principles of *A. cearensis* is very important for ensuring the quality and effectiveness of the SDP. Previous studies ((Leal *et al*, 1995, 1997, 2000, 2001, 2003a, 2003b, 2003c, 2005, 2006a, 2006b, 2008) carried out by our research group showed that the pharmacological potential of *A. cearensis* are related at least in part with the presence of CM and AMB in the plant. The CM and AMB when administered orally showed significant anti-inflammatory and/or antioxidant activities from the doses of 20 and 50 mg/Kg, respectively, in rodents. In addition, CM and AMB have muscle relaxant effect on smooth muscle in the airways of rodents.

The anti-inflammatory activity of extract and chemical constituents of *A. cearensis*, including CM and AMB seems to occur by an inhibitory action on the release of inflammatory mediators, and/or alternatively by interfering with some phase of neutrophil migration into the inflammatory focus (Leal *et al*, 1995, 1997, 2000, 2001, 2003a, 2003b, 2003c, 2005, 2006a, 2006b). Other data (Leal *et al*, 2008) corroborated this hypothesis showing these active principles exert their anti-inflammatory activities mainly by inhibiting the LPS-induced release of TNF- $\alpha$  and modulating of some

biological functions of human polymorph nuclear implicated in the initiation and maintenance of inflammation.

#### *Yield and moisture content*

The volume of the extractive solution, submitted to spray drying was 1.0 L, which contained 30% (w/v) of dry residues (plant constituents plus the excipient). The drying process resulted in about 14.22 g of SDP reaching a yield of  $60.80 \pm 2.53$  %, which was 1.4 times higher than the previous method (Araruna, 2008).

The quantification of the moisture present in vegetable drugs and other raw vegetables, such as extracts, is a determining factor for their conservation, since excessive moisture can lead to the activation of enzymes and then generating suitable conditions to the proliferation of living organisms (Evans, 1986). The moisture content of SDP was of  $5.31 \pm 0.12$  %. If we consider this result as corresponding to the residual humidity, this value is within the limits accepted for powders with non hermetic packaging (max 6 to 7%) (List and Schimdt, 1998).

#### *Bulk and tapped density, Carr's index, Hausner ratio*

**Table 1** shows the results of evaluations of the flowability and compressibility of the SDP of *A. cearensis*. Study of bulk density and tapped density are important considering that the density of a powder defines its packaging. There was no significant difference between the densities of the SDP obtained by the present method and previous method. The bulk and tapped densities of the SDP were 0.19 and 0.23 g/mL, respectively, an increase of around 15 % when compared to the SDP produced by the previous method (bulk and tapped densities: 0.17 and 0.20 g/mL, respectively). The bulk density of SDP from *A. cearensis* was smaller than tapped density. Higher values

of bulk density normally mean greater hindrance to flow, due to the many points of contact among the particles, giving rise to the denser packing (Alderborn, 2005; Hering and Kleinebudde, 2007).

The compressibility of a powder is a commonly used indicator of flowability and is often expressed using the Hausner ratio, which is the ratio between the tapped density and the bulk density of the powder (Hausner, 1967). Compressibility is also one of the tests proposed by Carr (Carr, 1965) for the assessment of powder flow properties. Based on the densities data presented above, the Hausner ratio and Carr's index of SDP were 1.17 and 15.1 %, respectively, in accordance with United States Pharmacopeia (USP, 2008) this powder is classified as of good flowability, while the SDP produced previously it's showed just an acceptable flow property.

#### *Angle of repose*

Flow properties of dried products are directly related to their behavior during storage, handling, and processing (Petrovick and Lima, 1991). According to USP 35-NF 30 (USP, 2012), for repose angles between 25–30° powder flow is excellent, among 31–35° the flow is good and within the range 36–40° the flow is fair. For values higher than 41°, the powder has bad flow properties. So, based on the results present in **Table 1**, the flow of the SDP of *A. cearensis* can be considered as excellent.

#### *Water Activity*

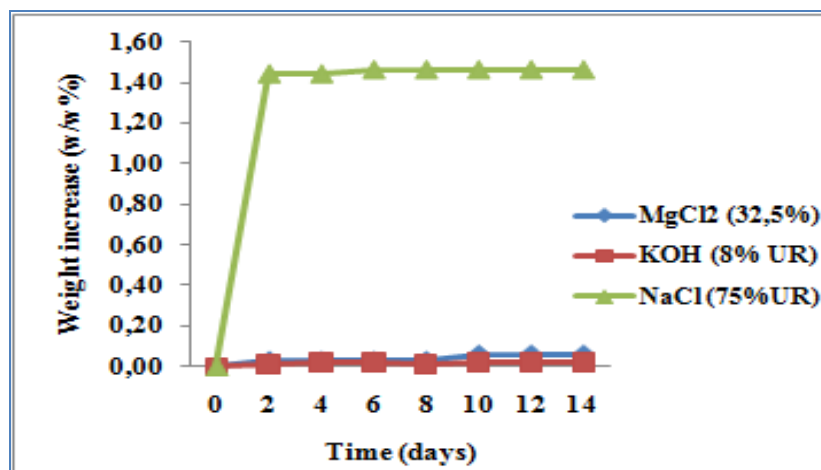
Water activity is a criterion commonly used for food safety and quality. In general, the occurrence of degradation reactions and growth of microorganisms, such as fungus and bacteria, are drastically reduced below a certain value of water activity. It is highly related to the drying temperature due to changes in water binding, dissociation,

and solubility of the compounds. Because the inlet drying conditions remained almost constant for all of the experiments in drying processes, changes in the water activity of the extracts depended on the feed composition and were related to the product's hygroscopicity. It can be observed that a samples presented water activity below the safety limit of 0.5, which is desired to avoid microbial growth.

### *Hygroscopicity*

It is well established that the water content of solid active pharmaceutical ingredients and excipients is a parameter that have to be monitored throughout the drug development process. (Fabricant and Farnsworth, 2001; WHO, 2002; Gonnissen, Remon, and Vervaet, 2007; Lieberman, Lachman and Schwartz, 1990; Newall, Anderson and Phillipson, 1996; Tong *et al*, 2008; Tonon, Barbet and Hubinger, 2008). Measuring the tendency for solids to take up water vapor from the atmosphere at constant temperature with changes in relative humidity (RH), referred to as a measure of “hygroscopicity”, is a routine preformulation activity intended to provide an early assessment of the potential effects of moisture on the physical and chemical properties of medicines (Newman, Reutzel-Edens and Zografi, 2008).

This study showed moisture-uptake profiles of SDP from *Amburana cearensis* at 8 (KOH), 32.5 (MgCl<sub>2</sub>) and 75 % (NaCl) of RH. At 8 and 32.5 % RH no difference was found in the weight of SDP produced by present method after 14 days of exposition. However at 75 % RH, the SDP showed a slightly higher moisture-uptake than the others conditions (**Figure 2**). These results classify the SDP of *A. cearensis* as slightly hygroscopic form in accordance with the European Pharmacopeia (Newman, Reutzel-Edens and Zografi, 2008).



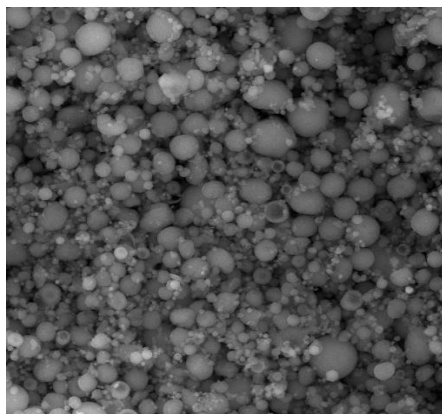
**Figure 2.** Moisture uptake of spray-dried powder (SDP) of *Amburana cearensis* exposed to atmospheres of 8% (A), 32,5% (B) and 75% (C) of RH

#### *Particle morphology by Scanning Electron Microscopy (SEM)*

Particle morphology is a key determinant of the behaviour of bulk solids and multiparticulate systems: many of the physical and chemical properties of such systems depend on particle shape and surface geometry. Thus the morphological characterization of particles is of great importance in pharmaceutical technology. In the field of granulation and pelletization this characterization will be critical for some production steps like filling capsules, and specially the coating of pellets (Walton and Mumford, 1999).

Particle morphology of the SDP from *A. cearensis* was investigated through of the photomicrographs obtained by SEM (**Figure 3**). The powder showed a spherical shape, an important characteristic for the application of spray-dried powders as an intermediary pharmaceutical product.

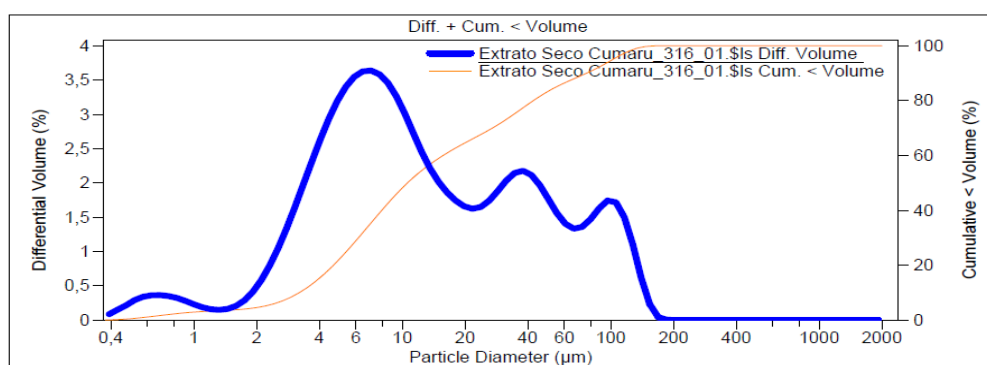




**Figure 3.** Photomicrographies of the granules of the SDP of *Amburana cearensis*

#### *Analyses of particle size distribution by laser diffraction*

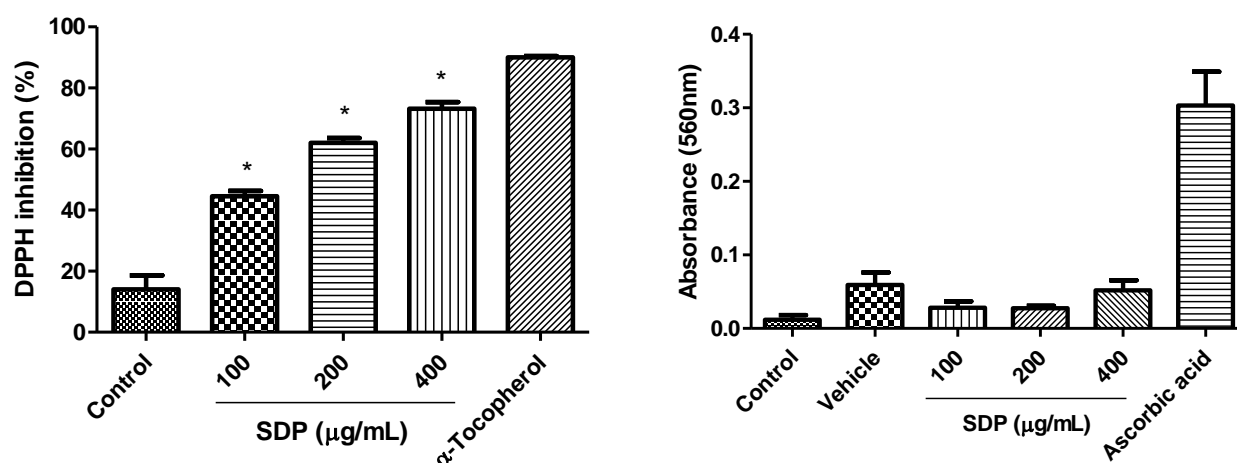
Particles of active and non active pharmaceutical ingredients exist in the majority of pharmaceutical products as dry powders, liquid and semisolid dispersions ranging from nano to millimeter size granules. The particle size and shape can influence a large variety of important properties of the medicines including on product solubility and flowability, factors of fundamental importance in the pharmaceutical development of herbal products, dissolution rate, bioavailability of active pharmaceutical ingredients and drug release (Almeida-Prieto, Blanco-Méndez and Otero-Espinar, 2006). The sample of SDP from *Amburana cearensis* showed unimodal particle size distributions (**Figure 4**), being the mean volume particle average diameter determined by laser diffraction was 10  $\mu\text{m}$ .



**Figure 4.** Distribution and particle size of the dry extract by *spray drying* of *Amburana cearensis* by Laser Diffraction

### Antioxidant Activity

The DPPH is a stable free radical that gives a strong absorption maximum at 517 nm emitting a purple color. Absorbance decreases as a result of a color change from purple to yellow when DPPH radical is reduced by hydrogen from a free radical scavenging antioxidant to form the reduced DPPH-H. **Figure 5A** illustrates the DPPH radical scavenging activity of SDP with increasing concentrations compared with  $\alpha$ -tocopherol, standard drug. The results showed the SNP (100; 200 and 400  $\mu\text{g/mL}$ ) was able to scavenging activity by reducing the DPPH in until  $44.6 \pm 1.7$ ;  $62.0 \pm 1.6$  and  $73.2 \pm 2.2\%$ , significantly compared to control ( $14.0 \pm 4.6\%$ ). The SDP did not show scavenging activity against superoxide radical, differently from ascorbic acid (50  $\mu\text{g/mL}$ , standard drug) (**Figure 5B**).



**Figure 5.** Antioxidant effects of SNP in DPPH assay (A) and superoxide anion scavenging activity (B). Reduction of NBT and DPPH was, respectively, measured spectrophotometrically at 560 and 517 nm, as described under Methods. All data are expressed as the mean  $\pm$  E.P.M, n=4 experiments, \*p<0,05.

*DEAC inhibits the second phase of the formalin test in mice*

In the formalina test in mice, like morphine (standard drug) the DEAC (100 and 200 mg/kg, p.o.) inhibited the second phase (inflammatory) of the response (**Table 2**). These results corroborated previous study (Leal et al., 2010) did by our laboratory where ethanol extract of *A. cearensis* wild and cultivated showed a antinociceptive effect in the formlin test.

The formalin test is a model for tonic pain and localized inflammatory pain. The nociceptive response to formalin occurs in a biphasic pattern: there is an initial acute period (phase 1), and a long-lasting period of intense flinching (phase 2) (Malmberg et al., 1995; Wheeler-Aceto et al., 1990). The initial response was attributed to a direct algogenic effect of formalin on nociceptors (Hunnskaar and Hole, 1987; Jaffery et al., 1994) whereas phase 2 was associated with the release of local endogenous inflammatory mediators, such as serotonin, histamine, bradykinin and prostaglandins responsible for sensitization of primary and spinal sensory neurons and subsequent activation of nociceptors (Hunnskaar and Hole, 1987; Jaffery et al., 1994; Tjolsen et al., 1992). Thus, our results suggest that the antinociceptive effect of DEAC from *A. cearensis* are possibly related to its anti-inflammatory action. Corroborating with this hypothesis earlier study (Leal et al., 1997) showed that hidroalcoholic and coumarin from *A. cearensis* have peripheral and central antinociceptive effects, dependent at least in part on endogenous opioid as well as on nitric oxide systems. In addition, amburoside A (another markers of *A. cearensis*) also showed anti-inflammatory effects modulating at least in part the pro-inflammatory functions of human neutrophils (Leal et al., 2009).

**Table 2.** Effects of the dry extract of *Amburana cearensis* on the formalin-induced nociception in mice.

Groups	Dose (mg/Kg)	Time spent licking the paw (s)	
		1 <sup>a</sup> fase	2 <sup>a</sup> fase
Saline	--	43.8±5.8	123.4 ± 18.4
Vehicle/Control	--	51.0±9.9	142.0 ± 18.2
DEAC	100	41.3±4.2	75.6 ± 9.3*
	200	37.3±6.2	29.5 ± 5.8*
Morphine	5	15.6 ± 5.0	9.2 ± 1.9

Groups of 8-16 animals were treated with extract or morphine, 60 or 30 min before the formalin injection (1%, 20µL). Results represent mean ± S.E.M. of the licking time.

(\*= $p < 0.05$ ; ANOVA and Tukey as the *post hoc* test).

## Conclusion

According to the analysis of the results obtained in this work, it can be concluded that the SPD from *A. cearensis* have appropriate physical properties to ensure the stability — i.e. a safe shelf life that are adequate for direct compression. The comparative evaluation of both the SPD, previous method and present method, showed that the second method produced a SPD with better technological characteristics, including higher content of markers, better flowability and yield. In addition, the SPD of *A. cearensis* showed an antioxidant and antinociceptive effects, which seems to be related with anti-inflammatory potential of the plant. These results open perspectives to development herbal medicine using the SPD of *A. cearensis* as active raw material. However additional studies are necessary.

## Acknowledgments

Financial support: FUNCAP and CNPq.

## References

- Alderborn, G., 2005. Comprimidos e compressão. In: Aulton, M.E., (Ed.). Delineamento de formas farmacêuticas. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, p.402-443.
- Almeida-Prieto, S., Blanco-Méndez, J., Otero-Espinar, F. J., 2006. Microscopic image analysis techniques for the morphological characterization of pharmaceutical particles: Influence of process variables. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 95: 348–357.
- Araruna, S.M., 2008. Desenvolvimento, Padronização (CLAE-DAD) e Avaliação Pré-Clinica do Extrato Seco por Spray-Dryer de *Amburana Cearensis* A. C. Smith (Cumaru). Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Ceará.
- Araruna, S.M., Leal, L.K.A.M., Canuto, K.M., Silva, A.H., Silveira, E.R., 2011. Desenvolvimento e validação de método (CLAE-DAD) para o controle de qualidade das cápsulas de *Amburana cearensis* (cumaru): dosagem de amburosidio A (AMB) e cumarina (CM). 1º Workshop Brasileiro de Tecnologia Farmacêutica e Inovação - Novas tecnologias e os desafios da parceria Universidade/Empresa, Aracaju.
- Calixto, J.B., 2000. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Braz J Med Biol Res*, Ribeirão Preto, v. 33, n. 2.
- Callahan, J.C, Cleary, G.W, Elefant, M, Kaplan, G, Kensler, T, Nash, R.A., 198 Equilibrium moisture content of pharmaceutical excipients. *Drug Dev Ind Pharm*, 8: 355-369.
- Canuto, K.M., 2007. Aspectos químicos do estudo interdisciplinar (Química-Agronomia-Farmacologia) de *Amburana cearensis* A.C. Smith. Fortaleza. Tese de Doutorado, Programa de Pós-graduação em Química – UFC.
- Canuto, K.M., Silveira, E. R., 2006. Constituintes Químicos da Casca do Caule de *Amburana cearensis* A.C.SMITH. *Quim. Nova*, vol.29, 6:1241-1243.
- Carr, R.L., 1965. *Chem Eng*. 72: 163-168.
- Costa-Lotufo, L.V., Jimenez, P.C., Wilke, D.V., Leal, L.K.A.M., Cunha, G.M., Viana, G.S.B., 2003. Antiproliferative effects of several compounds isolated from *Amburana cearensis* A.C.Smith. *Zeitschrift für Naturforschung*, 58:675-680.
- Díaz, B.L, 2003. *Farmacognosia especial*, first ed. Elsevier, Madrid.
- Evans, W.C., 1986. Introduction and general methods. *Trease and Evans Pharmacognosy*. Bailliere Tindall publisher, London. ELBS 4Th ed.
- Fabricant, D.S., Farnsworth, N.R., 2001. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery, *Environ. Health Perspect. Suppl*. 109: 69–75.

Farmacopéia Brasileira, 5th ed.,2011. Atheneu, São Paulo, Brazil.

Gonnissen,Y., Remon, J.P., Vervaet, C., 2007. Development of directly compressible powders via co-spray drying, Eur. J. Pharm. Biopharm. 67: 220–226.

Greenspan, L., 1977. Humidity fixed points of binary saturated aqueous solutions. J Res Nat Bur Stand Sect A Phys Chem 81A: 89-96.

Hausner, H.H., 1967. Int J Powder Metall. 3: 7-13

Hering M.G, Kleinebudde P., 2007. Roll compaction/dry granulation: Effect of raw material particle size on granule and tablet properties. Int J Pharm, 338:110-8

Jeliński, C.J. Du, Sun, D.W., Fornal, J., 2007. Inspection of the distribution and amount of ingredients in pasteurized cheese by computer vision. J. Food Eng., 83:3–9.

Leal, L.K.A.M., 1995. Estudos farmacológicos do extrato hidroalcoólico e constituintes químicos de *Torresea cearensis* Fr. Allem. 128 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Universidade Federal do Ceará.

Leal, K. A. M., Matos, M. E.; Matos, F. J. A., Ribeiro, R. A., Ferreira, F. V., Viana, G. S. B., 1997. Antinociceptive and antiedematogenic effects of the hydroalcoholic extract and coumarin from *Torresea cearensis* Fr. All. Phytomedicine, v.4:221-227.

Leal, L. K.A.M., Ferreira A. A. G., Bezerra, G. A., Viana, G. S. B., Cunha, K. M. A., Pessoa C., Moraes M. F. J. A., Viana, G. S. B. 2000. Antinociceptive, antiinflammatory and brochodilator activitiesof Brazilian medicinal plants containing coumarin: a comparative study. J. Ethnopharm. 70, 151-159.

Leal, L. K. A. M., Fontenele, J. B., Viana, G. S. B., 2001. Inhibition of human platelet aggregation by hydroalcoholic extract and coumarin from *Torresea cearensis* Fr. All. In: VI Pharmatec, Recife.

Leal, L. K. A. M., Lotufo, L. V. C., Moraes, M. O., Silveira, E. R, Canuto, K. M. , Viana, G.S.B., 2003a. Antiproliferative effects of several compounds isolated from *Amburana cearensis* A. C. Smith.PMID: 14577630. Zeitschrift für Naturforschung. C, A. Journal of Biosciences, Alemanha, v. 58, 9:675-680.

Leal, L. K. A. M., Oliveira, F. G., Fontenele, J. B., Ferreira, M. A. D., Viana, G. S. B., 2003b. Toxicological study of the hydroalcoholic extract from *Amburana cearensis* A. C. Smith in rats. Phytotherapy Research, Netherlands, 41: 308-314.

Leal, L. K. A. M., G.S.B; Silveira, E.R.,Canuto, K.M., Ribeiro, R. A., Nechio, M., Fontenele, J. B., 2003c. Anti-inflammatory and smooth muscle relaxant activities of the hydroalcoholic extract and chemical from *Amburana cearensis* A.C.Smith. Phytotherapy Research, USA, 17:335-340.

Leal, L. K. A. M., , H., Cunha, G. M. A., Moraes, M. O.D., Pessoa, C. D.Ó., Viana, G.S.B, Silveira, E.R., Canuto, K.M., 2005. Amburoside A, a glucoside from *Amburana*

*cearensis*, protects mesencephalic cells against 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity. *Neuroscience Letters*, 388:86-90.

Leal, L. K. A. M., Silveira, E.R, Canuto, K.M., Viana, G. S .B., Fechini, M. , Pitombeira, M., 2006a. Mechanisms underlying the relaxation induced by isokaempferide from *Amburana cearensis* in the guinea-pig isolated trachea. *Life Sciences*, 79: 98-104.

Leal, L.K.A.M.,Silveira, E.R.,Canuto, K. M.,Matos, F.J.A.,Viana, G.S.B., 2006b. 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, v. 11, p. 333-353.

Leal, L.K.A.M., Fonseca, F., Pereira, F., Canuto, K.M, Felipe, C., Fontenele, J., Pitombeira, M., Silveira, E.R., Viana, G.S.B., 2008. Protective Effects of Amburoside A, a Phenol Glucoside from against CCl<sub>4</sub>-Induced Hepatotoxicity in Rats. *Planta Medica (Stuttgart)*, v. 74: 497-502.

León-Martínez, F.M., Méndez-Lagunas, L.L., Rodríguez-Ramírez, J., 2010.Spray drying of nopal mucilage (*Opuntia ficus-indica*): Effects on powder properties and characterization, *Carbohydrate Polymers*, Volume 81, 864-870.

Lieberman, H.A. Lachman, L., Schwartz, J.B., 1990. *Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets*, second ed. Marcel Dekker, New York.

List P.H, Schimdt P.C., 1989 . *Phytopharmaceutical Technology*. Boca Raton:CRC.

Masters K., 2002. *Spray drying* in practice. Charlottenlund: Spray Dry Consult International ApS.

Masters, K., 1991. Applications in the food industry. In *Spray drying handbook* 5<sup>th</sup> ed. New York: Longman Scientific & Technical., pp. 587–638.

Newall, C.A., Anderson, L.A., Phillipson, J.D., 1996. *Herbal Medicines: A Guide for Health Care Professionals*, first ed. The Pharmaceutical Press, London.

Newman, A. W., Reutzel-Edens, S. M. and Zografí, G., 2008. Characterization of the “hygroscopic” properties of active pharmaceutical ingredients. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97: 1047–1059.

Oswald, W.F., Kraus, R., Hippeli, S., Benz, B., Volpert, R. &Elstner, E.F. 1992.Comparison of theenzymatic actives of dehydroascorbic acid redutase, glutathioneredutase, catalase, peroxidase and superoxide dismutaseof healthy and damaged spruce needles (*Piceaabies*(L.)Karst).*Plant Physiology* 139: 742-748.

Petrovick, P.R., Lima N. S. A., 1991. Determinação das características de intumescimento de adjuvantes. **Cad. Farm.**, 7:58-60.

Rodríguez Hernández, G. R., González García, R., Grajales Lagunes, A., Ruiz Cabrera, M. A., 2005. Spray drying of cactus pear juice (*Opuntia streptacantha*): Effect on the physicochemical properties of powder and reconstituted product. *Drying Technology*, 23: 955–973.

Saint-Cricq De Gaulejac N, Provost C, Vivas N. Comparative study of polyphenol scavenging activities assessed by different methods. *J Agric Food Chem*.47(2):425-31, 1999.

Sollohub, K. and Cal, K., 2010. Spray drying technique: II. Current applications in pharmaceutical technology. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 99: 587–597.

Tong, H.H., Wong, S.Y., Law, M.W., Chu, K.K., Chow, A.H., 2008. Anti-hygroscopic effect of dextrans in herbal formulations, *Int. J. Pharm.* 363: 99–105.

Tonon, R. V., Barbet, C., Hubinger, N. D., 2008. Influence of process conditions on the physicochemical properties of acai (*Euterpe oleraceae* Mert.) powder produced by spray drying. *Journal of Food Engineering*, 88: 411–418.

United States Pharmacopeia 35-NF 30, 2012. Ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention.

Vehring, R., 2008 Expert Review: Pharmaceutical Particle Engineering via Spray Drying. *Pharm. Res.* 25: 999.

Walton, D. E., Mumford, C. J., 1999. Spray dried products characterization of particle morphology. *Education for Chemical Engineers*, 77: 21–38.

WHO, 2002. Monographs on Selected Medicinal Plants, 2, World Health Organization, Geneva.



## 7. DISCUSSÃO

O presente estudo compreendeu o desenvolvimento do extrato seco de *Amburana cearensis* por *spray-drying*, incluindo caracterização tecnológica e avaliação farmacológica preliminar do produto visando seu emprego como matéria-prima ativa em formulações farmacêuticas indicadas no tratamento da asma leve a moderada. Importante destacar, que essa etapa de estudo de *Amburana cearensis* (cumaru), especialmente de desenvolvimento farmacêutica, só tornou-se possivelmente pela realização de estudos principalmente químicos (CANUTO, 2006; 2008; 2010) e farmacológicos (LEAL, 1995; LEAL, 2006; 2009) da casca do caule da planta. Isso, além de estudos farmacêuticos anteriores relacionados a preparação e caracterização a droga vegetal, bem como do extrato etanólico (ARARUNA, 2008). Assim com base em estudos químicos-farmacológicos anteriores foram selecionados dois compostos majoritários bioativos do cumaru, amburosídeo A (AMB) e cumarina (CM), como marcadores químicos no desenvolvimento do extrato seco da planta por *spray-drying*.

Desenvolver um fitoterápico, assim como todo medicamento, exige um controle de qualidade rigoroso desde o momento de seu planejamento perpassando, também, todas as etapas de produção, a fim de garantir eficácia e segurança terapêutica. Os componentes químicos dos produtos de origem vegetal, bem como as características da matéria-prima, pode sofrer influência tanto de fatores agronômicos, (cultivo, sazonalidade e condições climáticas), como de fatores tecnológicos relacionados ao processamento empregado na transformação de uma droga vegetal em uma forma farmacêutica final, o que dificulta a definição de parâmetros de qualidade, podendo estes variar de acordo com a origem do vegetal (LIST e SCHMIDT, 1989; FARIAS, 2003).

Estudo realizado por Soares e Souza (2013) no quais mostraram que elaboração de formas farmacêuticas contendo extratos vegetais, geralmente, envolve problemas tecnológicos maiores que os encontrados com substâncias ativas isoladas. Isso está relacionado com as características dos próprios extratos, principalmente, devido à necessidade de alta dosagem de uso e complexidade de constituição. Outros fatores, de caráter físico-químico e mecânico, inerentes aos extratos, tais como, higroscopicidade, propriedades materiais e reológicas, constituem barreiras a serem vencidas no seu emprego como matérias-primas num ciclo tecnológico.

Diante do exposto, foi inicialmente desenvolvido e validado método cromatográfico para detecção de AMB e CM em matérias-primas obtidas a partir de *A. cearensis*. O método empregado foi a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), que considerado um dos mais utilizados para as análises farmacêuticas por apresentar inúmeras vantagens como a versatilidade, eficiência de separação, especificidade, razão pela qual se aplica ao monitoramento da estabilidade de fármacos e medicamentos, com possibilidade de quantificação dos produtos de degradação (WATSON, 2005).

Com base em estudos anteriores (CANUTO, 2006; LEAL et al, 2007) foi delineado as características de partida do método analítico para análise dos marcadores em *Amburana cearensis*. Assim, o presente trabalho realizou alterações relacionadas à fase móvel, comprimento de onda e modo de eluição. Essas mudanças foram realizadas mediante monitoramento dos parâmetros de performance cromatográfica (tempo de retenção, resolução cromatográfica, pratos teóricos e fator de assimetria) dos marcadores químicos amburosídeo A (AMB) e cumarina (CM) que permitiram estabelecer o método analítico.

As condições cromatográficas obtidas permitiram uma separação dos marcadores em um curto espaço de tempo sem interferência dos demais componentes da matriz, extrato de cumaru. Durante o desenvolvimento as soluções padrões foram estáveis por 7 dias (-20°C e temperatura ambiente). Isso, com base nas orientações do ICH, que considera estáveis amostras que obtiverem perda do conteúdo de princípio ativo inferior a 2% durante o estudo.

Nos estudos de validação analítica análise de AMB e CM em *A. cearensis*, o método desenvolvido mostrou específico e linear (intervalo: 78-487 µg/ mL;  $r > 0,99$ ) de acordo com os critérios estabelecidos pela ANVISA (BRASIL, 2003). No entanto, segundo Neto e Pimentel (2004) a linearidade de um método analítico não deve ser avaliada apenas pela análise de correlação de coeficiente, o gráfico de resíduos de acordo com esses autores é de grande importância para prever as tendências no método. Nesse contexto, no presente estudo o gráfico de dados residuais gerados apresentaram valores de linearidade dispersas aleatoriamente ao longo do eixo y, ratificando a linearidade do método.

A precisão de um método analítico é avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra, enquanto a exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro (BRASIL, 2003). No presente

estudo os ensaios para a determinação da precisão do método analítico foram realizados em dois níveis: repetibilidade e precisão intermediária, e nessas condições o método mostrou-se preciso para a quantificação dos marcadores químicos, Amburosídeo A e Cumarina, apresentando um coeficiente de variação (CV) menor que 5% (BRASIL, 2003).

A exatidão do presente método foi calculada como porcentagem de recuperação da quantidade conhecida dos marcadores adicionados à amostra, extrato do cumaru. Os baixos valores de CV obtidos indicam precisão adequada das leituras, onde os valores de exatidão obtidos ficaram em torno de 100 % (97,83 – 103,92 %), indicando que o método apresenta capacidade de recuperação satisfatória, e atendendo aos critérios da COFID/ANVISA para fitoterápicos.

Com o intuito de avaliar a robustez do método foram testadas três variações em relação ao método original: fluxo da fase móvel ( $\pm 0,2$  mL min<sup>-1</sup>), variação do pH da fase móvel ( $\pm 0,1$ ), e tipo de coluna (X-Terra e X-Brigde). A comparação entre os desvios do método testado com o obtido no ensaio de precisão no método original forneceu desvios menores que 2%. Desta forma, o método foi considerado robusto.

Prosseguindo os trabalhos, foram realizados estudos relacionados ao desenvolvimento (produção e caracterização) do extrato seco por *spray-drying* a partir do extrato etanólico da casca do caule de *A. cearensis*. Inicialmente, com base em estudo anterior (ARARUNA, 2008) foi investigado a influência de alguns fatores (temperatura do ar de entrada, vazão de alimentação e taxa de fluxo de ar) no processo de produção do extrato seco, visando a otimização do método, e empregando como resposta, a concentração dos marcadores, umidade e rendimento do processo. Isso, com auxílio de um planejamento fatorial 2<sup>3</sup>.

A análise por CLAE-DAD mostrou que a produção do SDP não causou alterações no perfil cromatográfico quando comparado com o EEtOH, isto é, o tempo de retenção dos marcadores químicos amburosídeo A (AMB) e cumarina (CM) do extrato etanólico e SDP de *A. cearensis* foram 4,84 e 10,06 min, respectivamente. A identificação e quantificação destes dois marcadores AMB e CM são muito importante para o controle de qualidade e eficácia dessa matéria-prima ativa.

De acordo com a literatura, a aderência do extrato nas paredes da câmara de secagem do equipamento pode estar relacionada com as condições estabelecidas para o processo de secagem e/ou a baixa eficiência do ciclone utilizado no recolhimento do pó e dos excipientes utilizados (MASTERS 1985; LISTA; SCHIMDT, 1989). No presente

estudo, não houve muita aderência de partículas de sólidos nas paredes da câmara de secagem durante a produção do SDPs. Este resultado é possivelmente relacionado, pelo menos em parte, com o uso de dióxido de silício coloidal como excipiente na formulação do SDP. O dióxido de silício coloidal, que apresenta elevada superfície e alto poder sorvente, tem sido amplamente empregado, apresentando excelentes resultados na obtenção de produtos secos por aspersão a partir de soluções extrativas de diferentes espécies vegetais (DE CAMPOS, 1996; DE SOUZA, 1997).

Os fatores selecionados (temperatura de entrada, fluxo de ar e fluxo de alimentação) para o desenvolvimento do SDP utilizando-se como variáveis de resposta a concentração dos marcadores AMB e CM, a umidade e o rendimento do processo de produção. Os resultados mostraram que as concentrações obtidas para o AMB variaram de  $63,37 \pm 2,68$  mg/g a  $82,87 \pm 1,10$  mg/g.

A análise de variância indicou que o fator mais significativo que afetou a concentração AMB foi fluxo de ar, F calculado: 40,2 p <0,0001 (amostra 2:  $82,87 \pm 1,10$  mg/g; amostra 6:  $63,37 \pm 2,68$  mg/g). Esta variável foi seguida pelo fluxo de alimentação e temperatura de entrada. A concentração em CM no SDP de *A. cearensis* foi significativamente influenciada por todos os fatores investigados. Além disso, foram observadas interações entre os fatores. Neste contexto, os valores de concentração CM no ESAC mostrou uma grande variação, de 4,48 a 26,23 mg/g.

Estudos anteriores desenvolvidos em nosso laboratório (LEAL *et al.*, 2003b, LEAL *et al.*, 2008) mostraram que os marcadores químicos, CM e AMB, têm propriedades anti-inflamatórias e/ou antioxidante em roedores, com as doses de 20 a 50 mg/kg.v.o, respectivamente, além de outros efeitos farmacológicos destas moléculas. Conforme descrito anteriormente a maior concentração de CM no ESAC foi  $26,23 \pm 1,20$  mg/g enquanto que a concentração de AMB foi em torno de 75 mg/g. Portanto, considerando a dose ativa de CM e AMB, o SDP (experimento 7) mostrou ser o mais apropriado para o desenvolvimento do fitoterápico.

Em relação ao teor de umidade do SDP, esta foi significativamente influenciada por todas as variáveis, especialmente o fluxo de alimentação, seguido por temperatura de entrada e fluxo de ar. Estes resultados corroboram estudos anteriores. Segundo Tonon e colaboradores (2008) elevada temperatura de entrada há um maior gradiente de temperatura entre o fluxo de alimentação e o fluxo de ar, resultando numa maior rapidez na evaporação da água, produzindo pós com baixo conteúdo umidade. Grabowski *et al.*,

(2006) também observaram uma redução do conteúdo de umidade do pó com o aumento da temperatura, estudando a secagem por *spray drying* de purê de batata doce.

No presente estudo, o fluxo de alimentação foi a variável que apresentou maior influência no conteúdo de umidade conteúdo do SDP de *A. cearensis*. O fluxo de alimentação afetou negativamente o conteúdo de umidade do pó. Conforme Kurozawa *et al.*, (2009) fluxos de ar alto implicam em um menor tempo de contato entre o fluxo alimentação e o fluxo de ar, tornando a transferência de calor menos eficaz, resultando em menos água evaporação.

O extrato obtido foi então submetido à caracterização tecnológica, como análise da higroscopicidade, propriedades reológicas, morfologia, tamanho de partícula e avaliação microbiológica.

A densidade de um pó está diretamente ligada à estrutura das partículas e, conseqüentemente, à capacidade de fluxo e compressão (AULTON,2002). Representa parâmetro importante na etapa de desenvolvimento de uma formulação, porém, não há uma escala padrão para determinação dos limites. O estudo da densidade aparente e densidade de compactação são importantes uma vez que a densidade de um pó define a sua embalagem, bem como o comportamento do pó durante o processo de compressão. Não houve diferença significativa entre as densidades do SDP (Extrato Seco de *Amburana cearensis*) obtidos pelo presente método em relação ao método anterior (ARARUNA, 2009). A densidade aparente e de compactação do SDP foram de 0,19 e 0,23 g/mL, respectivamente, um aumento de cerca de 20% quando comparado com o ESAC produzido pelo método anterior (densidade a aparente e compactação: 0,17 e 0,20 g/mL, respectivamente). Os maiores valores de densidade normalmente significa menor fluidez, devido aos muitos pontos de contato entre as partículas, contudo favorece a uma boa compressão dos pós (ALDERBORN, 2005; HERING e KLEINEBUDDE, 2007).

A compressibilidade de um pó é um indicador comumente usado de fluidez e é muitas vezes expresso utilizando o Fator de Hausner que é a razão entre a densidade de compactação e a densidade aparente do pó (HAUSNER, 1967). Compressibilidade é também um dos testes propostos por Carr (CARR, 1965) para a avaliação das propriedades de fluxo do pó. Com base nos dados de densidade acima apresentados, o Fator de Hausner e de Índice Carr do SDP foram 1,17 e 15,1 %, respectivamente, de acordo com a United States Pharmacopeia (USP, 2012), este pó foi considerado de boa fluidez, enquanto o SDP produzido anteriormente possui propriedade de fluxo aceitável.

As propriedades de fluxo de produtos secos estão diretamente relacionadas ao seu comportamento durante o armazenamento, manuseio e processamento (PETROVICK e LIMA, 1991). De acordo com a farmacopeia americana o ângulo de repouso que se apresenta entre 25-30° o fluxo de pó é considerado excelente, entre 31-35° o fluxo é considerado bom e dentro da faixa de 36-40° o fluxo é razoável. Para valores superiores a 41°, o pó tem propriedades de fluxo ruins.

É bem conhecido que o conteúdo de água dos ingredientes ativos farmacêuticos sólidos e excipientes é um parâmetro que tem que ser monitorizada durante todo o processo de desenvolvimento do medicamento, (FABRICANT; FARNSWORTH, 2001; WHO, 2002; GONNISEN, REMON; VERVAET, 2007, LIEBERMAN, LACHMAN; SCHWARTZ, 1990; NEWALL, ANDERSON; PHILLIPSON, 1996; TONG *et al.*, 2008; TONON; BARBET; HUBINGER, 2008). A medida da tendência dos sólidos adsorverem o vapor de água da atmosfera, a temperatura constante com as mudanças na umidade relativa (UR), referidos como uma medida de "higroscopicidade" é uma atividade de rotina na etapa de pré-formulação, a qual pretende fornecer uma avaliação precoce dos potenciais efeitos de umidade sobre as propriedades físicas e químicas dos medicamentos (NEWMAN, REUTZEL-EDENS e ZOGRAFI, 2008).

Este estudo mostrou os perfis de absorção de umidade do extrato seco por *spray drying* de *Amburana cearensis* (SDP) em ambientes com diferentes percentuais de umidade relativa, 8% (KOH), 32,5% (MgCl<sub>2</sub>) e 75% (NaCl). Dessa forma, após o tempo de armazenamento foi evidenciado que as amostras do SDP que estavam nos ambientes com umidade relativa de 8 e 32,5% RH não apresentaram diferença no peso pelo presente método, após 14 dias de exposição. No entanto, em ambiente com umidade relativa de 75% RH, o ESSD apresentou levemente uma maior absorção de umidade do que nas outras condições. Estes resultados classificam o SDP de *A. cearensis* como forma ligeiramente higroscópico, de acordo com a Farmacopeia Europeia (NEWMAN, REUTZEL-EDENS e ZOGRAFI, 2008).

A morfologia das partículas é uma característica determinante do comportamento dos sólidos a granel e sistemas multiparticulados, pois muitas das propriedades físicas e químicas de tais sistemas dependem da forma da partícula e da geometria da superfície. Assim, a caracterização morfológica das partículas é de grande importância na tecnologia farmacêutica. No campo da peletização e granulação, esta característica é considerada um fator crítico para algumas etapas de produção, como as

cápsulas de enchimento, e especialmente a de revestimento de pelets (WALTON e MUMFORD, 1999).

A morfologia da partícula do extrato seco por *spray drying* de *A. cearensis* (SDP) que foi investigada empregando a metodologia da microscopia de varedura (MEV) por meio da geração de microfotografias da partícula formada. O pó apresentou forma esférica e uniforme, uma característica importante para aplicação em formulações farmacêuticas intermediárias ou final, além disso, é dito na literatura científica que as partículas de forma esférica e uniforme favorecem uma rápida dissolução, devido à grande área específica e assim melhora a atividade terapêutica do produto formulado (Aulton,2002).

Na manipulação e processamento de pós, uma compreensão detalhada das distribuições de tamanho de partícula é de fundamental importância para a interpretação dos dados na investigação, controle de qualidade e desenvolvimento de produtos. Na indústria farmacêutica, por exemplo, pós finos são difíceis de manipular devido às propriedades coesivas das partículas (ADI; LARSON; STEWART, 2007).

O diâmetro é a dimensão que melhor caracteriza o tamanho de uma partícula. Entretanto, quando é muito variado, como no caso dos adjuvantes farmacêuticos, este parâmetro isoladamente não é suficiente para descrever os tamanhos de todas as partículas presentes (SILVERMAN; BILLINS; FIRST, 1971; STOCKHAM; FOCHTMAN, 1979).

A descrição da quantidade de partículas com relação ao seu tamanho é chamada de função distribuição. Os dados de medição de tamanho de partícula podem ser apresentados na forma de distribuição de frequência ou de distribuição de frequência acumulada, usando uma combinação do parâmetro de medição com o de quantidade. Por exemplo, diâmetro *versus* porcentagem em número, volume ou massa. Os dados obtidos na medição do tamanho de partícula são classificados de acordo com faixas de tamanhos chamadas intervalos de classe.

Os resultados obtidos para este estudo observou que a distribuição normal e frequência acumulada encontrado para o extrato seco por *spray drying* de *Amburana cearensis* utilizado nas formulações apresentava o tamanho médio em torno de 10  $\mu\text{m}$ .

Considerando os aspectos microbiológicos é estabelecido que a contaminação microbiana de um produto não estéril (especialidade e matéria-prima farmacêutica) pode conduzir não somente à sua deterioração, com as mudanças físicas e químicas associadas, mas também, ao risco de infecção para o usuário. Conseqüentemente, os

produtos farmacêuticos orais e tópicos (cápsulas, comprimidos, suspensões, cremes, etc.), que não são estéreis, devem ser submetidos aos controles da contaminação microbiana (Farmacopéia Brasileira, 2010).

O controle de qualidade microbiológico em amostras de origem vegetal é considerado um parâmetro de controle imprescindível, segundo as exigências dos compêndios farmacopeicos, por se tratar de uma matriz que possui na sua composição substâncias suscetível de contaminação por agentes biológicos prejudiciais a saúde quando não controladas.

Neste contexto foram realizados os ensaios para avaliação da qualidade microbiológica dos extratos seco por *spray drying* de *Amburana cearensis* obtidos nesse estudo empregando as metodologias de contagem microbiológica (*Pour Plate*) e pesquisa de patógenos não sendo observado o crescimento de micro-organismos superior ao limite estabelecido, isto é, limite máximo para contagem total de bactérias aeróbias  $10^4$ UFC/g ou mL e contagem total de fungos/leveduras  $10^3$ UFC/g ou mL, bem como não foi identificado o patógeno (*Escherichia coli* e *Salmonella*) considerados prejudiciais à saúde quando administrado por via oral (Farmacopeia Brasileira,2010). No presente estudo, os resultados obtidos pela análise do SDP mostram que todas as etapas necessárias para obtenção de um produto de origem vegetal atendem aos requisitos de Boas Práticas de Fabricação no quesito qualidade microbiológica que são exigidas pela RDC 17/2010 da ANVISA e, assim, foi assegurado que o fitoproduto obtido cumpre os parâmetros de qualidade e segurança do ponto de vista microbiológico (BRASIL, 2010).

Em linhas gerais, foi observado que o processo de otimização para obtenção do extrato seco por *spray drying* proporcionou melhoras pouco significativas das características reológicas e de compressão, fato este já esperado por ser inerente ao tipo de matriz estudada, contudo o rendimento e o teor de marcadores químicos, AMB e CM, foram consideradas ideais observando a manutenção da segurança e eficácia do produto com base em estudos anteriores (LEAL, 1995; 2006).

Um fato importante a considerar é que a agregação de novas tecnologias no desenvolvimento de fitoprodutos para fins farmacêuticos é relevante, contudo, isso constitui uma etapa do processo onde o sucesso deste trabalho está condicionado pelo menos em parte à manutenção ou garantia da segurança e eficácia do produto desenvolvido. Diante do exposto, o ESAC foi submetido a testes farmacológicos preliminares, como avaliação do potencial antioxidante e antinociceptivo em



camundongos, empregando um modelo de nociceção de origem neurogênica e inflamatória.

A atividade antioxidante do ESAC foi investigada através da sua habilidade em sequestrar dois radicais livres, o radical 1,1- difenil-2-picrilhidrazila (DPPH) e o ânion. O teste do DPPH é baseado na capacidade de redução desse radical, que possui coloração púrpura, por um antioxidante ou uma espécie radicalar, transformando-o no composto difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com conseqüente decréscimo nos valores de absorvância. O ESAC apresentou ação sequestradora do radical DPPH, mas o mesmo não foi observado em relação ao anion superóxido. Possivelmente, parte desse efeito está relacionado a presença do amburosídeo A, glucosídeo fenólico/marcador do ESAC. Isso, considerando que estudos (LEAL, 2006; LEAL et al., 2008; 2009) realizados no nosso laboratório comprovaram o potencial antioxidante desta molécula tanto em modelos *in vitro* quanto *in vivo*.

Estudo anterior (LEAL, 1995; LEAL et al., 1997; 2000; 2010) mostrou que o extrato hidroalcoólico (não padronizado) ou etanólico (padronizado) da casca do caule de *A. cearensi*

s possui efeito antinociceptivo determinado através do modelo da formalina em camundongos, onde pelo menos parte deste efeito parece esta relacionado à participação do sistema opióide. Dessa forma, foi investigado o potencial antinociceptivo do ESAC no modelo da formalina em camundongos, onde o ESAC administrado por via oral (100 e 200 mg/Kg) foi capaz de inibir significativamente a segunda fase (inflamatória) da nociceção induzida pela formalina, na maior dose. Assim, os resultados preliminares obtidos pela avaliação farmacológica do ESAC sugerem que este novo produto manteve o potencial antioxidante e antinociceptivo/anti-inflamatório de *Amburana cearensis*.

## 9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A casca do caule de *Amburana cearensis* (cumaru) é uma espécie que possui uma descrição química bastante elucidativa. Além disso, o extrato do cumaru e alguns constituintes químicos (cumarina, amburosídeo A, isocampferídio e afromosina) possuem propriedades farmacológicas, incluindo-se atividades, anti-inflamatória, antioxidante e/ou efeito relaxante músculo traqueal em roedor, que corroboram com o principal uso tradicional do cumaru, ou seja, no tratamento da asma. Estudos não-clínicos e clínicos preliminares do extrato ou xarope de cumaru têm mostrado um grau de segurança aceitável, além de eficácia para o tratamento da asma. Assim, esse acúmulo de informações científicas motivou a realização do presente estudo.

O estudo permitiu o desenvolvimento e validação de método analítico por CLAE-DAD aplicável no controle de qualidade de produtos derivados de *A. cearensis* (marcadores: amburosídeo A e cumarina), onde o presente método mostrou-se específico, linear, preciso e exato à luz da regulamentação atual (BRASIL, 2003). Ainda, com auxílio deste método foi possível otimizar o método de produção do extrato seco por *spray-drying* de *Amburana cearensis* padronizado, que foi por sua caracterizado do ponto de vista tecnológico.

O extrato seco de *Amburana cearensis* mostrou efeito antioxidante e antinociceptivo em modelo de nocicepção induzida por formalina em camundongos, estando este efeito possivelmente relacionado ao potencial anti-inflamatório da planta.

Certamente, os resultado obtidos no presente estudo irão fomentar o desenvolvimento de um fitoterápico a médio e longo prazo indicado para o tratamento da asma leve a moderada. Nesse contexto, importante destacar que *Amburana cearensis* compõe a relação de espécies empregadas em Programa Públicos de Fitoterapia na região, além de seu uso como matéria-prima por Indústrias Farmacêuticas.

## 10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

ALMEIDA, J. R. G. S. et al. *Amburana cearensis* – uma revisão química e farmacológica. **Scientia Plena**, v. 6, n. 11, 2010.

ARARUNA, S.M. **Desenvolvimento e Padronização (HPLC-DAD) do Extrato Seco por Spray Dryer de Amburana cearensis A. C. Smith (Cumaru)**. Dissertação de Mestrado – Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

ARARUNA, S.M.; LEAL, L.K.A.M.; CANUTO, K.M. *et al.* Desenvolvimento e validação de método (CLAE-DAD) para o controle de qualidade das cápsulas de *Amburana cearensis* (cumaru): dosagem de amburosídeo A (AMB) e cumarina (CM). **1º Workshop Brasileiro de Tecnologia Farmacêutica e Inovação-Novas tecnologias e os desafios da parceria Universidade/Empresa**, Aracaju. 2011.

ARARUNA, S.M.; SILVA, A.H.; CANUTO, K.M. *et al.* Influence of process conditions on the physicochemical characteristics of cumaru (*Amburana cearensis*) powder produced by *spray drying*. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 23, n. 1, 2013.

BASTOS, C.R.V. **Contribuição ao conhecimento químico de plantas do nordeste, *Torreseacearensis* Fr Allen**. 1983. 210p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

BONATI, A. Problems relating to the preparation and use of extracts from medicinal plants. **Fitoterapia**, v.1, n.1, p.5-12, 1980.

BOX, G.E.P., HUNTER, W.G., AND HUNTER, J.S.: 1978, *Statistics for Experimenters: an Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building*. **John Wiley & Sons**. New York.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consolidado de normas da COFID (Coordenação de Fitoterápicos, Dinamizados e Notificados), versão III. Brasília, DF, 2010g.

BRASIL. ANVISA. Relatório Inspeção Internacional de Fabricantes de Insumos Farmacêutico Ativo. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/aa2e92804e214937a814bbc09d49251b/RELATORIO+INSPE%C3%87%C3%83O+INTERNACIONAL+INSUMOS+-+Vers%C3%A3o+Final+-+21-12-2012.pdf?MOD=AJPERES>>, acesso em 25 de novembro de 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RE nº 899 de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RE nº 91 de 16 de março de 2004. Determina a publicação do guia para realização de alterações, inclusões, notificações e cancelamentos pós-registro de fitoterápicos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. IN nº 5 de 11 de dezembro de 2008. Dispõe a lista de medicamentos fitoterápicos de registro simplificado. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC nº 10 de 9 de março de 2010. Dispõe sobre a notificação de drogas vegetais junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 2010a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC nº 14 de 31 de março de 2010. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 2010b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. IN nº 5 de 31 de março de 2010. Dispõe a lista de referências bibliográficas para avaliação de segurança e eficácia de fitoterápicos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil** Poder Executivo, Brasília, DF, 2010c.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para a condução de estudos não clínicos de segurança necessários ao desenvolvimento de medicamentos. **Gerência de Avaliação de Segurança e Eficácia - GESEF, Brasília, DF, 2010d.**

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. CP nº 85 de 10 de agosto de 2010. Dispõe sobre as boas práticas de processamento e manipulação de plantas medicinais e fitoterápicos em Farmácias Vivas. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 2010e.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 886 de 20 de abril de 2010. Institui a Farmácia Viva no âmbito do Sistema único de Saúde (SUS). **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 2010f.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC nº 13 de 14 de março de 2013. Dispõe sobre as boas práticas de fabricação de produtos tradicionais fitoterápicos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº. 971, de 03 de maio de 2006. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 2006a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Presidência da República. Decreto n°. 5813 de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 2006b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Presidência da República. Portaria n°. 22 de 30 de outubro de 1967. Estabelece as normas para o emprego de preparações fitoterápicas. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 1997.

BRAVO, J.A.; SAUVAIN, M.; GIMENEZ, A. *et al.* Bioactive phenolic glycosides from *Amburana cearensis*. **Phytochemistry**, v. 50, p. 71-74, 1999.

BROADHEAD J, EDMOND ROUAN SK, Rhodes CT 1992. The spray drying of pharmaceuticals. **Drug Dev Ind Pharm** 18: 1169-1206.

BUTTON, S.T., Metodologia para Planejamento Experimental e Análise de Resultados”, 2005. Campinas - SP.

CALIXTO, J.B., 2000. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Braz J Med Biol Res**, Ribeirão Preto, v. 33, n. 2.

CANUTO, K.M 2007. **Aspectos químicos do estudo interdisciplinar (Química-Agronomia-Farmacologia) de *Amburana cearensis* A.C. Smith**. Fortaleza. Tese de Doutorado, Programa de Pós-graduação em Química, UFC.

CANUTO, K.M, SILVEIRA E.R 2000. Flavonóides de *Amburana cearensis* (Fr. All.) A. C. Smith (cumaru). XVI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil. Recife: Pernambuco, Brasil.

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

CANUTO, K.M.; LEAL, L.K.A.M.; VIANA, G.S.B.; BEZERRA, A.M.E.; SILVEIRA, E. R.. Aspectos químicos do estudo interdisciplinar (química, agronomia e farmacologia) de *A. cearensis*. In: XVIII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, Manaus, AM, 2004.

CARLTON, B. D.; AUBRUN, J. C.; SIMON, G. S. Effects of coumarin following perinatal and chronic exposure in Sprague-Dawley rats and CD-1 mice. **Fundam. Appl. Toxicol.**, v. 30, p. 145-151, 1996.

CARVALHO ELS 1997. **Desenvolvimento de produtos secos nebulizados de *Maytenus ilicifolia* Martius ex Reissek - Celastraceae (espinheira-santa)**. Porto Alegre, 133p. Dissertação de mestrado, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS.

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

CARVALHO, A. C. B. *et al.* Regulação brasileira em plantas medicinais e fitoterápicos. **Revista Fitos**, v. 7, p. 5-16, 2012.

CARVALHO, A.C.B.; NUNES, D.S.G.; BARATELLI, T.G.; QADER, N.S.M.S.A.; NETTO. Aspectos da legislação no controle dos medicamentos fitoterápicos. **T&C Amazônia**, Ano V, Número 11, Junho de 2007.

CASLEY-SMITH, J. R.; MORGAN, R. G.; PILLER, N. B. Treatment of lymphedema of the arms and legs with 5,6-benzo-[ $\alpha$ ]pyrone. **The New England Journal of Medicine**, v. 329, p. 1158–1163, 1993.

COHEN, A. J. Critical review of the toxicology of coumarin with special reference to interspecies differences in metabolism and hepatotoxic response and their significance to man. **Food and Cosmetics Toxicology**, v. 17, p. 277–289, 1979.

CORNELL, J.A. How to run mixture experiments for product quality. Milwaukee: ASQC, 1990. 96p. (The ASQC basic references in quality control, CROWLEY, M. M. SCHROEDER, B.; FREDERSDORF, A.; OBARA, S.; TALARICO, M.; KUCERA, S.; MCGINITY, J. W. Physicochemical properties and mechanism of drug release from ethyl cellulose matrix tablets prepared by direct compression and hot-melt extrusion. **International Journal of Pharmaceutics**, v.269, p. 509-522, 2004.

COSTA-LOTUFO, L. V.; JIMENEZ, P. C.; WILKE, D. V. *et al.* Antiproliferative effects of several compounds isolated from *Amburana cearensis* A. C. Smith. **Z NaturforschC.**, v. 58, p. 675-80, 2003.

COUTO AG 2005. **Desenvolvimento tecnológico de comprimidos a partir do granulado do produto seco por aspersão de *Phyllanthus niruri* e controle de qualidade da matéria-prima vegetal a partir do seu cultivo**. Porto Alegre, 456p. Tese de doutorado, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS.

CUNHA, M.C.J.; FERREIRA, R.A. Aspectos morfológicos da semente e do desenvolvimento da planta jovem de *Amburana cearensis* (Arr. Cam.) A.C.Smith-Cumaru - *Leguminosae Papilionoideae*. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 25, n. 2, p. 89-96, 2003.

DA SILVA FA2007. **Avaliação tecnológica e atividade antioxidante de produtos secos por spray-drying de *Ilex paraguariensis* A. St. Hill. - Aquifoliaceae (erva-mate)**. Porto Alegre, 243p. Tese de doutorado, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS.

DE SOUZA KCB, Petrovick PR, Bassani VL, Gonzalez Ortega G 2000. The adjuvants Aerosil 200 and Gelita-Sol-P influence on the technological characteristics of spray-dried powders from *Passiflora edulis* var. flavicarpa. **Drug Dev Ind Pharm** 26: 331-336.

DE SOUZA TP, Spaniol B, Petrovick PR 2005. Avaliação de comprimidos revestidos por película contendo alta concentração de produto seco por aspersão de *Phyllanthus niruri*. **Acta Farm Bonaerense** 24: 61-67.

DEUTSCHES Arzneibuch, Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart, Germany, 10 edition, 1992.

ERIKSSON, I., JOHANSSON, E., WIKSTRÖN, C. Mixture design – design generation, PLS analysis, and model usage. *Chemom.Intell.Lab. Syst.*, Amsterdam, v.43, p.1-24, 1998. Fundação Calouste Gulbenkian, 2001. p.509-596.

FARIAS MR 2003. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais In: Simões, C.M.O. et al (Org.) 2003. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre / Florianópolis: Ed. Universidade - UFRGS/ Ed. da UFSC.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1998.

FEBRAFARMA 2013. Fitoterápico atrai investimentos. Disponível em: <http://www.febrafarma.org.br/areas.php?area=pu&secao=38&modulo=materias>. Acessada em abril de 2013.

FIGUEREDO, F.G.; FERREIRA, E. O.; LUCENA, B. F. *et al.* Modulation of the antibiotic activity by extracts from *Amburana cearensis* A. C. Smith and *Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan. **Biomed Res Int**. doi: 10.1155/2013/640682. Epub 2012.

FISHER, RONALD.A. (1935). *The Design of Experiments*. Edinburgh: Oliver & Boyd

FONSECA, F.N. **Desenvolvimento tecnológico de fitoproduto a partir de *Justicia pectoralis* – chambá: obtenção do extrato seco padronizado (CLAE-DAD) e avaliação farmacológica**. Dissertação. Mestrado em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2009.

HUI-FAN, X.; CHENG, Y.-Y.; YE, Z.-L.; LIN, R.-C.; QIAN, Z.-Z. Multiple chromatographic fingerprinting and its application to the quality control of herbal medicines. **Analytica Chimica Acta**, v.555, p.217-224, 2006.

INMETRO. INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. DOQ-CGCRE-008: Orientação sobre validação de métodos analíticos .Revisão 04. 2011.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION (ICH) of **Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Validation of analytical procedures**, ICH-Q2A, Geneva; 2005.

KROLL U, CORDES C 2006. Pharmaceutical prerequisites for a multi-target therapy. **Phytomedicine** 13: 12-19.

LACHMAN, L., LIEBERMAN, H.A., KANIG, J.L. **Teoria e prática na indústria farmacêutica**. Lisboa: Fundação Calouste, 2001. 1517p

LAKE, B. G. Coumarin metabolism, toxicity and carcinogenicity: Relevance for human risk assessment. *Food and Chemical Toxicology*, v. 37, p. 423–453, 1999.

LEAL, L. K. A. M. **Contribuição para a validação do uso medicinal de *Amburana cearensis* (cumaru): estudos farmacológicos com o isocampferídio e o amburosídeo**. 2006. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006a.

LEAL, L. K. A. M. **Estudos farmacológicos do extrato hidroalcoólico e constituintes químicos de *Torresea cearensis* Fr. Allem.** 1995. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1995.

LEAL, L. K. A. M. *et al.* A comparative chemical and pharmacological study of standardized extracts and vanillic acid from wild and cultivated *Amburana cearensis* A.C. Smith. *Phytomedicine*, v. 18, p. 230-233, 2011.

LEAL, L. K. A. M. *et al.* Amburoside A, a glucoside from *Amburana cearensis*, protects mesencephalic cells against 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity. *Neurosciences Letters*, v. 388, p. 86-90, 2005.

LEAL, L. K. A. M. *et al.* Análise de timol por CLAE na tintura de *Lippia sidoides* Cham. (alecrim-pimenta) produzida em diferentes estágios de desenvolvimento da planta. *Rev. Bras. Farmacogn.*, v. 13, p. 9-11, 2003c.

LEAL, L. K. A. M. *et al.* Anti-inflammatory and smooth muscle relaxant activities of the hydroalcoholic extract and chemical constituents from *Amburana cearensis* A. C. Smith. *Phytotherapy Research*, v.17, p.335-340, 2003a.

LEAL, L. K. A. M. *et al.* Antinociceptive and antiedematogenic effects of the hydroalcoholic extract and coumarin from *Torresea cearensis* Fr. *All. Phytomedicine*, v.4, p.221-227, 1997.

LEAL, L. K. A. M. *et al.* Antinociceptive, anti-inflammatory and bronchodilator activities of Brazilian medicinal plants containing coumarin: a comparative study. *Journal of Ethnopharmacology*, v.70, p. 151-159, 2000.

LEAL, L. K. A. M. *et al.* Atividade antinociceptiva e antiedematogênica de *Amburana cearensis* (cumaru), silvestre e cultivada, em camundongos – um estudo comparativo. *In: XVIII Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil*, Manaus, 2004.

LEAL, L. K. A. M. *et al.* Effects of amburoside A and isokaempferide, polyphenols from *Amburana cearensis*, on rodent inflammatory processes and myeloperoxidase activity in human neutrophils. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, v. 104, p. 198-205, 2008a.

LEAL, L. K. A. M. *et al.* Mechanisms underlying the relaxation induced by isokaempferide from *Amburana cearensis* in the guinea-pig isolated trachea. *Life Sciences*, v. 79, p. 98-104, 2006b.



LEAL, L. K. A. M. *et al.* Protective effects of amburoside A, a phenol glucoside from *Amburana cearensis*, against CCl<sub>4</sub>-induced hepatotoxicity in rats. **Planta Med.**, v. 74, p. 497-502, 2008b.

LEAL, L. K. A. M. *et al.* Toxicological study of the hydroalcoholic extract from *Amburana cearensis* in rats. **Pharmaceutical Biology**, v. 41, p. 308-314, 2003b.

LEITE, E. J., Stage-of-knowledge on *Amburana cearensis* for genetic conservation in Brazil. **Journal for Nature Conservation**, v. 13, p. 49-65, 2005.

LIMA, N.R. **Desenvolvimento farmacêutico e avaliação farmacológica do extrato padronizado (CLAE-DAD) e constituintes químicos de *Amburana cearensis* (cumaru) cultivada.** Dissertação de Mestrado – Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

LIST P.H, SCHIMDT P.C., 1989 **.Phytopharmaceutical Technology.** Boca Raton: CRC.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil; nativas e exóticas cultivadas.** v. 1. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 512p., 2002.

M. RIBANI, C. B. G. BOTTOLI, C. H. COLLINS, L. C. S. F. JARDIM and L. F. C. MELO, “Validation for Chromatographic and Electrophoretic Methods,” **Química Nova**, Vol. 27, No. 5, 2004, p. 771.

MARINHO, M. G. V.; BRITO, A. G.; CARVALHO, K. A. *et al.* *Amburana cearensis* e Cumarina imunomodulam os níveis de anticorpos antígeno-específicos em camundongos Balb/c sensibilizados com ovalbumina. **Acta Farm. Bonaerense.** v. 23, p. 47-52, 2003.

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

MASTERS, K., 1991. Applications in the food industry. In Spray drying handbook 5<sup>th</sup> ed. New York: **Longman Scientific & Technical.**, pp. 587–638.

MATOS, F.J.A 1994. Farmácias Vivas: Sistema de Utilização de Plantas Medicinais Projetado para Pequenas Comunidades, 2<sup>a</sup> ed. UFC, Fortaleza.

MIGLIATO KF, MOREIRA RRD, MELLO JCP, SACRAMENTO, LVS, CORREA MA, SALGADO HRN 2007. Controle de qualidade do fruto de *Syzygium cumini* (L.) Skells. **Rev Bras Farmacogn** 17: 94-101

MYERS, H.R. & D.C. MONTGOMERY (1995) Response Surface Methodology: Process and product Optimization Using Designed Experiments. New York: John Wiley.

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

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

PERFEITO, JOÃO PAULO SILVÉRIO 2012. **O registro sanitário de medicamentos fitoterápicos no Brasil: uma avaliação da situação atual e das razões de indeferimento**. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde)—Universidade de Brasília.

PETROVICK GF 2006. **Desenvolvimento e avaliação tecnológica de granulado revestido contendo produto seco por spray drying de *Achyrocline satureioides* (Lam) D.C. Asteraceae (marcela)**. Porto Alegre, 200p. Dissertação de mestrado, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS.

QUENTAL, CRISTIANE ET AL. Medicamentos genéricos no Brasil: Impacto das Políticas Públicas sobre a Indústria Nacional. **Ciência & Saúde Coletiva**, N. 13 (SUP.), P. 619-628, 2008

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

RODRIGUES, M. I. AND LEMMA, A. F., Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos: uma estratégia sequencial de planejamentos, Casa do Pão Editora, SÃO PAULO, 2005.

ROTHÄUSER B., KRAUS G., SCHMIDT P.C., Optimization of an effervescent tablet formulation containing spray dried , l-leucine and polyethylene glycol 6000 as lubricants using a central composite design, **Eur. J. Pharm. Biopharm.** 46, 1998, 85 - 94

SÁ-LEITÃO, K. S. **Avaliação toxicológica pré-clínica do extrato seco padronizado (HPLC-PDA) de *Amburana cearensis* – Cumaru**. Monografia - Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P. R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.*. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora da UFSC, p. 371-400, 2004.

SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5.ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2003. p.289-326.

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

SILVA, ALINE HOLANDA. **Desenvolvimento e caracterização do extrato de *Erythrina velutina* para o tratamento de doença neurodegenerativa.** Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Fortaleza, 2012.

SOARES LAL 2002. **Obtenção de comprimidos contendo alto teor de produto seco por aspersão de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek - Celastraceae. Desenvolvimento tecnológico de produtos intermediários e final.** Porto Alegre, 285p. Tese de doutorado, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS.

SOARES, A. K. A.; SAMPAIO, I.L.; SANTANA, G. S. M. *et al.* Estudo de toxicologia clínica de um fitoterápico composto de *Torresea cearensis* em voluntários saudáveis. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais** - Botucatu: Fundação Instituto de Biociências, v. 9, n. 2, p. 55-60, 2007.

SONAGLIO, D.; ORTEGA, G.G.; PETROVICK, P.R.; BASSANI, V.L. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 5.ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2003. p.289-326.

SOUZA, T.P; GOMEZ-AMOZA, J.L.; PACHECO, R.M.; PETROVICK, P.R. Development of granules from *Phyllanthus niruri* spray-dried extract. **Braz. J. Pharm. Sci.** 2009, vol.45, n.4, p. 669-675

PIETERS S, TISTAERT C, *et al.* (2011). Pressurized capillary electrochromatography in a screening for possible antioxidant molecules in *Mallotus* fingerprints: challenges, potentials and prospects. **Talanta** 83 (4): 1188-97.

TREVISAN, M. T. S.; MACÊDO, F. V. V. Seleção de plantas com atividade anticolinesterase para tratamento da doença de Alzheimer. **Química Nova**, v. 36, n. 3. p. 301-304, 2003.

VASCONCELOS, S. M. M.; MACEDO, D. S.; de MELO, C. T.; PAIVA MONTEIRO, A.; RODRIGUES, A. C.; SILVEIRA, E. R.; CUNHA, G. M.; SOUSA, F. C., VIANA, G. S. B. Central activity of hydroalcoholic extracts from *Erythrina velutina* e *Erythrina mulungu* in mice. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 56, n. 3, p. 389-393, 2004.

VASCONCELOS, E. A. F.; MEDEIROS, M. G. F.; RAFFI, F. N.; MOURA, T. F. A. L. Influência da temperatura de secagem e da concentração de Aerosil®200 nas características dos extratos secos por aspersão da *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia.** v. 15, n.3, 2005.

WEGENER T, WAGNER H. The active ingredients and the pharmacological multitarget principle of STW 5 (Iberogast®). **Phytomedicine** 2006, 13, S V, 20-35.

WEHRLÉ P., MAGENHEIM P. and BENITA S. (1995). The influence of process parameters on the PLA nanoparticle size distribution evaluated by means of factorial design. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**,**41**, 19-26.

WEHRLÉ P., NOBELIS P., CUIÑÉ A. and STAMM A. (1993). Response surface methodology: an interesting statistical tool for process optimization and validation. Example of wet granulation in a highshear mixer. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, **19**, 1637-1653

WHO, 2012. Monographs on Selected Medicinal Plants, 2, World Health Organization, Geneva.

XIE, P.; CHEN, S.; LIANG, Y.; WANG, X.; TIAN, R.; UPTON, R. Chromatographic fingerprint analysis-a rational approach for quality assessment of traditional Chinese

ZUANAZZI, JOSÉ ANGELO S. AND MAYORGA, PAULO. Fitoprodutos e Desenvolvimento Econômico. **QUÍM. NOVA** **2010**, VOL.33, N.6 PP. 1421-1428 .