



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

FABRÍCIO HAVY DANTAS DE ANDRADE

**CARACTERIZAÇÃO ANALÍTICA DA MATÉRIA-PRIMA VEGETAL E
EXTRATOS DE *Annona muricata* L.**

Recife

2020

FABRÍCIO HAVY DANTAS DE ANDRADE

**CARACTERIZAÇÃO ANALÍTICA DA MATÉRIA-PRIMA VEGETAL E
EXTRATOS DE *Annona muricata* L.**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Fármacos e Medicamentos

1º Orientador: Profº. Dr. Almir Gonçalves Wanderley

2º Orientador: Profº. Dr. Fábio Santos de Souza

Recife

2020

FABRÍCIO HAVY DANTAS DE ANDRADE

**CARACTERIZAÇÃO ANALÍTICA DA MATÉRIA-PRIMA VEGETAL E
EXTRATOS DE *Annona muricata* L.**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Aprovado em 19 de fevereiro de 2020

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley
Orientador
UFPE

Prof. Dr. Ionaldo José Lima Diniz Basílio
Examinador Interno
UFPB

Prof. Dr. Rui Oliveira Macedo
Examinador Externo
UFPB

Prof. Dr. Fernando Henrique Andrade Nogueira
Examinador Externo
UFRN

Prof. Dr. Cícero Flávio Soares Aragão
Examinador Externo
UFRN

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me protegido e guiado;

Aos meus pais e familiares pelo amor e confiança inabalável;

A minha esposa, Weslânia e a meu filho Miguel, a quem aguardo ansiosamente;

Aos orientadores Fábio Santos de Souza e Almir Gonçalves Wanderlay, pela oportunidade, pelos ensinamentos e tempo dedicado;

Aos Professores Ana Paula Barreto, Beate saegesser, Davi Santana, Rui Macedo, Cícero Aragão e Ionaldo Basílio por aceitarem fazer parte da banca examinadora;

Aos muitos amigos que fiz nesta jornada que iniciou em 2011, na iniciação científica, em especial aos que me acompanharam durante todo o doutoramento, Rayanne, Taynara, Geovana, Azenate, Karla Monik, José Venâncio e tantos outros que fizeram parte do Ludem e do IPeFarM;

Aos Professores Rui Macedo, Taliana Barbosa, Marta Madruga, Cícero Aragão, Fábio Sampaio, Ana Claudia Medeiros, Deysiane Brandão, Rita de Cassia por terem aberto seus laboratórios de pesquisa.

Aos Professores Danilo Bedor, Marcia Ferraz e Felipe Hugo por terem participado da banca de qualificação e contribuído para a melhora deste trabalho

Aos amigos Antônio Marcos, Meyson, Nonato pela ajuda;

A todos os professores e funcionários da PPGCF/UFPE, em especial aos amigos Rilvan e Nerilin;

Aos meus colegas do PPGCF/UFPE;

A CAPES pelo apoio financeiro na realização deste trabalho.

RESUMO

Annona muricata L., Annonaceae, conhecida como “graviola”, chamou a atenção de pesquisadores em vários países, devido suas propriedades anticancerígena, anti-inflamatória, entre outras. No entanto, estudos de obtenção e caracterização da droga vegetal (DV) e derivados, na forma de extratos secos (ES) com rendimento, propriedades reológicas e estabilidade são escassos. Assim, o presente trabalho teve como objetivo obter e caracterizar a DV e os extratos das folhas de *A. muricata*. Foram avaliados o teor de umidade, cinzas totais, matéria estranha, distribuição granulométrica, triagem fitoquímica, teor de flavonoides totais, resíduo seco, densidade relativa, pH aparente e atividade antimicrobiana, conforme a Farmacopeia Brasileira 6ª edição (2019) e literaturas científicas. Um método analítico para quantificação de flavonoides totais por espectroscopia de ultravioleta-visível foi validado, onde a rutina foi utilizada como substância química de referência. O extrato hidroalcoólico foi obtido por maceração utilizando etanol a 70% e uma proporção droga/solvente de 15% (p.v⁻¹). A caracterização térmica e a atividade microbiológica das folhas em diferentes granulometrias (amostras F0, F5, F8, F9 e F10) foram realizadas. As amostras apresentaram atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e ocorreu melhora da atividade com a diminuição do diâmetro médio das partículas. O planejamento fatorial 2³ foi utilizado para obtenção dos ES, onde o dióxido de silício coloidal 200 (DS) foi empregado como adjuvante de secagem. Os ES foram obtidos com rendimentos entre 50,54 e 71,60% e teor de umidade inferior a 5%. A microscopia eletrônica de varredura mostrou partículas esféricas e ocas com tamanhos de partícula que variaram entre 7,26 e 50,60 µm. A estabilidade dos ES foi avaliada por termogravimetria (TG). A energia de ativação foi maior para os pós produzidos em condições brandas de secagem (temperatura de entrada 130 °C e fluxo de alimentação 9 mL.min⁻¹) e concentração de 30% de DS. Os pós apresentaram fluxo entre razoável a muito fraco, influenciados pelo tamanho de partícula e densidades reduzidas; características que não comprometem a aplicação desta matéria-prima devido as tecnologias utilizadas na fabricação de formas farmacêuticas sólidas. O estudo de compatibilidade térmica com excipientes farmacêuticos utilizando TG,

calorimetria exploratória diferencial (DSC) e infravermelho (IV), mostraram mudanças no perfil térmico das misturas. Com a DSC foi possível observar redução da entalpia, antecipação e sobreposição de picos para alguns insumos; enquanto a IV foi fundamental na elucidação de possíveis interações físico-químicas, onde a celulose microcristalina, lactose, croscarmelose sódica e amido glicolato de sódio foram os excipientes mais adequados para o desenvolvimento de um novo medicamento fitoterápico, utilizando o extrato seco das folhas da graviola. A caracterização analítica da DV e obtenção do ES são úteis no desenvolvimento de novos medicamentos, onde os resultados obtidos neste estudo poderão ser usados na transposição de escala e controle de qualidade de produtos originários das folhas de *A. muricata* L.

Palavras-chave: *Annona muricata* L. Graviola. Folhas de planta. Plantas medicinais. Fitoterapia.

ABSTRACT

Annona muricata L, Annonaceae, known as “graviola”, has caught the attention of researchers in several countries, due to its anti-cancer, anti-inflammatory properties, among others, however, characterization studies and obtaining the plant drug (PD) and derivatives, in the form of dry extracts (DE) with yield, rheological properties and stability are scarce. Thus, the present work had as objective to obtain and to characterize the PD and the extracts of the leaves of *A. muricata*. The moisture content, total ash, foreign material, granulometry size distribution, phytochemical screening, total flavonoid content, dry residue, relative density, apparent pH and microbiological activity were evaluated according to the Brazilian Pharmacopoeia 6th edition (2019) and scientific literature. An analytical method for quantifying total flavonoids by ultraviolet-visible spectroscopy was validated, where rutin was used as a standard. The hydroalcoholic extract (HE) was obtained by maceration using 70% ethanol and a drug/solvent ratio of 15% (w.v⁻¹). The thermal characterization and microbiological activity of the leaves in different grain sizes (samples F0, F5, F8, F9 and F10) were performed. The samples showed antimicrobial active against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* and there was an improvement of activity with the reduction of the average particle diameter. A 2³ experimental design was used to obtain the DE, where colloidal silicon dioxide 200 (CSD) was used as a drying adjuvant. The DE were obtained with yield between 50.54% and 71.60% and moisture content below 5%. Scanning electron microscopy showed spherical and hollow particles with particle sizes ranging between 7.26 and 50.60 µm. The stability of the DE was evaluated by thermogravimetry (TG). The activation energy was higher for powders produced under mild drying conditions (inlet temperature 130 °C and feed flow 9 mL.min⁻¹) and DS concentration at 30%. The powders showed flow rate between fair to very poor, influenced by particle size and reduced density; characteristic that does not compromise the application of this raw material due to the technologies used in the manufacture of solid pharmaceutical forms. The thermal compatibility study with pharmaceutical excipients using TG, differential scanning calorimetry (DSC) and Infrared spectroscopy (IR) showed a change in the thermal profile of the mixtures. With the DSC it was possible to observe enthalpy reduction, anticipation and overlapping of peaks for some excipients; while with IR it was possible to observe some

physicochemical interactions, where microcrystalline cellulose, lactose, croscarmellose sodium and sodium starch glycolate were the most suitable excipients for the development of a new herbal medicine, using the dry extract of the *A. muricata* leaves. The analytical characterization of PD and obtaining of DE are useful in the development of new drugs, where the results obtained in this study can be employed in scale-up and quality control of products originating from the *A. muricata L.* leaves.

Keywords: *Annona muricata* L. Graviola. Plant leaves. Medicinal plants. Phytotherapy

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Annona muricata</i> L. (graviola)	21
Figura 2 – Classe de metabólitos secundários presentes na <i>A. muricata</i> L.	22
Figura 3 - Granulometria de pós das folhas de <i>A. muricata</i> L.	49
Figura 4 - Fotomicrografias das folhas pulverizadas de <i>A. muricata</i> L.	50
Figura 5 - Curvas TG de <i>A. muricata</i> em atmosferas de nitrogênio e ar sintético e β de 10 °C.min ⁻¹	51
Figura 6 - Curvas TG das folhas de <i>A. muricata</i> em tamanhos de partícula, taxas de aquecimento e atmosferas diferentes	54
Figura 7 - Espectros de UV-vis do extrato fluido e solução padrão de rutina.....	60
Figura 8 - Curvas da linearidade e equação da reta	61
Figura 9 - Parâmetros estatísticos obtidos na análise dos resíduos da linearidade do método para determinação do teor de <i>FT</i> utilizando espectroscopia Uv-vis	62
Figura 10 - Curvas do efeito matriz	63
Figura 11 - Espectros UV-vis das amostras na robustez	65
Figura 12 - Modelo superfície resposta (MSR) e Diagrama de Pareto para as variáveis independentes do planejamento fatorial.....	67
Figura 13 - Relação entre a fator de Hausner e o tamanho das partículas	74
Figura 14 - Curvas TG dos extratos secos das folhas de graviola em atmosfera de nitrogênio e β de 10 °C.min ⁻¹	77
Figura 15 - Fotomicrografias do extrato seco de <i>A. muricata</i>	79
Figura 16 - Curvas TG e DSC do ES de <i>A. muricata</i> , em atmosfera de nitrogênio e β 10 °C.min ⁻¹	80
Figura 17 - Espectro de absorção no infravermelho do extrato seco de <i>A. muricata</i>	81
Figura 18 - Curvas DSC das misturas físicas de <i>A. muricata</i> e excipientes.....	82
Figura 19 - Curvas TG das misturas físicas de <i>A. muricata</i> e excipientes	83
Figura 20 - Espectros de IV das misturas físicas de <i>A. muricata</i> e excipientes	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Escala de fluidez	31
Tabela 2 - Insumos farmacêuticos usados para o estudo de compatibilidade	46
Tabela 3 - Caracterização físico-química da droga vegetal e EHA de <i>A. muricata</i> ...	48
Tabela 4 - Dados termogravimétricos de <i>A. muricata</i> em atmosfera de nitrogênio e β 10 °C.min ⁻¹ em diferentes tamanhos de partícula.....	51
Tabela 5 - Dados termogravimétricos de <i>A. muricata</i> em atmosfera de ar sintético e β de 10 °C.min ⁻¹ em diferentes tamanhos de partícula.....	53
Tabela 6 - Determinação das diferenças estatísticas entre as amostras usando o <i>p</i> -valor em taxas de aquecimento e atmosferas diferentes	56
Tabela 7 - Tripleto cinético de Arrhenius calculado usando o modelo cinético de Ozawa para as folhas de graviola em tamanhos de partícula e atmosferas diferentes.....	57
Tabela 8 - Atividade antimicrobiana e determinação da CIM das folhas da graviola contra microrganismos.	58
Tabela 9 - Triagem fitoquímica do extrato hidroalcoólico de <i>A. muricata</i>	59
Tabela 10 - Absorbâncias relativas as curvas de calibração obtidas no estudo de linearidade	61
Tabela 11 - Parâmetros estatísticos da linearidade	62
Tabela 12 - Repetibilidade, precisão intermediária e exatidão em três diferentes níveis	64
Tabela 13 - Dados para avaliação da robustez considerando diferentes pH e AlCl ₃	65
Tabela 14 - Planejamento fatorial 3 ² em diferentes proporções do solvente extrator e droga/solvente e os valores de concentração de <i>FT</i> e resíduo seco	66
Tabela 15 - Análise estatística ANOVA para as variáveis independentes do planejamento fatorial 3 ²	67
Tabela 16 - Projeto experimental para execuções da secagem por aspersão, variáveis independentes e valores de respostas obtidos	71
Tabela 17 - Dados estatísticos ANOVA do planejamento fatorial para secagem do extrato de <i>A. muricata</i>	72
Tabela 18 - Eventos de perda de massa observados para os extratos secos de graviola.....	76
Tabela 19 - Estudo de compatibilidade do extrato seco de <i>A. muricata</i> e excipientes usando DSC e TG em atmosfera de nitrogênio e β 10 °C.min ⁻¹	86

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

Δm	Variação de massa
FA	Fluxo de alimentação
ADS	Adjuvante de secagem
AGlic	Amido glicolato de sódio
AIR	Atmosfera de ar sintético
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AR	Ângulo de Repouso
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Trifosfato de Adenosina
B	Temperatura de entrada de ar
C	Concentração de adjuvante de secagem
Cel	Celulose Microcristalina
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
Crosc	Croscarmelose sódica
DA	Densidade Aparente
DC	Densidade Compactada
DL ₅₀	Dose Letal média
DRX	Difração de Raio-X
DS	Dióxido de Silício coloidal
DSC	Calorimetria Exploratória diferencial
DTA	Análise Térmica Diferencial
DV	Droga Vegetal
Dv	Diâmetro médio volumétrico das partículas
Ea	Energia de Ativação

EHA	Extrato Hidroalcoólico
ES	Extrato Seco
EstMg	Estearato de Magnésio
A	Fator Frequência ou Fator pré-exponencial de Arrhenius
FH	Fator de Hausner
h	Altura
IC	Índice de Carr
IFA	Insumo Farmacêutico Ativo
IV	Infravermelho com transformada de Fourier
K	Constante de degradação
Lac	Lactose
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
Malt	Maltodextrina
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MF	Mistura Física
n	Ordem de reação
NADH	Nicotinamida Adenina-Dinucleotídeo
Nitro	Atmosfera de nitrogênio
R	Constante geral dos gases (8,31 J.mol ⁻¹ .K ⁻¹)
r	Coeficiente de correlação
ra	Raio
R ²	Coeficiente de determinação
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RP	Rendimento de Processo
SD	<i>Spray Dryer</i>
SISGEN	Sistema Nacional Genético e Conhecimento Tradicional Associado

SQR	Substância Química de Referência
T	Temperatura
TF	Taxa de Fluxo
TG	Termogravimetria ou Análise Termogravimétrica
TU	Teor de Umidade
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UV-vis	Ultravioleta-visível
VA	Volume Bruto ou Volume Aparente
VC	Volume Compactado
β	Taxa de aquecimento

SUMARIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS	19
2.1	OBJETIVO GERAL.....	19
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
3	REFERENCIAL TEÓRICO	20
3.1	<i>Annona muricata</i> L.....	20
3.2	TOXICIDADE DE <i>A. muricata</i> L.....	23
3.3	TECNOLOGIA DE EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO.....	25
3.4	TECNOLOGIAS DE SECAGEM DE EXTRATOS.....	27
3.5	PROPRIEDADES DAS PARTÍCULAS.....	29
3.6	ANÁLISE TÉRMICA APLICADA À DROGAS VEGETAIS E SEUS DERIVADOS.....	32
4	MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1	OBTENÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA VEGETAL.....	37
4.2	DETERMINAÇÃO DE ÁGUA.....	37
4.3	DETERMINAÇÃO DE CINZAS.....	37
4.3.1	Determinação de cinzas totais	37
4.3.2	Determinação de cinzas insolúveis em ácido	38
4.4	GRANULOMETRIA DE PÓS.....	38
4.5	DETERMINAÇÃO DE MATÉRIA ESTRANHA.....	39
4.6	DETERMINAÇÃO DE pH aparente.....	39
4.7	DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE RELATIVA.....	39
4.8	DETERMINAÇÃO DO RESÍDUO SECO.....	40
4.9	TRIAGEM FITOQUÍMICA.....	40
4.10	VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE FLAVONOIDES TOTAIS.....	40

4.11	PREPARO DA AMOSTRA PARA QUANTIFICAÇÃO DE FLAVONOIDES TOTAIS.....	41
4.12	DETERMINAÇÃO DA MELHOR CONDIÇÃO DE EXTRAÇÃO.....	42
4.13	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	42
4.14	CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC).....	42
4.15	ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TG).....	42
4.16	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	43
4.17	<i>SPRAY DRYER</i> E DESENHO EXPERIMENTAL.....	44
4.18	RENDIMENTO DE PROCESSO.....	44
4.19	TEOR DE UMIDADE.....	44
4.20	TAMANHO DE PARTÍCULA.....	45
4.21	DETERMINAÇÃO DAS DENSIDADES APARENTE E COMPACTADA, FATOR DE HAUSNER E ÍNDICE DE CARR.....	45
4.22	DETERMINAÇÃO DO ÂNGULO DE REPOUSO E TAXA DE FLUXO.....	45
4.23	<i>SPRAY DRYER</i> PARA ESTUDO DE PRÉ-FORMULAÇÃO.....	46
4.24	PREPARAÇÃO DA MISTURA FÍSICA.....	46
4.25	ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER COM REFLEXÃO TOTAL ATENUADA (IV).....	47
5	RESULTADO E DISCUSSÃO.....	48
5.1	CARACTERIZAÇÃO DA DROGA VEGETAL E EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE <i>A. muricata</i>	48
5.2	CARACTERIZAÇÃO TÉRMICA DA DROGA VEGETAL EM TAMANHOS DE PARTÍCULA E ATMOSFERAS DIFERENTES....	50
5.3	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS FOLHAS DE <i>A. muricata</i>	57
5.4	TRIAGEM FITOQUÍMICA.....	59
5.5	VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE FLAVONOIDES TOTAIS.....	60
5.6	OTIMIZAÇÃO E PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO.....	66

5.7	OBTENÇÃO E AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS TECNOLÓGICOS DOS EXTRATOS SECOS DE <i>A. muricata</i>	69
5.7.1	Rendimento de processo	69
5.7.2	Teor de Flavonoides totais do extrato seco	70
5.7.3	Teor de umidade	73
5.7.4	Tamanho de Partícula	73
5.7.5	Avaliação das propriedades de fluxo de pós	74
5.7.6	Caraterização e estudo de estabilidade térmica dos extratos secos	75
5.7.7	Microscopia eletrônica de varredura do extrato seco de <i>A. muricata</i>	78
5.8	ESTUDO DE COMPATIBILIDADE DO EXTRATO SECO DA GRAVIOLA E EXCIPIENTES FARMACÊUTICOS.....	79
6	CONCLUSÃO	90
	REFERÊNCIAS	92
	APÊNDICE A – THERMAL CHARACTERIZATION AND MICROBIOLOGY ASSAY OF <i>ANNONA MURICATA</i> L. LEAVES	105
	APÊNDICE B – CHARACTERIZATION AND COMPATIBILITY OF DRY EXTRACT FROM <i>ANNONA MURICATA</i> L. AND PHARMACEUTICAL EXCIPIENTS	106
	APENDICE C – RESUMO DOS MÉTODOS E RESULTADOS ESPERADOS NA OBTENÇÃO DO EXTRATO SECO DAS FOLHAS DA GRAVIOLA	107

1 INTRODUÇÃO

Annona muricata L., Annonaceae, é uma árvore frutífera com um longo histórico de uso tradicional, também conhecida como graviola, é uma planta perene distribuída em regiões tropicais e subtropicais do mundo (PINTO et al., 2005). O gênero *Annona* compreende mais de 70 espécies, entre as quais a graviola é a mais amplamente cultivada (GAVAMUKULYA; WAMUNYOKOLI; EL-SHEMY, 2017) e uma grande variedade de atividades etnobotânicas são atribuídas às diferentes partes da planta (CORIA-TÉLLEZ et al., 2018).

Muitos medicamentos são originários de plantas, aproximadamente 25% dos medicamentos prescritos nos Estados Unidos contêm pelo menos um ingrediente ativo originário do material vegetal, de onde são extraídos das drogas vegetais (DV) ou sintetizados para imitar os ativos vegetais (BYEON et al., 2019). Estudos fitoquímicos revelaram uma grande variedade de metabólitos secundários presentes na graviola tais como alcaloides, polifenóis (CORREA-GORDILLO et al., 2012), flavonoides (NAWWAR et al., 2012), taninos e acetogeninas (CORIA-TÉLLEZ et al., 2018; MOGHADAMTOUSI et al., 2015). Os extratos aquosos e etanólico das folhas de *A. muricata* apresentaram baixa toxicidade aguda com valores de dose letal média (DL₅₀) de 5.000 e 1.600 mg.kg⁻¹, respectivamente (ARTHUR et al., 2011; RADAPONG et al., 2019), Yang et al. (2015) relataram toxicidade crônica, incluindo perda de apetite, perda drástica de peso, atividade e movimento diminuídos, após tratamento por 3 semanas com frações enriquecidas com acetogeninas.

O número de estudos com a *A. muricata* no tratamento de diversas enfermidades vêm aumentando devido as suas atividades farmacológicas promissoras, incluindo atividades anticancerígena (CIJO GEORGE et al., 2012; GAVAMUKULYA et al., 2014), anti-inflamatória e antiartrítica (FOONG; HAMID, 2012), antiparasitária (BOYOM et al., 2011; GOMES et al., 2016), hepatoprotetora (ARTHUR et al., 2012) e hipoglicemiante (FLORENCE et al., 2014).

A dificuldade no desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos está relacionada à sua própria origem, à grande diversidade de constituintes químicos e à variabilidade na qualidade das drogas vegetais obtidas a partir de uma mesma espécie (KLEIN et al., 2009). O desenvolvimento de extratos vegetais padronizados com características químicas, físicas e tecnológicas bem definidas é fundamental na

indústria farmacêutica garantindo a reprodutibilidade na preparação de formulações com qualidade, segurança e eficácia terapêutica (LEITE et al., 2017). Os extratos secos (ES) apresentam melhores características tecnológicas que os extratos líquidos por apresentarem maior facilidade no manuseio, transporte e armazenamento, bem como maior estabilidade química e microbiológica (CORTÉS-ROJAS; OLIVEIRA, 2012).

A produção de ES pode ser realizada por diferentes métodos de secagem, como a secagem por liofilização, rotaevaporação, estufa e nebulização. A secagem por nebulização realizada em *Spray Dryer* (SD) é amplamente difundida na indústria de alimentos, laticínios, agroquímica, química e farmacêutica (JUBAER et al., 2019), os pós produzidos por esta técnica apresentam propriedades físicas controladas como tamanho, forma, densidade e homogeneidade das partículas (SAMPAIO et al., 2016).

A aderência dos extratos às paredes dos secadores, higroscopicidade elevada e pós com propriedades reológicas ruins são frequentemente relatados em pós secos obtidos por nebulização, porém essas características podem ser total ou parcialmente contornadas com ajustes adequados nas condições operacionais dos equipamentos (temperaturas de entrada e saída de ar, fluxo de ar de aspersão, fluxo de alimentação) e adição de adjuvantes de secagem (ADS) aos extratos líquidos, como maltodextrina, goma arábica, amido modificado, ciclodextrinas e dióxido de silício coloidal (DS) (FERNANDES et al., 2014; GALLO et al., 2011).

A caracterização e o controle de qualidade da matéria-prima vegetal e seus extratos são necessários para garantir a reprodutibilidade e, conseqüentemente, a qualidade do produto final. Portanto, o teor do marcador químico, umidade, propriedades reológicas e estabilidade devem ser verificadas, dentre as técnicas utilizadas para avaliar a estabilidade dos insumos farmacêuticos sintéticos e naturais temos as técnicas térmicas. As técnicas térmicas foram utilizadas na caracterização, estudo de compatibilidade e determinação dos parâmetros cinético de drogas vegetais e seus derivados, podendo estas técnicas serem utilizadas como ferramentas preditivas da estabilidade (BRANDÃO et al., 2016; CORREIA et al., 2015, 2018; DE ANDRADE et al., 2019; GUIMARÃES et al., 2018).

Para a produção de extratos secos com propriedades farmacêuticas adequadas, um delineamento experimental pode ser empregado, reduzindo assim as variáveis experimentais e acelerando o desenvolvimento de novos produtos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar a droga vegetal e obter extratos secos padronizados das folhas de *Annona muricata* L.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Realizar a caracterização físico-química das folhas pulverizadas de *A. muricata*;
Validar um método analítico para a quantificação e o controle de qualidade dos extratos de *A. muricata* por espectroscopia UV-vis;

Padronizar o extrato hidroalcoólico das folhas de *A. muricata*;

Avaliar a atividade antimicrobiana e caracterizar por termogravimetria, técnicas não térmicas a droga vegetal em diferentes tamanhos de partícula;

Obter e caracterizar os extratos secos por *spray dryer* utilizando planejamento fatorial completo;

Realizar estudos de compatibilidade do extrato seco e insumos farmacêuticos.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 *Annona muricata* L.

Annona muricata L. (Figura 1) é conhecida popularmente como graviola (português), *soursop* (inglês) e *guanábana* (espanhol latino-americano), pertencente ao gênero *Annona*, família Annonaceae, ordem Magnoliales e Divisão Magnoliophyta (PINTO et al., 2005). Este gênero compreende mais de 70 espécies, entre as quais a *A. muricata* é a mais cultivada (GAVAMUKULYA; WAMUNYOKOLI; EL-SHEMY, 2017). A graviola distribui-se nas regiões tropicais da América Central e do Sul, da África Ocidental e do Sudeste Asiático, crescendo em altitudes abaixo de 1.200 metros do nível do mar, umidade relativa entre 60 e 80%, e precipitação anual acima de 1.500 mm (PINTO et al., 2005). No Brasil, o cultivo da graviola é predominante em zonas de baixas altitudes nas regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste, com destaque para a Bahia, Alagoas, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Pará e Minas Gerais (DE LEMOS, 2014).

Os frutos da graviola são utilizados na produção de sucos, sorvetes, geleias, entre outros (SÃO JOSÉ et al., 2014). Na medicina popular, todas as partes da planta são utilizadas, onde o consumo *in natura*, sucos e decoctos foram os mais citados (CORIA-TÉLLEZ et al., 2018). As frutas são usadas para tratar problemas hepáticos, as sementes e caule antiparasitários, as raízes convulsões e diarreia e as folhas como antiespasmódico, hipoglicemiante, anti-inflamatório e antiartrítico (CORIA-TÉLLEZ et al., 2018; MOGHADAMTOUSI et al., 2015; PINTO et al., 2005; WAHAB et al., 2018)

No Brasil, estudos sobre o uso tradicional foram realizados nos estados de Rondônia, Ceará, Pernambuco, Bahia e Minas Gerais, onde as folhas são utilizadas para a perda de massa corporal, mas também existem relatos para o tratamento de infecções, picadas de cobras, câncer, dispneia, hipertensão, diabetes, febre, inflamação, dor lombar e tonturas (CERCATO et al., 2015).

Relatos etnobotânicos citam a utilização das cascas do caule da graviola para tratar diabetes, em comunidades africanas, em especial no Gabão (TAIKA et al., 2018). O extrato aquoso das folhas de graviola induziram redução dos níveis de glicose sanguínea em ratos (FLORENCE et al., 2014).

Figura 1 - *Annona muricata* L. (graviola)



Legenda: A - árvore, B - Folhas, C - Flor, D - Fruto, E - Sementes. Fonte: WAHAB et al., 2018

Na Tailândia, as folhas e os frutos são usadas para tratar hipertensão (NEAMSUVAN; KOMONHIRAN; BOONMING, 2018). O extrato aquoso dos frutos mostraram inibição da enzima conversora da angiotensina I (ADEFEGHA; OYELEYE; OBOH, 2015). No sul de Gana, as raízes são utilizadas para o tratamento de malária (ASASE; HESSE; SIMMONDS, 2012). No Suriname, é utilizada para tratar hipertensão, tonturas e fratura óssea (VAN'T KLOOSTER; VAN ANDEL; REIS, 2016).

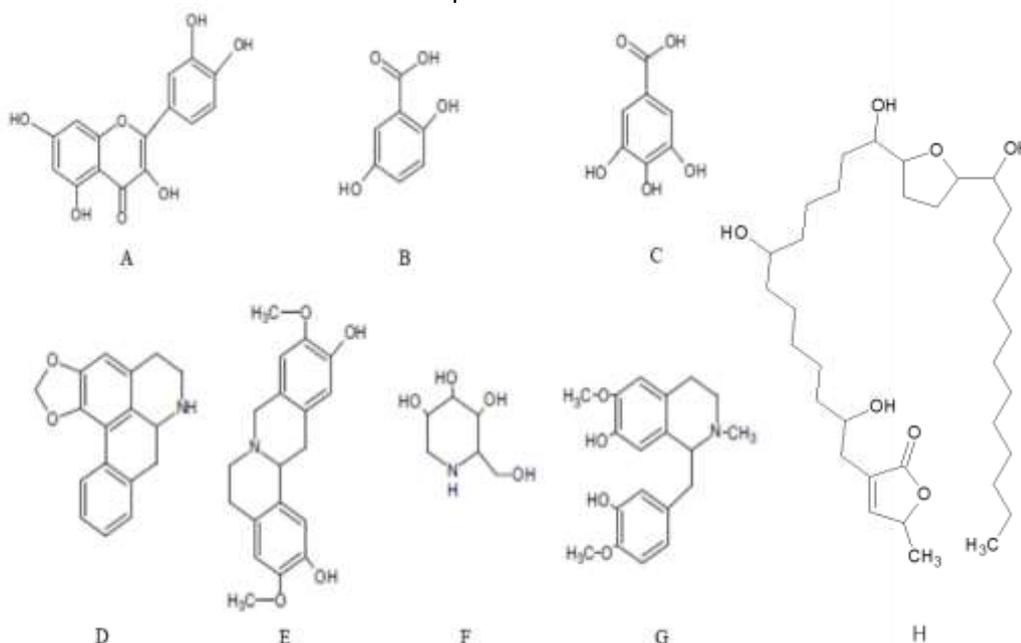
Os extratos de *A. muricata* mostraram atividade contra os protozoários *Leishmania* sp, *Trypanosoma cruzi* e *Plasmodium falciparum* (OSORIO et al., 2007). O extrato etanólico proporcionou 100% de mortalidade das larvas do *Aedes aegypti* e vermes adultos de *Biomphalaria glabrata* (LUNA et al., 2005).

No México, a graviola é utilizada para tratar o câncer no intestino (ALONSO-CASTRO et al., 2011). Os extratos aquosos e etanólicos das folhas de graviola foram testados contra diversas linhagens de células tumorais e o extrato etanólico foi citotóxico para todas as células tumorais estudadas, enquanto o extrato aquoso não

apresentou atividade citotóxica nas concentrações estudadas (GAVAMUKULYA et al., 2014). Preparações contendo *A. muricata* também inibiram o crescimento de linhagens celulares que provocam o câncer de mama e próstata (NAJMUDDIN et al., 2016; YANG et al., 2015)

A graviola possui diversos metabólitos secundários descritos (Figura 2) como polifenóis, flavonoides, alcaloides, taninos, saponinas e acetogeninas (ALALI; LIU; MCLAUGHLIN, 1999; CIJO GEORGE et al., 2012; CORIA-TÉLLEZ et al., 2018; MATSUSHIGE et al., 2012; MOGHADAMTOUSI et al., 2015; NAWWAR et al., 2012; YANG et al., 2010).

Figura 2 – Classe de metabólitos secundários presentes na *A. muricata* L.



Legenda: A-Flavonoide, B-Hidroquinona, C-Tanino, D-G diferentes alcaloides, H-Acetogenina. Fonte: Adaptado de CORRIA-TELLEZ et al. (2018)

Os compostos fenólicos (ácidos fenólicos, flavonoides, antocianinas, taninos, tocoferóis e ligninas) são considerados moléculas bioativas importantes, principalmente, devido as suas propriedades antioxidantes, representando um amplo grupo de metabólitos secundários, com potencial no controle e prevenção de certos tipos de câncer, doenças cardiovasculares, doenças autoimunes e no processo de envelhecimento (VIEIRA et al., 2017). Trinta e quatro compostos fenólicos foram isolados das folhas de *A. muricata* (WAHAB et al., 2018), sendo a rutina o flavonoide majoritário (YANG et al., 2015).

As acetogeninas são uma série de compostos contendo 35 ou 37 carbonos, derivados de ácidos graxos com 32 ou 34 carbonos, são geralmente caracterizadas por uma longa cadeia alifática e um anel terminal de γ -lactona α,β -insaturado metil-substituído (Figura 2H), contendo um, dois ou três anéis de tetrahydrofurano (THF) localizados ao longo da cadeia de hidrocarbonetos e um número variável de grupos oxigenados (hidroxilos, acetoxilos, cetonas, epóxidos) e/ou ligações duplas, também podem ser encontrados, em menor grau, compostos com anel tetrahidropirano (THP) e compostos acíclicos (ZAFRA-POLO et al., 1996).

As acetogeninas possuem capacidade de inibição do complexo I (NADH:ubiquinona oxidoreductase) em sistemas de transporte de elétrons mitocondriais de mamíferos e insetos e são os compostos com maior capacidade de inibição do complexo I conhecidos, além disso, são potentes inibidores da Nicotinamida-Adenina-Dinucleotídeo (NADH oxidase) das membranas plasmáticas das células cancerígenas, essas ações diminuem a produção oxidativa, bem como a concentração citosólica do trifosfato de adenosina (ATP). A redução do ATP nas células tumorais leva as células a apoptose (ALALI; LIU; MCLAUGHLIN, 1999; CHAMPY et al., 2005; CORIA-TÉLLEZ et al., 2018; CORTES; FIGADERE; CAVÉ, 1993; MCLAUGHLIN, 2008; RASAI; GEORGE; KANTHARAJAH, 1995; ZAFRA-POLO et al., 1996).

Estudos *in silico* relacionaram os efeitos anticancerígenos dos extratos de graviola a uma via antiapoptótica regulada pelas proteínas survivina e Bcl-2 (GAVAMUKULYA et al., 2017). Estudos de *Docking* molecular foram realizados para identificar a interação entre os metabólitos secundários da planta e alvos moleculares no câncer de mama, o rastreamento provou que a coclaurina, coreximina e sinefrina foram os constituintes que inibem as proteínas Bcl-2 e survivina envolvidos na via antiapoptótica (MUTHU; DURAIRAJ, 2016).

3.2 TOXICIDADE DE *A. muricata* L.

Em um estudo de caso relacionou-se o consumo de chás e frutas de Annonaceae (*A. muricata* e *A. squamosa*) ao Parkinson atípico em Guadalupe nas Antilhas francesa (CAPARROS-LEFEBVRE; ELBAZ, 1999). O Parkinson atípico é caracterizado por acinesia e rigidez sem a presença de tremor (BARBOSA; SALLEM,

2005). Champy et al. (2003) estudaram os efeitos neurodegenerativos da annonacina (Figura 2h) em ratos e observaram que os achados neurológicos se assemelharam aos observados por Caparros-Lefebvre et al. (2002) em pacientes com parkinsonismo atípico de Guadalupe.

A toxicidade aguda do extrato etanólico das folhas de graviola por via oral apresentou DL_{50} de 1.670 mg.kg^{-1} (DE SOUSA et al., 2010).

O extrato aquoso não apresentou toxicidade aguda nas dosagens estudadas 100, 1.000, 2.500 e 5.000 mg.kg^{-1} , mas toxicidade sub-crônica, em ratos tratados por 14 dias, observou-se perdas de massa corporal para as fêmeas e aumento da massa do útero nas doses de 1.000 e 2.500 mg.kg^{-1} em comparação ao grupo controle, ocorreu aumento dos níveis de creatinina na dose de 2500 mg.kg^{-1} , também foi observado redução dos níveis de glicose e colesterol de baixa densidade no sangue (ARTHUR et al., 2011).

A toxicidade do extrato etanólico e suas frações enriquecidas de acetogeninas (FRA) e enriquecidas de flavonoides (FRF) foram avaliadas. A FRA mostrou toxicidade nos animais após 3 semanas de tratamento, para o extrato etanólico e FRF não foi observado toxicidade após 4 semanas de tratamento com uma dosagem de 2.000 mg.kg^{-1} por dia (YANG et al., 2015).

A toxicidade crônica do extrato aquoso foi avaliada em ratos durante 26 semanas. Os animais apresentaram ganho de massa corporal em todos os grupos estudados, inclusive no grupo controle, não houve alterações na ingestão de alimentos ou comportamento geral dos animais tratados, e nenhum sinal de doença sistêmica; além disso, não foram encontrados distúrbios sistêmicos no exame histopatológico de nenhum órgão visceral (RADAPONG et al., 2019).

Os extratos aquosos e etanólico apresentaram baixa toxicidade aguda com valores de DL_{50} maiores que 5.000 e 1.600 mg.kg^{-1} , respectivamente. Existe o risco de toxicidade renal em doses superiores a 2000 mg.kg^{-1} (ARTHUR et al., 2011; RADAPONG et al., 2019).

3.3 TECNOLOGIA DE EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO

A atividade farmacológica está relacionada à concentração e aos constituintes presentes nas plantas medicinais e a aplicação de métodos de extração eficientes é primordial no estudo e desenvolvimento de novos produtos.

Métodos de extração foram relatados na literatura e a extração sólido-líquido é o método mais usado para isolamento de compostos vegetais (CASTRO-LÓPEZ et al., 2017). A decocção, a maceração e a percolação (métodos convencionais) são os métodos mais utilizados, mas existem os métodos não-convencionais, como ultrassom, líquido pressurizado e fluido supercrítico. Enquanto os métodos convencionais dispõem um maior volume de solvente e tempo para a obtenção de resultados, as metodologias não-convencionais vêm se mostrando mais eficazes, reduzindo estes parâmetros, entretanto, os custos destes processos ainda são altos, o que pode em muitos casos tornar o custo-benefício inviável (MEREGALLI, 2017), além das técnicas utilizadas para extração, outras variáveis podem ser alteradas buscando maior eficiência como diferentes solventes e misturas desses, temperatura, pressão, agitação, entre outros.

Estudos anteriores relataram a extração dos metabólitos secundários de graviola por maceração, percolação, decocção, ultrassom, micro-ondas e fluido supercrítico, também foram utilizados hexano, diclorometano, clorofórmio, metanol, etanol e água como solventes extratores (CHUN et al., 2018; FERNÁNDEZ et al., 2017; MORAES et al., 2018; YANG et al., 2009).

A extração dos metabólitos secundários presentes nas folhas da graviola foi avaliada utilizando os solventes: etanol, acetato de etila, diclorometano, acetona e clorofórmio puros e em misturas, uma mistura centroide simples foi empregada, as amostras foram comparadas a partir do rendimento de material extraído em massa e quantidades e áreas de picos observados nos cromatogramas obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Os melhores rendimentos foram obtidos com etanol puro e mistura de etanol-diclorometano-acetona para a fração orgânica, já na fração básica as melhores extrações ocorreram com misturas quaternárias e quinária (DE SOUZA et al., 2009).

A extração dos metabólitos secundários presentes na polpa da graviola foi avaliada utilizando clorofórmio, metanol, acetato de etila, água e os métodos de extração: soxhlet, sonicação e micro-ondas. A sonicação foi o método mais eficaz para

extrair as acetogeninas e os polifenóis e os melhores solventes foram o acetato de etila e metanol para acetogeninas e polifenóis, respectivamente (FERNÁNDEZ, 2017).

A extração aquosa de polifenóis e flavonoides presentes nas folhas da *A. muricata* foram avaliadas utilizando diferentes métodos de extração (infusão, decocção, ultrassom, micro-ondas e ultrassom + micro-ondas), na qual, a extração usando ultrassom + micro-ondas foi o mais eficiente, com ganho de eficiência de extração dos flavonoides de quase 100% em relação ao segundo melhor método de extração (micro-ondas) (CHUN et al., 2018).

As acetogeninas das folhas da graviola foram extraídas utilizando metanol e etanol seco a quente pressurizado e infuso aquoso. A annonacina e esquamocina foram utilizadas como padrões e a CLAE acoplada a espectrômetro de massas foi utilizada para quantificação dos compostos. A concentração de annonacina foi de 305 e 0,65 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ para o metanol e o infuso aquoso, respectivamente. As acetogeninas tem características apolares e a extração aquosa possui baixa capacidade de extração destes constituintes (DE MORAES et al., 2016).

Muitos produtos originários de drogas vegetais inclui um passo de extração, onde o solvente e as condições de extração precisam ser otimizadas para maximizar os componentes bioativos no produto. A qualidade das preparações deve ser determinada quer com base nos constituintes do marcador, quer com base em impressões digitais analíticas. Portanto, todas as fases de produção devem ser acompanhadas de medidas adequadas para a avaliação da qualidade (PFERSCHY-WENZIG; BAUER, 2015).

No intuito de controlar a qualidade dos produtos elaborados pela indústria farmacêutica, o desenvolvimento de métodos analíticos que resultem em respostas rápidas, precisas, e com baixo custo, são fatores chave para o desenvolvimento de um medicamento. Neste ponto, as ciências analíticas desempenham um papel fundamental no estabelecimento de protocolos analíticos compreendendo desde o preparo da amostra até identificação e quantificação das espécies de interesse (NAGESWARA RAO; NAGARAJU, 2003).

Ferramentas analíticas foram utilizados para a identificação e quantificação dos metabólitos secundários da graviola. A cromatografia líquida é a metodologia analítica para quantificação de compostos bioativos mais utilizada (DE MORAES et al., 2016; GROMEK; HOCQUEMILLER; CAVÉ, 1994; JIMÉNEZ et al., 2014; YANG et al., 2015, 2010), devido à sua sensibilidade e especificidade, ela consegue separar, identificar

e quantificar metabólitos secundários individuais. Suas análises podem ser rápidas a depender da metodologia empregada e necessitam de padrões analíticos de referência.

A ressonância magnética nuclear (RMN) apresentou-se como um método de fácil utilização devido ao rápido preparo e análise das amostras e baixas quantidades de solvente, além de dispensar a utilização de padrões analíticos na identificação e quantificação (MACHADO et al., 2014), no entanto a RMN é uma técnica com custo de aquisição e manutenção alta e pouco disponível. A espectroscopia ultravioleta-visível (UV-vis) também apresenta-se como uma metodologia rápida de análise e utiliza baixas quantidades de solvente, possui um custo de aquisição e manutenção muito inferior as técnicas anteriormente citadas e pode ser encontrada na maioria dos laboratórios (MULIA et al., 2015; OJEZELE, OJEZELE, ADEOSUN, 2016; SHIBULA, VELAVAN, 2016). Quanto suas limitações, a espectroscopia UV-vis possui menor sensibilidade e especificidade que os métodos anteriormente citados.

3.4 TECNOLOGIAS DE SECAGEM DE EXTRATOS

Metodologias de secagem como a nebulização, a liofilização e a secagem em estufa são usadas na produção de extratos secos (SANTIVARANGKNA; KULOZIK; FOERST, 2007). As características reológicas, estabilidade, via de administração e absorção do produto, considerações econômicas, requisitos de produtividade e propriedades intrínsecas dos extratos são avaliados durante a escolha da técnica de secagem (VASS et al., 2019).

Daza et al. (2016) compararam a secagem do extrato de frutas de *Eugenia dysenterica* DC. por SD e liofilização, sendo que os extratos nebulizados apresentaram menores teores de umidade e atividade de água. Outra vantagem da técnica é o custo operação estimado em 4-5 vezes menor que a liofilização, devido ao consumo de eletricidade e curto tempo de secagem (SANTIVARANGKNA, KULOZIK, FOERST, 2007).

A secagem em estufas com ou sem circulação de ar é uma técnica com custo operacional e de investimento baixo, geralmente aplicam-se temperaturas que variam entre 40 e 80 °C por longos períodos de tempo e podem provocar a degradação dos constituintes químicos. Já a liofilização utiliza baixas temperaturas e pressão para

induzir a sublimação do solvente e formação do particulado aglomerado, sendo muito utilizada para fármacos termolábeis, a liofilização é a técnica de secagem mais utilizada na produção de medicamentos biofarmacêuticos (VASS et al., 2019).

A secagem por nebulização de extratos fluidos resulta em um produto com melhores propriedades em comparação com outros métodos de secagem, uma vez que a secagem por pulverização produz pós homogêneos (SOLLOHUB, KRZYSZTOF; CAL, 2010). A SD é utilizada na indústria de alimentos (SHISHIR; CHEN, 2017), farmacêutica (POOZESH, BILGILI, 2019) e é a técnica mais utilizada para a secagem de extratos vegetais (SOLLOHUB, KRZYSZTOF; CAL, 2010).

A Secagem por SD é um processo contínuo e consiste de três etapas fundamentais. Na primeira etapa, ocorre a dispersão do líquido em gotículas com grande área superficial, na segunda etapa, as gotículas entram em contato com uma corrente de ar aquecida e, na terceira etapa, ocorre a evaporação do solvente e formação das partículas sólidas (OLIVEIRA; PETROVICK, 2010; POOZESH; BILGILI, 2019).

Os pós produzidos por SD apresentam propriedades físicas controladas como tamanho, forma, densidade e homogeneidade das partículas (SAMPAIO et al., 2016). A aderência dos extratos as paredes dos secadores, higroscopicidade elevada e pós com propriedades reológicas ruins são frequentemente relatados em pós secos (GALLO et al., 2011; PETROVICK; PETROVICK; BASSANI, 2010; SANTANA; MEDEIROS; CORREIA, 2018), porém essas características podem ser total ou parcialmente contornadas com ajustes adequados nas condições de operação (temperaturas de entrada e saída do ar, fluxo de ar de aspersão, fluxo de alimentação) e adição de adjuvantes de secagem aos extratos líquidos, como maltodextrina, goma arábica, amido modificado, ciclodextrinas e DS (GALLO et al., 2011; FERNANDES et al., 2014).

O fruto da graviola tem atraído a atenção de pesquisadores devido ao seu valor nutricional, em especial a presença de carboidratos e minerais, no entanto, o fruto maduro apresenta polpa macia que machuca com facilidade liberando um odor forte e desagradável (CHANG et al., 2018). A secagem da polpa da graviola pode aumentar a vida útil do produto, preservando seus nutrientes e aumentando o valor agregado do produto. Os frutos secos por SD apresentaram rendimento de 70% e teor de umidade de 2,03%, utilizando maltodextrina (CHANG et al., 2018), Da Costa; Rocha; Da Costa (2014) estudaram a secagem do fruto da graviola utilizando diferentes

concentrações de maltodextrina, onde o pó seco com 30% apresentou as melhores propriedades físico-químicas. Um estudo recente mostrou a retenção dos compostos bioativos e voláteis dos frutos de graviola secos por SD (LEITE NETA et al., 2019).

Gomes et al., (2016) avaliaram a atividade larvicida do extrato seco das sementes da graviola contra *Plutella xylostella*, a secagem foi realizada utilizando goma arábica e DS como adjuvantes de secagem, no entanto, os autores não obtiveram rendimento satisfatório na encapsulação do extrato com o DS e os testes larvicidas foram realizados apenas com o ES obtido com a goma arábica onde as microcápsulas afetaram a duração e a viabilidade das larvas.

Daud et al. (2017) obtiveram pós secos a partir do extrato das folhas de graviola por SD. Os autores relataram melhora na atividade anticâncer com o aumento da concentração do ES, enquanto o rendimento do processo variou entre 4,44 a 13,73%, teor de umidade variou entre 5,12 e 11% e foram observados altos teores de polifenóis e flavonoides totais.

O extrato hidroalcoólico das folhas da graviola foi seco por SD, os autores reportaram partículas esféricas com tamanhos heterogêneos (0,25 a 13,87 μm), a capacidade de forma esferas lisas foi maior utilizando maltodextrina em comparação com a goma arábica (JORDÁN-SUÁREZ; GLORIO-PAULET; VIDAL, 2018). Outro estudo avaliou as temperaturas de secagem (185 - 195 °C) e a proporção de maltodextrina (10,36 - 17,41%) para a secagem do extrato aquoso das folhas. Os autores observaram melhora do rendimento com o aumento da temperatura e proporção do adjuvante de secagem, no entanto, os valores de rendimento obtidos foram inferiores a 10% (0,79 - 6,67%), os autores ressaltaram a necessidade de mais estudos com o intuito de produzir extratos secos da graviola com melhor qualidade e rendimento (CASTRO JR; MAGSINO; CUARTO, 2018).

3.5 PROPRIEDADES DAS PARTÍCULAS

Os extratos secos são frequentemente classificados como materiais pouco compressíveis e muito higroscópicos, apresentando baixa fluidez (BYEON et al., 2019). Em geral, ao aumentar o teor de umidade de um pó ocorre a redução de sua fluidez, pois o aumento da umidade na superfície das partículas causa aumento da tensão superficial e esse fenômeno é provocado pelas forças de adesão e coesão nos

pós secos (EMERY et al., 2009). Ensaio físicos são empregados na tentativa de prever a fluidez de pós puros ou em misturas, dentre estes destacam-se o índice de Carr, fator de Hausner, ângulo de repouso e taxa de fluxo (DAI et al., 2019).

As forças moleculares fazem com que as partículas sólidas tendam a aderir à superfície ou entre si, fenômenos chamados de adesão e coesão, respectivamente. As forças de adesão e coesão são resultantes principalmente de forças de Van de Waals, também existem outras forças que contribuem para a redução do fluxo das partículas, são as forças de tensão superficial e eletrostáticas, provocadas pela presença de líquidos adsorvidos na superfície das partículas e pela formação de cargas eletrostáticas pelo contato ou atrito, respectivamente (AULTON, TAYLOR, 2016).

As forças de adesão e coesão também estão relacionadas ao tamanho das partículas dos pós. Partículas com diâmetros menores que 20 μm apresentam área superficial alta e, conseqüentemente, maiores forças de adesão, já partículas com diâmetros superiores a 100 μm tendem a apresentar maior fluidez. Isso ocorre porque forças externas, como a gravidade, conseguem superar as forças coesivas (eletrostática, atrito e Van der Waals) com maior facilidade (MULLARNEY et al., 2011).

O índice de Carr e o fator de Hausner são métodos indiretos úteis na predição do fluxo de pós, sendo baseados nas densidades dos pós. Observou-se que a razão entre o volume inicial dos pós (densidade aparente) e o volume compactado (densidade compactada) estava relacionado ao atrito entre as partículas e era preditiva do fluxo do pó (AULTON, TAYLOR, 2016). Carr observou que o percentual de compressibilidade de um pó é uma medida direta da resistência potencial dos arcos ou das pontes de um pó (AULTON, TAYLOR, 2016). É mostrado, na Tabela 1 a fluxibilidade dos pós de acordo com os índices de Carr, fator de Hausner e ângulo de repouso, onde os pós são classificados entre fluxo excelente à fluxo muito pobre, em condições de fluxo deficiente, a utilização de excipientes farmacêuticos, forçadores de pó, vibradores ou utilização de metodologias para aumentar o tamanho das partículas podem ser necessária.

Tabela 1 - Escala de fluidez

Classificação	IC	FH	AR
Excelente	<10	1,00–1,11	25 – 30
Bom	11–15	1,12–1,18	31 – 35
Razoável (auxílio de fluxo não é necessário)	16–20	1,19–1,25	36 – 40
Tolerável (pode obstruir, auxílio de pode ser necessário)	21–25	1,26–1,34	41 – 45
Pobre (agitação ou vibração necessária)	26–31	1,35–1,45	46 – 55
Muito pobre	32–37	1,46–1,59	56 – 65
Muito, muito pobre	>38	>1,60	>66

Legenda: FH- Fator de Hausner; IC- Índice de Carr (%); AR- Ângulo de Repouso (°). Fonte: Adaptado de SINGH; KUMAR (2012)

O método mais simples para determinar diretamente a fluxibilidade de um pó é medir a velocidade na qual o pó escoar de um alimentador. Um dispositivo obturador simples é colocado sobre a abertura de saída, sendo que, depois, se preenche o alimentador com o pó. Assim, o obturador é removido e o tempo necessário para que o pó escoar completamente é registrado, a velocidade de fluxo é calculada pelo coeficiente da massa do pó escoado e do tempo registrado, servindo como parâmetro de comparação quantitativa para outros pós (AULTON, TAYLOR, 2016).

Pinto et al. (2015) avaliaram as propriedades físico-mecânicas de grânulos de paracetamol e obtiveram taxas de fluxo de $7,76 \text{ g}\cdot\text{s}^{-1}$, índice de Carr de 9,10%, fator de Hausner de 1,10 e ângulo de repouso de $39,8^\circ$, os autores classificaram os grânulos com propriedades de fluxo aceitável à bom e consideraram não ser necessário a utilização de forçadores e vibradores de pós.

Grânulos desenvolvidos a partir de extratos secos de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. obtiveram propriedades de fluxo superiores ao seu respectivo extrato seco, a melhora das propriedades de fluxo dos grânulos estão relacionados ao aumento do tamanho de partículas dos grânulos em relação ao pó, com diâmetros de 1,19 mm para grânulos e diâmetros menores que 21 μm para os extratos secos, o AR apresentou valores de $23,90^\circ$ e $15,48^\circ$ para os grânulos e pós respectivamente, ambos os valores são considerados excelentes (PETROVICK; PETROVICK; BASSANI, 2010). Os resultados mostraram que as propriedades de fluxo dos pós devem ser avaliadas por diferentes métodos e a utilização de um único método pode induzir a

erros durante o desenvolvimento e produção de formas farmacêuticas sólidas na indústria.

3.6 ANÁLISE TÉRMICA APLICADA À DROGAS VEGETAIS E SEUS DERIVADOS

A estabilidade dos produtos farmacêuticos depende de fatores ambientais como temperatura, umidade, luz e de outros relacionados ao próprio insumo como as propriedades físicas e químicas das substâncias ativas e dos excipientes, forma farmacêutica, processo de fabricação, tipo e propriedades dos materiais de embalagem (BRASIL, 2019a; SILVA et al., 2009).

A estabilidade dos compostos ativos é um tema de grande preocupação, pois afeta a segurança e eficácia dos medicamentos. A RDC N° 318, de 6 de novembro de 2019 indica a necessidade da realização de estudos de estabilidade para compreender o comportamento destes frente aos fatores ambientais (BRASIL, 2019a). O conhecimento da estabilidade das moléculas ajuda na seleção adequada da formulação e embalagem, bem como proporciona condições sobre armazenamento e vida de prateleira (BLESSY et al., 2014; COLLIER et al., 2010).

Atualmente, para o registro de medicamentos fitoterápicos a legislação brasileira exige a realização de estudos de estabilidade (BRASIL, 2014), no entanto, estes estudos são demorados e dispendiosos. Neste sentido, as técnicas termoanalíticas mostram-se uma alternativa útil na previsão da estabilidade de compostos bioativos e suas misturas, pois são técnicas que podem gerar resultados rápidos e confiáveis (CUINICA; MACÊDO, 2018), no entanto, não dispensando o estudo de estabilidade tradicional.

As técnicas termoanalíticas são importantes nas fases iniciais da pesquisa química, contribuindo para o conhecimento das características inerentes aos compostos (LIZARRAGA; ZABALETA; PALOP, 2007). Estas técnicas medem uma propriedade física e/ou química em função da temperatura ou do tempo, enquanto a substância é submetida a um programa controlado de temperatura sob uma atmosfera específica (DE MENDONÇA et al., 2014; GALVÃO et al., 2014; GIRON, 1998).

A termogravimetria (TG), a calorimetria exploratória diferencial (DSC) e a análise térmica diferencial (DTA) são as principais técnicas termoanalíticas utilizadas no desenvolvimento de formulações farmacêuticas, caracterização térmica, estudos de compatibilidade e estabilidade térmica (ALVES et al., 2010; LAVOR et al., 2014).

A DSC permite a detecção quantitativa de todos os processos energéticos, permite explorar o processo de fusão, cristalização, evaporação, equilíbrios de fase, sublimação, transformações vítreas e polimórficas, desidratação, isomerização, adsorção e degradação das substâncias (EMAMI et al., 2014). Quando a amostra sofre uma alteração de temperatura, devido a uma reação exotérmica ou endotérmica, a diferença de fluxo de calor usada para manter a amostra e a referência na mesma temperatura pode ser medida. Essa diferença pode ser devido a reações químicas (decomposição), mudança de estado (fusão, sublimação) ou transições cristalinas (OLIVEIRA; YOSHIDA; GOMES, 2011).

A TG mede a variação de massa da amostra em função da temperatura e/ou do tempo, esta variação é associada a um processo térmico e é medida entre os pontos de inflexão da curva da TG (PLANTE; FERNÁNDEZ; LEIFELD, 2009).

A TG é a técnica termoanalítica mais utilizada para estudar a degradação térmica, normalmente, a cinética de degradação térmica depende não apenas da natureza do material, mas também das condições experimentais, tais como: massa da amostra, tipo de cadinho, fluxo e tipo de atmosfera de gás utilizada. A escolha da atmosfera pode afetar a taxa de degradação, bem como o número de etapas de perda de massa, a temperatura de início e fim do processo e a massa do resíduo (VYAZOVKIN et al., 2014).

A DSC, TG e DTA foram aplicados para a caracterização de drogas vegetais e seus derivados, obtendo melhor compreensão dos eventos de transição de fase e degradação presentes nessas matrizes. A complexidade das matrizes vegetais torna a interpretação de eventos térmicos mais desafiadora, comparada aos fármacos sintéticos. Na composição da matéria-prima vegetal, a degradação de macro- e microconstituintes e a interação entre eles dificulta a reprodutibilidade das análises por DSC, com formação de produtos de degradação em diferentes concentrações devido a vários fatores, como forma e imperfeições, escape de produtos gasosos, embalagem e taxa de aquecimento da amostra (DA COSTA et al., 2013).

A TG foi aplicada para a caracterização de diferentes tamanhos de partícula da droga vegetal, onde as amostras foram comparadas em diferentes atmosferas e razões de aquecimento e os parâmetros cinéticos calculados utilizando o modelo cinético de Ozawa, comumente, amostras com menores tamanhos de partículas possuem menor energia de ativação (E_a) devido a maior área superficial (BRANDÃO

et al., 2016; CORREIA et al., 2013, 2015, 2016; CUINICA; MACÊDO, 2018; GUIMARÃES et al., 2018).

O alcaloide warifteina isolado de *Cissampelos sympodialis* Eichl foi caracterizado utilizando TG, DSC e DSC-Fotovisual (ARAGÃO; BARBOSA FILHO; MACÊDO, 2001). Os flavonoides quercetina e rutina mostraram estabilidade térmica com temperaturas iniciais de degradação superiores a 200 °C (DA COSTA et al., 2002).

O complexo de inclusão do flavonoide Naringenina com β -ciclodextrina (SEMALTY; TANWAR; SEMALTY, 2014) e as dispersões sólidas de quercetina com PVP-K25 (COSTA et al., 2011) foram caracterizadas por análise térmica, os resultados mostraram a aplicação dessas técnicas na caracterização de metabólitos secundários isolados ou em mistura.

Cartaxo-Furtado et al. (2017) e Fernandes et al. (2013) utilizaram técnicas térmicas (DSC e TG) e não térmicas (difração de raio-X (DRX), MEV e infravermelho com transformada de Fourier (IV)) para caracterizar os extratos secos por aspensão e liofilização de *Ximenia americana* L. e *Syzygium cumini* L., respectivamente. Pereira et al. (2019) caracterizaram por técnicas térmicas e não térmicas a droga vegetal e o ES de *Apodanthera congestiflora* Cogn., os autores fundamentam a aplicação da análise térmica no controle de qualidade das drogas vegetais e seus derivados.

O estudo de compatibilidade de fármacos e excipientes representa uma importante etapa no desenvolvimento de formulação farmacêuticas, onde as interações físico-químicas podem afetar a natureza física, química, a estabilidade e a biodisponibilidade e, conseqüentemente, a sua eficácia e segurança terapêutica (TIȚA et al., 2011).

No estudo de compatibilidade de formulações farmacêuticas, os deslocamentos, desaparecimentos ou aparecimentos de novos picos/eventos térmicos que estavam ausentes nas curvas de compostos puros, são sinais de possíveis interações. (LAVOR et al., 2014; TIȚA et al., 2011).

Leite et al. (2018) utilizaram TG e DTA para o estudo de compatibilidade térmica do ES por aspensão de *Myracrodruon urundeuva* Allemão com os excipientes farmacêuticos celulose microcristalina 102, lactose, amido e maltodextrina. Os autores indicaram uma possível interação com a maltodextrina.

Santana et al. (2018) estudaram a compatibilidade do ES de *X. americana* L. com excipientes farmacêuticos, sendo possível observar incompatibilidade entre o ES com a lactose, o amido e o estearato de magnésio.

Fernandes et al. (2018) utilizaram o ES de *Schinopsis brasiliensis* Engler como alternativa para conservação de protetor solar. Foram avaliados a compatibilidade do ES com os excipientes farmacêuticos, os resultados mostraram evidência de incompatibilidade entre o ES e carboximetilcelulose, hidroxietilcelulose, glicerina, sorbitol, bicarbonato de sódio e carbonato de cálcio.

Da Costa et al. (2013) realizaram o estudo de estabilidade do ES de *Heliotropium indicum* L. com excipientes farmacêuticos no desenvolvimento de um gel hidrofílico utilizando TG e DSC, observaram incompatibilidade do ES com o metilparabeno e com o propilenoglicol.

Ekere et al. (2017) utilizaram DSC e Cromatografia em camada delgada para avaliar a estabilidade do medicamento fitoterápico Niprimal[®], em diferentes condições de armazenamento (temperatura ambiente, infravermelho e sob refrigeração), ambos os métodos foram considerados rápidos, sensíveis e confiáveis na determinação da sua estabilidade.

Cuinica, Macedo (2018) estudaram a cinética de degradação dos extratos secos de *Urtica dioica* L. em condições isotérmicas e não-isotérmicas, utilizando modelos matemáticos de Arrhenius e Ozawa para calcular os parâmetros cinéticos (ordem de reação (n), energia de ativação (E_a) e fator frequência (A)). Os autores observaram maior estabilidade do ES em estufa em comparação aos obtidos por aspersão, utilizando como referência os valores de E_a e constante de degradação.

Através da equação de Arrhenius pode-se calcular os parâmetros cinéticos,

$$k(T) = A \cdot e^{-E_a/RT} \quad (1)$$

A = fator de frequência ou fator pré-exponencial

E_a = energia de ativação

R = constante geral dos gases (8,31 J.mol⁻¹.K⁻¹)

T = temperatura absoluta (kelvin)

k = constante de degradação

A realização de estudos cinéticos revela informações sobre o mecanismo de decomposição e estabilidade, podendo ser obtido os valores de E_a , n e A (LEDEȚI et al., 2015). Além dos parâmetros cinéticos já citados, a equação de Arrhenius também

permite prever o prazo de validade dos extratos secos, como mostrado por CUINICA, MACEDO (2018).

Liu et al. (2018) avaliaram a degradação dos macroconstituintes do caule e folhas de *Artemisia apiacea* e comparou sua estabilidade utilizando a E_a através dos modelos cinético de Ozawa-Flynn-Wall e Kissinger-Akahira-Sunose. Os autores concluíram que a celulose desempenha papel significativo na degradação térmica do caule e a hemicelulose, celulose e lignina para as folhas, onde nas folhas o evento de degradação térmica apresentou mecanismos de degradação diferentes sendo necessário calcular a cinética de degradação por partes do mesmo processo.

Correia et al. (2015) estudaram a cinética de degradação térmica de *Tabebuia caraiba* (Mart.) Bur. por TG utilizando o modelo cinético de Ozawa adaptado, os dados cinéticos mostraram a mesma ordem de degradação e diferentes valores de E_a de acordo com o tamanho de partícula. O fator de diferença (F1) foi usado para comparar a linha de paralelismo das amostras construídas utilizando o gráfico de Ozawa. Os autores demonstraram ser possível discriminar a granulometria da droga vegetal com os dados cinéticos obtidos.

Cartaxo-Furtado et al. (2019) estudaram a cinética de degradação térmica do ES do barbatimão, *Stryphnodendron adstringens* Coville, por TG utilizando o modelo cinético de Ozawa. O ES apresentou ordem de reação igual a zero e início de degradação em temperaturas superiores a 200 °C, os autores relataram excelente atividade microbiana contra todas as bactérias testadas, mostrando que não houve perda de atividade com a secagem por aspersão.

As técnicas termoanalíticas são aplicadas em estudos de caracterização, compatibilidade térmica e determinação dos parâmetros cinéticos de degradação das drogas vegetais pulverizadas, extratos secos por aspersão, liofilizados e secos em estufa, metabólitos secundários isolados, misturas físicas, pré-formulados e medicamentos fitoterápicos, mostrando a importância da análise térmica em todas as etapas do desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos e no controle de qualidade das drogas vegetais e seus derivados.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA VEGETAL

As folhas de *A. muricata* L. foram coletadas no município de Santa Rita, Paraíba, (7°14'48"S 34°58'40"W) e uma exsicata foi depositada no Herbário Lauro Pires Xavier (JPB63746). Este acesso foi registrado no Sistema Nacional de Patrimônio Genético e Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN) sob o número A993C08. Após a coleta as folhas foram limpas e higienizadas com solução de hipoclorito de sódio a 0,04%, em seguida, as folhas foram desidratadas em estufa com circulação de ar e temperatura controlada de 40 ± 2 °C por 120 horas. O material vegetal seco foi moído usando um moinho de facas (Willey®, Marconi), acoplado a um tamis com abertura de 2 mm. As folhas pulverizadas foram armazenadas à temperatura ambiente em sacos plásticos protegidos da luz.

4.2 DETERMINAÇÃO DE ÁGUA

Pesou-se 2 g das folhas de graviola pulverizadas e transferiu para pesa-filtro, previamente dessecado nas mesmas condições a serem adotadas para as amostras. A perda por dessecação foi realizada em estufa com circulação de ar e temperatura controlada de 105 ± 1 °C durante 5 horas, até peso constante. Calculou-se a perda por dessecação em relação à droga vegetal seca, o teste foi realizado em triplicata (BRASIL, 2019b).

4.3 DETERMINAÇÃO DE CINZAS

4.3.1 Determinação de cinzas totais

Pesou-se 3 g das folhas de graviola pulverizadas e transferiu-se para cadinho de porcelana previamente tarado. Um gradiente de temperatura foi utilizado, iniciando a 200 °C por 30 min, em seguida a temperatura foi ajustada para 400 °C por 60 min e por fim permaneceu a 600 °C por 90 min. Ao término do ensaio, o material foi resfriado em dessecador antes da pesagem. O teor de cinzas totais foi calculado em

porcentagem de cinzas em relação à droga seca, o teste foi realizado em triplicata (BRASIL, 2019b).

4.3.2 Determinação de cinzas insolúveis em ácido

Cinzas insolúveis em ácido constituem o resíduo obtido na fervura de cinzas totais com ácido clorídrico à 2 molares (*M*), após filtragem, lavagem e incineração. O método destina-se à determinação de sílica e constituintes silícicos da droga (BRASIL, 2019b).

Aqueceu-se até ebulição as cinzas obtidas em teor de cinzas totais, com 25 mL de ácido clorídrico 2 *M* por 5 min em um cadinho coberto por um vidro de relógio. Lavou-se o vidro de relógio com 5 mL de água quente, juntando a água de lavagem ao cadinho. Recolheu-se o material insolúvel em um papel de filtro quantitativo, lavou-se o papel de filtro com água quente até o filtrado mostra-se neutro. Transferiu-se o papel de filtro contendo o resíduo para o cadinho original, secou sobre chapa e incinerou a 500 °C até que a diferença entre duas pesagens sucessivas fosse, no máximo, 1,0 mg. Calculou-se a porcentagem de cinzas insolúveis em ácido em relação à droga seca, o teste foi realizado em triplicata (BRASIL, 2019b).

4.4 GRANULOMETRIA DE PÓS

A droga vegetal pulverizada foi submetida a um sistema de tamizes com diferentes aberturas de poros (F1) $\geq 1,160$; $1,160 < (F2) \geq 0,840$; $0,84 < (F3) \geq 0,710$; $0,71 < (F4) \geq 0,500$; $0,500 < (F5) \geq 0,350$; $0,350 < (F6) \geq 0,297$; $0,297 < (F7) \geq 0,250$; $0,250 < (F8) \geq 0,149$; $0,149 < (F9) \geq 0,074$; $(F10) < 0,074$ mm. Em tamisador (PRODUTEST®), os tamises foram organizados da maior para a menor abertura de malha, 200 g da amostra foram adicionadas ao tamis de maior abertura e submetidos a vibração durante 30 min, as frações retidas nos tamises foram pesadas e a distribuição dos tamanhos de partícula foram determinados em relação à droga vegetal inteira, o procedimento foi realizado em triplicata. As amostras com maiores rendimentos (F5, F8 e F9), a amostra de menor tamanho de partícula (F10) e a droga vegetal inteira (F0) foram utilizadas nos experimentos de caracterização térmica, microscopia eletrônica de varredura e atividade antimicrobiana.

4.5 DETERMINAÇÃO DE MATÉRIA ESTRANHA

Matéria estranha é qualquer material que não conste da definição da droga descrita na monografia correspondente. As drogas devem ser isentas de fungos, de insetos e de outras contaminações de origem animal. Salvo indicação em contrário, a porcentagem de elementos estranhos não deve ser superior a 2% (p.p⁻¹).

Pesou-se 10 g das folhas de graviola pulverizadas e espalhou em camada fina sobre uma superfície plana. A separação dos materiais estranhos foi realizada manualmente, inicialmente a olho nu e, em seguida, com auxílio de lente de aumento. Pesou-se o material separado e determinou-se a porcentagem de material estranho com base no peso da amostra submetida ao ensaio, o procedimento foi realizado em triplicata (BRASIL, 2019b).

4.6 DETERMINAÇÃO DE pH APARENTE

O pH aparente foi determinado no extrato hidroalcoólico (EHA) utilizando um medidor de pH previamente calibrado com soluções padrão de pH conhecidas (pH 4,0 e pH 7,0).

4.7 DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE RELATIVA

Utilizou-se um picnômetro limpo e seco, com capacidade de 10 mL, previamente calibrado. Transferiu-se o EHA, a temperatura de 20 °C, para o picnômetro, removeu-se o excesso da substância antes da pesagem. O peso do EHA foi determinado através da diferença de massa do picnômetro cheio e vazio. Calculou-se a densidade relativa determinando a razão entre a massa da amostra líquida e a massa da água, ambas a 20 °C, o procedimento foi realizado em triplicata (BRASIL, 2019b).

4.8 DETERMINAÇÃO DO RESÍDUO SECO

2 mL do EHA foram dessecados em estufa com circulação de ar e temperatura controlada de 105 ± 1 °C por 3 horas, esfriou-se em dessecador por 30 min antes da pesagem, repetiu-se o procedimento até peso constante. Calculou-se o resíduo seco em porcentagem sobre a massa do EHA, o procedimento foi realizado em triplicata (BRASIL, 2019b).

4.9 TRIAGEM FITOQUÍMICA

Para a realização da triagem fitoquímica o EHA foi concentrado utilizando um rota-evaporador a 40 °C sob pressão negativa. O EHA concentrado foi testado para alcaloides (métodos de Mayer, Dragendorff, Ácido Sílico-tungstico e Bouchardat), esteroides (Lieberman-Burchard), Acetogeninas (Kedde), Taninos (FeCl_3 2%), flavonoides (fluorescência) e saponinas (método da espuma) (CARVALHO et al., 2006).

4.10 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE FLAVONOIDES TOTAIS.

O método foi validado segundo a RDC nº 166, de 24 de julho de 2017 (BRASIL, 2017). A análise estatística dos resultados foi obtida segundo análise de variância (ANOVA) e teste t Student. O parâmetro seletividade foi verificado através da análise comparativa entre a amostra com e sem adição de AlCl_3 , análise do padrão com e sem adição de AlCl_3 , O flavonoide rutina foi utilizada como substância química de referência (SQR).

Foram preparadas soluções estoque de rutina em etanol a 70% na concentração de $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Posteriores diluições volumétricas foram realizadas utilizando etanol a 70% para análise de três curvas autênticas nas concentrações de 5, 10, 20, 25, 30, 40 e $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Os resultados foram tratados estatisticamente por cálculo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. Os critérios de aceitação foram: coeficiente de correlação (r) > 0,99, análise estatística de resíduo, homocedasticidade e normalidade. Para o efeito matriz comparou-se o paralelismo

das curvas da SQR contra a amostra com adição da solução SQR. Já os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram calculados pela razão entre o desvio padrão dos coeficientes lineares das três curvas do ensaio de linearidade pela média dos coeficientes angulares das respectivas curvas multiplicadas por 3 e 10, respectivamente.

A precisão foi avaliada em dois níveis: repetibilidade, precisão intermediária (precisão intercorridas). Na repetibilidade, o método foi verificado por 6 determinações autênticas, analisadas em um pequeno intervalo de tempo. Na precisão intermediária, foram realizadas análises em dois dias diferentes com dois analistas diferentes. A exatidão do método foi determinada após o estabelecimento da linearidade e do intervalo, sendo verificada a partir de amostras obtidas em triplicata para cada concentração perfazendo três níveis: baixo, médio e alto com concentrações de 23, 30 e 38 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente.

No parâmetro robustez, foi analisado a possível influência da variação de pH aparente da amostra (3, 6, 12) e diferentes tipos de cloreto de alumínio (anidro e hexahidratado) para cada condição foram realizadas 3 análises da amostra e 3 análises do padrão na mesma concentração.

4.11 PREPARO DA AMOSTRA PARA QUANTIFICAÇÃO DE FLAVONOIDES TOTAIS

Foram adicionados a balão volumétrico de 10 mL, 300 μL do EHA e em seguida 500 μL de AlCl_3 a 2% em metanol (p.v⁻¹), o volume final do balão foi completado com etanol a 70%. Esta mistura permaneceu em repouso durante 30 min antes da leitura da absorbância no comprimento de onda de 410 nm. Foram realizadas ainda leituras das amostras com metanol no lugar da solução de AlCl_3 e o valor da absorbância da leitura anterior foi subtraído do valor desta, para que a coloração dos extratos não influenciasse na absorbância, superestimando a quantidade de flavonoides. As análises foram realizadas em triplicata. O conteúdo de flavonoides totais foi determinado utilizando uma curva de calibração utilizando rutina (*Sigma–Aldrich Chemie, Steinheim, Germany*) nas concentrações de 5, 10, 20, 25, 30, 40 e 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e expresso em mg equivalente de rutina.

4.12 DETERMINAÇÃO DA MELHOR CONDIÇÃO DE EXTRAÇÃO

Realizou-se um planejamento fatorial completo 3^2 , duas variáveis independentes em três níveis, para determinar qual a melhor condição extrativa. As variáveis dependentes avaliadas foram concentrações do solvente extrator, nos níveis 30, 50 e 70% (etanol:água) e proporção da droga vegetal, nos níveis 5, 10 e 15% (p.v¹). Os resultados foram avaliados utilizando a análise estatística ANOVA, teste de Tukey, modelo superfície resposta e diagrama de Pareto.

4.13 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

A avaliação da morfologia dos pós (droga vegetal e extrato seco) da graviola foi realizada por microscopia eletrônica de varredura utilizando um microscópio (ZEISS®, LEO 1430), após serem fixadas em fita de dupla face de carbono e metalizadas com ouro por 1,5 min (Metalizador EMITECH®, k550x). As fotomicrografias foram obtidas em uma câmara com tensão de excitação de 15 kV.

4.14 CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC)

As curvas calorimétricas foram obtidas em um calorímetro diferencial de varredura (Shimadzu®, DSC-50) usando um cadinho hermeticamente fechado de alumínio. O equipamento foi calibrado utilizando Índio ($156,6 \pm 0,3$ °C) e Zinco ($419,5 \pm 1$ °C) como padrões, o sinal de fluxo de calor foi calibrado pelo calor de fusão do Índio ($28,59 \pm 0,3$ J.g⁻¹). Os experimentos foram conduzidos com elevação da temperatura no intervalo de 25 a 400 °C na taxa de aquecimento (β) de 10 °C.min⁻¹, em fluxo de nitrogênio de 50 mL.min⁻¹. A massa da amostra foi de $2,0 \pm 0,1$ mg. Os dados foram analisados usando o *software* TA-60ws da Shimadzu®.

4.15 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TG)

As curvas termogravimétricas dinâmicas foram obtidas em uma termobalança (Shimadzu®, TGA-50). O aparelho foi verificado com oxalato de cálcio monohidratado.

Os experimentos foram conduzidos no intervalo de temperatura de 25 a 800 °C nas taxas de aquecimento (β) de 5, 10, 20 e 40 °C.min⁻¹. No estudo dinâmico foram avaliadas duas atmosferas diferentes, uma inerte utilizando nitrogênio (NITRO) com fluxo de gás de 50 mL.min⁻¹ e outra oxidativa utilizando nitrogênio e ar sintético (AIR) com fluxos de gás de 50 e 20 mL.min⁻¹, respectivamente. A massa da amostra foi de 3,0 ± 0,1 mg em cadinho de alumina. Com base nos dados obtidos aplicou-se o modelo de Ozawa para determinação dos parâmetros cinéticos: ordem de reação, fator de frequência e energia de ativação. Para análise dos dados e determinação dos parâmetros cinéticos utilizou-se o *software* TA-60ws, da Shimadzu®.

4.16 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Foram utilizadas cepas padrão *American Type Culture Collection* (ATCC) de *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Klesbisiela pneumoniae* (ATCC 4352) as quais foram disponibilizadas pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ – RJ).

Infusos na concentração de 5% (p.v⁻¹) em água destilada foram obtidos das amostras F0, F5, F8, F9 e F10 para a avaliação da atividade antimicrobiana.

O método foi realizado de acordo com o descrito em (BRANDÃO et al., 2016), onde os inóculos foram padronizados em tubos contendo 5 mL de solução salina estéril a 0,9%. A suspensão foi ajustada em espectrofotômetro a 625 nm, em uma concentração equivalente a 10⁶ unidades formadoras de colônias (UFC). 100µL da infusão das amostras foram submetidas à diluição seriada em caldo Mueller Hinton obtendo assim as seguintes concentrações 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56; 0,78; 0,39 e 0,195 mg.mL⁻¹ de cada amostra. 10 µL de cada cultura de microrganismos foram adicionados nos poços da microplaca, água destilada e gentamicina a 80 mg.mL⁻¹ foram utilizados como controle negativo e positivo, respectivamente.

O crescimento bacteriano foi indicado pela adição de 20 µL de solução aquosa de resazurina a 0,01% com uma incubação adicional a 37 ± 1 °C durante 2 horas. Microrganismos viáveis reduziram o corante azul a coloração rosa, dessa forma, a concentração inibitória mínima (CIM) foi definida pela menor concentração sem alteração de cor do corante. Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.17 SPRAY DRYER E DESENHO EXPERIMENTAL

O extrato hidroalcoólico de *A. muricata* foi submetido ao processo de secagem por aspersão em *spray dryer* (BUCHI®, B-290), utilizando atomizador com bocal de fluido duplo pneumático com orifício de abertura de 0,7 mm operando com um fluxo de ar de 35 m³.h⁻¹, pressão de 0,41 bar e fluxo de ar de atomização de 667 L.h⁻¹. O dióxido de silício coloidal 200 (DS) foi utilizado como adjuvante de secagem em diferentes concentrações a depender do experimento, calculado como % em relação ao resíduo seco (VASCONCELOS et al., 2005). Os extratos secos obtidos do processo de secagem foram denominados ES.

Um planejamento fatorial completo 2³ com repetição do ponto central e execução de forma aleatória foi utilizado. As variáveis independentes foram: fluxo de alimentação (*FA*), temperatura de entrada de ar (*B*), e concentração de DS (*C*), sendo escolhidas com base em ensaios preliminares, enquanto os demais parâmetros de secagem foram mantidos constantes. As variáveis dependentes foram: rendimento do processo (*RP*), teor de flavonoides totais (*FT*), teor de umidade (*TU*), diâmetro médio volumétrico das partículas (*Dv*), ângulo de repouso (*AR*), taxa de fluxo (*TF*), índice de Carr (*IC*), fator de Hausner (*FH*) e energia de ativação (*Ea*). As variáveis respostas foram avaliadas utilizando o coeficiente de determinação (R^2), o valor do teste de Fisher e análise de variância (ANOVA).

4.18 RENDIMENTO DO PROCESSO

O rendimento do processo (*RP*) foi determinado através da comparação do peso teórico dos sólidos presentes no extrato líquido (resíduo seco + DS) com o peso obtido no processo de secagem (KRISHNAIAH; SARBATLY; NITHYANANDAM, 2012).

4.19 TEOR DE UMIDADE

O teor de umidade (*TU*) foi determinado em balança termogravimétrica (Shimadzu®, TGA-50) utilizando a faixa de temperatura entre 25 à 105 °C, as análises foram realizadas em triplicata (MAYORAL et al., 2001).

4.20 TAMANHO DE PARTÍCULA

O diâmetro médio volumétrico das partículas (D_v) foi determinado utilizando um granulômetro com espalhamento a laser (CILAS®, 1090) na faixa de 0,10 - 500 μm (BATISTA et al., 2019).

4.21 DETERMINAÇÃO DAS DENSIDADES APARENTE E COMPACTADA, FATOR DE HAUSNER E ÍNDICE DE CARR

As densidades aparente (DA) e compactada (DC) foram determinadas utilizando 10 g do ES (m). As amostras foram vertidas numa proveta, determinando-se o volume bruto (VA), e em seguida submetidas a 1250 quedas sequenciais. O teste foi continuado em sequências de 1250 quedas até que a diferença entre duas leituras subsequentes fosse inferior ou igual a 0,1 mL (VC). O teste foi realizado em triplicata (SANTANA et al., 2018b).

A partir dos dados obtidos foi determinado a densidade aparente (DA), densidade compactada (DC), fator de Hausner (FH) e índice de Carr (IC) de acordo com as seguintes relações:

$$DA = m/VA \quad (2) \quad DC = m/VC \quad (3)$$

$$FH = DC/DA \quad (4) \quad IC = (DC - DA)/DC \times 100 \quad (5)$$

Onde: m é a massa da amostra em g; VA é o volume aparente em mL; VC é o volume compactado em mL; DA é a densidade aparente em g.cm^{-3} ; DC é a densidade compactada em g.cm^{-3} .

4.22 DETERMINAÇÃO DO ÂNGULO DE REPOUSO E TAXA DE FLUXO

O ângulo de repouso (AR) foi determinado utilizando um funil em altura fixa, com base nas medições do cone formado após o escoamento dos pós pelo funil. Foram utilizados 10 g do ES. Os ES foram escoados sobre papel milimetrado e o cone formado teve sua altura determinada utilizando paquímetro (SANTANA et al., 2018b). A partir dos dados obtidos foi determinado o AR de acordo com a seguinte relação:

$$AR = \arctan h/ra \quad (6)$$

Onde arctan é o arco da tangente, h é a altura e ra é o raio em cm.

A taxa de fluxo (*TF*) foi determinada utilizando cronometro digital. Os testes foram realizados em triplicata.

4.23 SPRAY DRYER PARA ESTUDO DE PRÉ-FORMULAÇÃO

O EHA de *A. muricata* foi submetido ao processo de secagem em *spray dryer* (Lab-Plant®, SD-05). As condições de secagem foram temperatura do ar de entrada de 160 °C e uma taxa de alimentação de 8 mL.min⁻¹, atomizador com bocal de fluido pneumático duplo com orifício de abertura de 1,2 mm operando com um fluxo de ar de 62 m³.h⁻¹ e uma pressão de 2,0 bar. O DS foi utilizado como agente de secagem na proporção 10% em relação ao resíduo seco. O EHA foi obtido pela maceração de 15% (p.v⁻¹) da droga vegetal, a solução extrativa foi preparada na proporção de 50:50 (v.v⁻¹) etanol:água por 72 h.

4.24 PREPARAÇÃO DA MISTURA FÍSICA

As misturas físicas (MF) do ES com os excipientes selecionados (Tabela 2) foram preparados na proporção de 1:1 (p.p⁻¹) por mistura simples do ES e o excipiente em um grau e pistilo de ágata por aproximadamente 5 min. A proporção 1:1 (p.p⁻¹) foi escolhida para maximizar a probabilidade de observar qualquer interação.

Tabela 2 - Insumos farmacêuticos usados para o estudo de compatibilidade

Amostra		Classificação	Mistura
Droga	Extrato seco de <i>A. muricata</i> (ES)	IFA	-
Excipientes	Celulose Microcristalina 101 (Cel)	Diluente, desintegrante,	ES-Cel
	Maltodextrina (Malt)	Diluente, desintegrante,	ES-Malt
	Lactose (Lac)	Diluente, Aglutinante	ES-Lac
	Croscarmelose sódica (Cros)	Desintegrante	ES-Cros
	Amidoglicolato de sódio (AGlic)	Desintegrante	ES-AGlic
	Estearato de magnésio (EstMg)	Lubrificante	ES-EstMg

Fonte: O autor (2020)

4.25 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER COM REFLEXÃO TOTAL ATENUADA (IV)

Os espectros do ES e das misturas físicas foram obtidos usando um espectrofotômetro infravermelho por transformada de Fourier com aparato de reflexão total atenuada (Shimadzu[®], prestige IR 21), em comprimentos de onda de 600 a 4000 cm^{-1} , com uma média de 20 varreduras por amostra.

5 RESULTADO E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA DROGA VEGETAL E EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE *A. muricata*

Na padronização de medicamentos fitoterápicos, a caracterização físico-química da matéria-prima vegetal é o primeiro passo. É mostrado, na Tabela 3 os resultados da análise físico-química.

Tabela 3 - Caracterização físico-química da droga vegetal e EHA de *A. muricata*

Determinação	Valor obtido
Materiais estranhos	1,00 ± 0,03%
Água	6,96 ± 0,26%
Cinzas totais	9,31 ± 0,27%
Cinzas totais em HCl	1,13 ± 0,11%
Granulometria de pós	Pó moderadamente grosso
Resíduo seco	4,11%
Densidade relativa	0,87 ± 0,01 g.mL ⁻¹
pH aparente	5,53 ± 0,03

Fonte: O autor (2020)

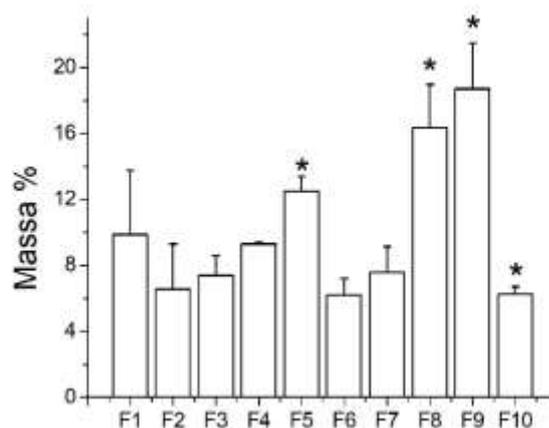
As folhas de graviola foram secas em estufa por 120 horas até obter teor de água igual a 6,96 ± 0,26%. Segundo a Farmacopeia Brasileira 4^a ed. (1988) as drogas vegetais devem conter entre 8 a 14% de umidade. O teor de água presente nos insumos pode acelerar sua degradação química e biológica devido ao crescimento de fungos e bactérias (BRASIL, 1988).

Para garantir a qualidade da matéria-prima vegetal foi realizado a busca de materiais estranhos, como: areia, pedras, insetos entre outros, estes podem contaminar o produto e acarretar perda de qualidade e confiança dos consumidores. A Farmacopeia Brasileira 6^a ed. (2019) considera aceitável a presença de até 2% de materiais estranhos (BRASIL, 2019b) e na droga vegetal integra foram encontrados 1,00 ± 0,03%, resultado aceitável segundo critério anteriormente mencionado.

A granulometria de pós da droga vegetal pulverizada foi classificada em pó moderadamente grosso (BRASIL, 2019b). No desenvolvimento de formulações farmacêuticas a partir de plantas medicinais, a polaridade do solvente extrator e o tamanho das partículas podem influenciar na concentração dos metabólitos secundários presentes na formulação (CARDOSO et al., 2017), pós com menores tamanhos de partícula tendem a potencializar a extração dos constituintes químicos e por consequência podem melhorar sua atividade farmacológica.

É mostrado, na Figura 3 a porcentagem em massa dos pós da droga vegetal de acordo com o diâmetro de abertura da malha utilizada, as amostras que apresentaram os melhores rendimentos em ordem decrescente foram, F9 (18,72) > F8 (16,37) > F5 (12,51) > F1 (9,89) > F4 (9,30) > F7 (7,60) > F3 (7,40) > F2 (6,57) > F10 (6,26) > F6 (6,22%). As amostras F0, F5, F8, F9 e F10 foram selecionados para análises de MEV, caracterização térmica e atividade microbiológica, por representarem a droga vegetal íntegra (F0), o menor tamanho de partícula (F10) e os melhores rendimentos obtidos na determinação de granulometria de pós, F9, F8 e F5, respectivamente.

Figura 3 - Granulometria de pós das folhas de *A. muricata* L.



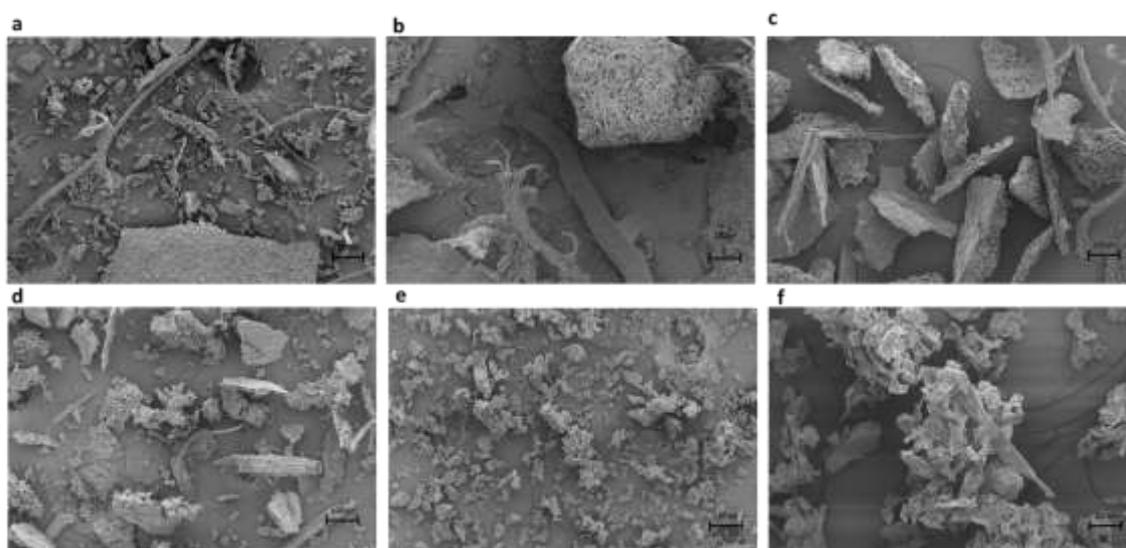
Legenda: *amostras selecionadas para os estudos de caracterização térmica, MEV e atividade antimicrobiana. Diâmetro de abertura de malha (F1) $\geq 1,160$; $1,160 < (F2) \geq 0,840$; $0,84 < (F3) \geq 0,710$; $0,71 < (F4) \geq 0,500$; $0,500 < (F5) \geq 0,350$; $0,350 < (F6) \geq 0,297$; $0,297 < (F7) \geq 0,250$; $0,250 < (F8) \geq 0,149$; $0,149 < (F9) \geq 0,074$; (F10) $< 0,074$ mm. Fonte: O autor (2020)

As amostras selecionadas foram analisadas por MEV onde a droga vegetal apresentou distribuição heterogênea nos tamanhos de partícula observados (Figura 4), com a redução no diâmetro médio das amostras ocorreu melhora na homogeneidade das partículas, a amostra F10 mostrou tendência à aglutinação, como

mostra a Figura 4f. A distribuição granulométrica das partículas depende do tipo de moinho, da abertura da malha do tamis e da quantidade de processamentos realizado na droga vegetal.

A caracterização físico-química da droga vegetal cria parâmetros comparáveis e é utilizada principalmente no controle de qualidade, porque estimam a variação dos insumos no processo industrial, no armazenamento e dificulta adulterações (FERNANDES; BOYLAN; SALGADO, 2018).

Figura 4 - Fotomicrografias das folhas pulverizadas de *A. muricata* L.



Legenda: a-F0, b-F5, c-F8, d-F9, e-F10 com aumento de 250x, e f-F10 com aumento de 1000x.
Fonte: O autor (2020)

5.2 CARACTERIZAÇÃO TÉRMICA DA DROGA VEGETAL EM TAMANHOS DE PARTÍCULA E ATMOSFERAS DIFERENTES

Não foram encontrados trabalhos científicos disponíveis abordando a caracterização térmica das folhas pulverizadas de graviola, portanto, este é um estudo inédito e poderá auxiliar na caracterização e no controle de qualidade desta droga vegetal.

Neste estudo, optamos por descrever os eventos térmicos para a amostra F0, porque as demais amostras com tamanhos de partículas diferentes nas mesmas condições de atmosfera e taxa de aquecimento apresentaram apenas diferenças nos valores de perda de massa e resíduo. Esses dados são mostrados nas Tabelas 4 e 5.

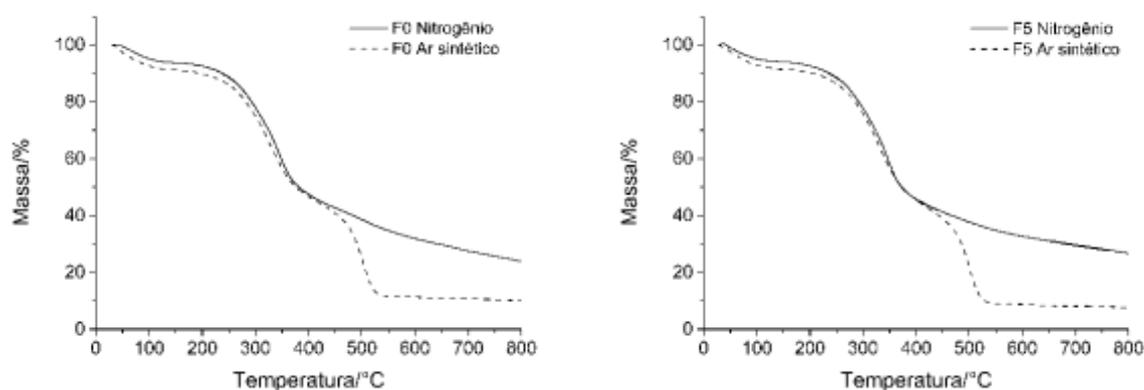
Tabela 4 - Dados termogravimétricos de *A. muricata* em atmosfera de nitrogênio e β 10 °C.min⁻¹ em diferentes tamanhos de partícula

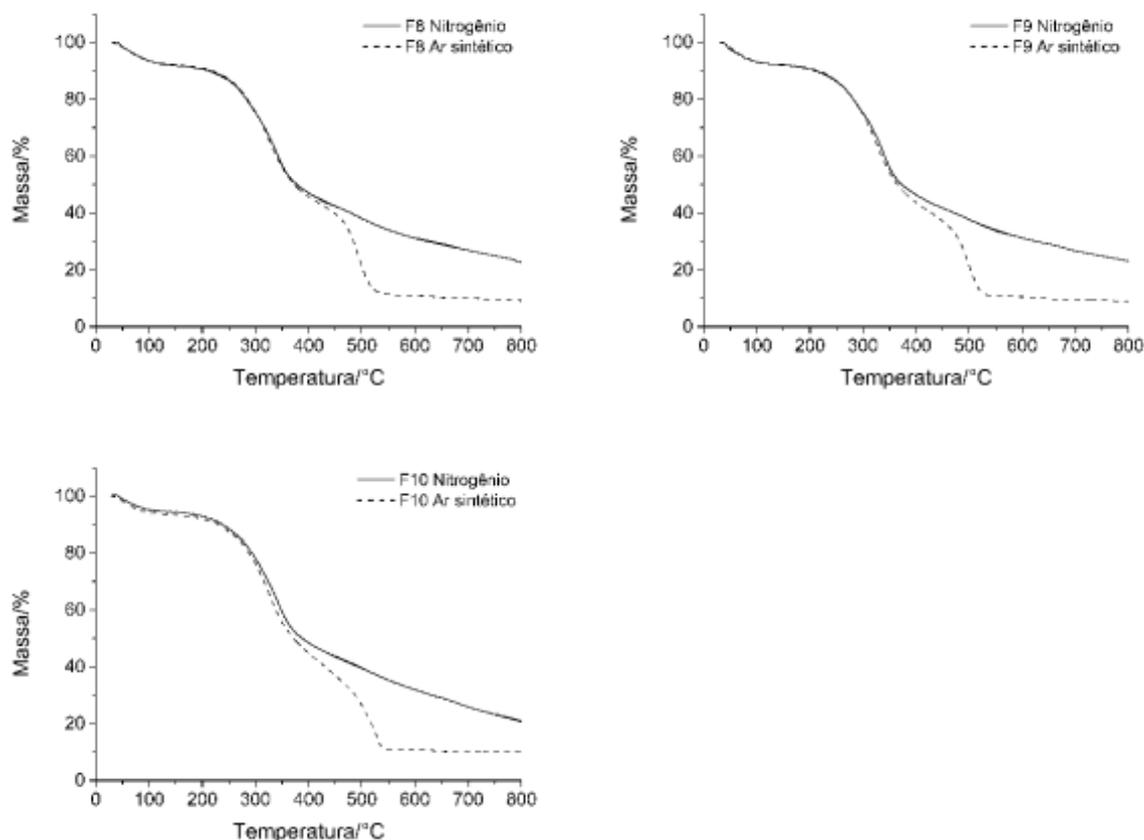
Amostras	1ª Etapa		2ª Etapa		3ª Etapa		4ª Etapa		Resíduo %
	T_{onset} °C	Δm %							
F0	50,28	5,70	286,57	43,07	375,83	15,37	533,93	11,99	23,97
F5	39,77	6,21	290,04	43,22	368,27	17,80	565,75	7,51	26,80
F8	41,35	6,88	279,44	43,25	395,98	17,36	589,93	8,32	22,82
F9	40,35	7,50	281,13	40,57	363,46	19,80	590,05	8,83	23,31
F10	40,94	5,74	294,06	43,99	368,28	16,56	570,24	18,89	20,90

Fonte: O autor (2020)

A Figura 5 mostra as curvas TG nas atmosferas de nitrogênio e ar sintético e β de 10 °C.min⁻¹. Na atmosfera de nitrogênio, o F0 mostrou quatro etapas de perda de massa. A primeira etapa ocorreu entre 39,77 e 122,80 °C ($T_{início}$ e T_{final}) com perda de massa (Δm) de 5,70% e pode ser atribuído à perda de voláteis e água. A 2ª etapa ocorreu entre 122,80 e 375,83 °C, com Δm de 43,07%, e a 3ª etapa ocorreu entre 375,83 e 533,93 °C, com Δm de 15,37%. A 2ª e 3ª etapas representam as degradações do conjunto de macro e microconstituintes das amostras (CORREIA et al., 2016, 2018). A 4ª etapa ocorreu entre 533,93 e 799,57 °C, com Δm de 11,99%, a última etapa é caracterizado por uma perda de massa lenta e progressiva, resultando em um resíduo ao final da análise de 23,97%. A perda de massa lenta e progressiva também foi descrita por FERNANDES; BOYLAN; SALGADO (2018) para *Spondias dulcis* Parkinson.

Figura 5 - Curvas TG de *A. muricata* em atmosferas de nitrogênio e ar sintético e β de 10 °C.min⁻¹





Fonte: O autor (2020)

Na atmosfera de nitrogênio, as amostras em diferentes granulometrias apresentaram quatro etapas de perda de massa (Tabela 4). A segunda etapa apresentou a maior perda de massa nesta atmosfera, sendo escolhida para os estudos de cinética térmica; as amostras F10 e F9 apresentaram as maiores perdas de massa na segunda e terceira etapas, respectivamente; e as amostras com o maior tamanho de partícula F0 e F5 apresentaram os maiores resíduos ao final da análise com 23,97 e 26,80%, respectivamente, mostrando que a taxa de transferência de calor e a degradação podem ter sido influenciadas pelo tamanho da partícula na atmosfera de nitrogênio.

Na atmosfera de ar sintético, a F0 mostrou três etapas de perda de massa. A primeira etapa ocorreu entre 34,31 e 143,50 °C ($T_{início}$ e T_{final}) com Δm de 8,57% e pode ser atribuído à perda de voláteis e água. A 2ª etapa ocorreu entre 144,43 e 365,15 °C, com Δm 39,05%, e a terceira etapa ocorreu entre 365,15 e 554,94 °C, com Δm 40,86%, resultando em um resíduo ao final da análise de 10,42%.

Tabela 5 - Dados termogravimétricos de *A. muricata* em atmosfera de ar sintético e β de $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ em diferentes tamanhos de partícula

Amostras	1ª Etapa		2ª Etapa		3ª Etapa		Resíduo
	$T_{onset}\text{ }^{\circ}\text{C}$	$\Delta m\%$	$T_{onset}\text{ }^{\circ}\text{C}$	$\Delta m\%$	$T_{onset}\text{ }^{\circ}\text{C}$	$\Delta m\%$	%
F0	43,39	8,57	290,77	39,05	482,93	40,86	10,42
F5	39,40	8,11	282,70	39,46	488,13	43,36	7,80
F8	32,97	7,20	274,46	41,24	479,64	41,22	9,30
F9	43,26	7,81	274,28	43,47	480,10	39,26	9,00
F10	36,42	6,70	287,75	43,16	505,55	39,86	10,19

Fonte: O autor (2020)

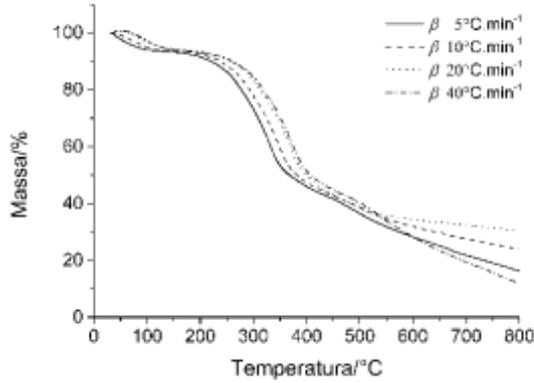
Na atmosfera de ar sintético, as amostras apresentaram três etapas de perda de massa (Figura 5), as amostras F9 (43,47%) e F10 (43,16%) mostraram as maiores perdas de massa na segunda etapa, as curvas TG não apresentaram perdas de massa após $550\text{ }^{\circ}\text{C}$ na β de $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. O resíduo obtido ao final da análise nesta atmosfera está de acordo ao encontrado pela determinação de cinzas totais (9,31%), esse achado está correlacionado com a presença de oxigênio na degradação. Os resultados evidenciam que a TG, em atmosfera de ar sintético, pode ser usada como um substituto ao método clássico para determinação de cinzas totais em materiais vegetais. Neste estudo, a atmosfera inerte parece ter atrasado a degradação das amostras, com o aparecimento da quarta etapa de degradação e um maior valor de resíduo (Figura 5).

A última etapa nas curvas TG em ambas as atmosferas estudadas pode estar relacionado à ciclização de grupos aromáticos e formação de carbono elementar, onde a aparência do material ao final da análise mostrou características visuais distintas, com coloração preto e branco para os resíduos em atmosferas de nitrogênio e de ar sintético, respectivamente. Guimarães et al. (2018) usaram a TG em diferentes atmosferas para estudar a *Poincianella pyramidalis* (Tul.) L.P. Queiroz, catingueira, os autores observaram mudanças na aparência do material carbonizado e atribuíram essas alterações a uma possível degradação incompleta na atmosfera inerte.

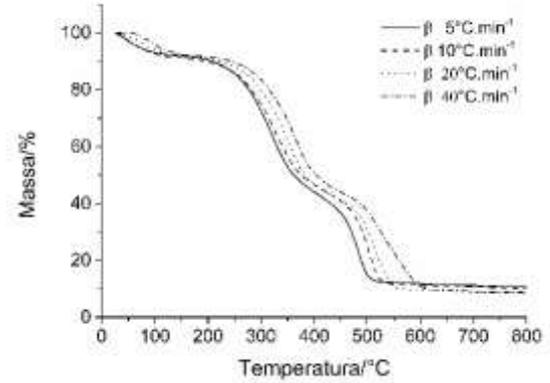
Nas curvas TG das amostras foram observados deslocamentos do evento de degradação para temperaturas mais altas com o aumento da β . Na atmosfera de nitrogênio, foi observado um aumento na massa de resíduo com o aumento da β , com exceção da amostra F0 (Figura 6).

Figura 6 - Curvas TG das folhas de *A. muricata* em tamanhos de partícula, taxas de aquecimento e atmosferas diferentes

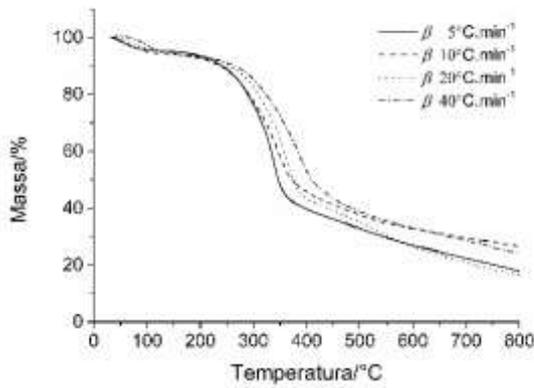
a



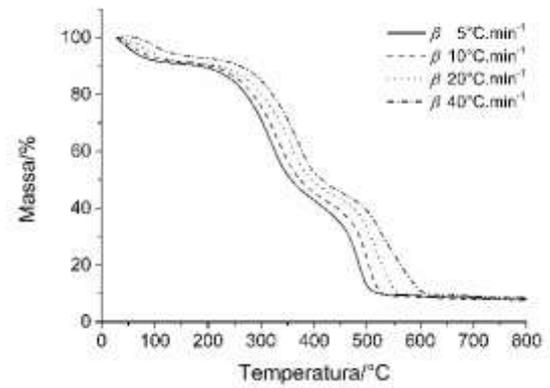
b



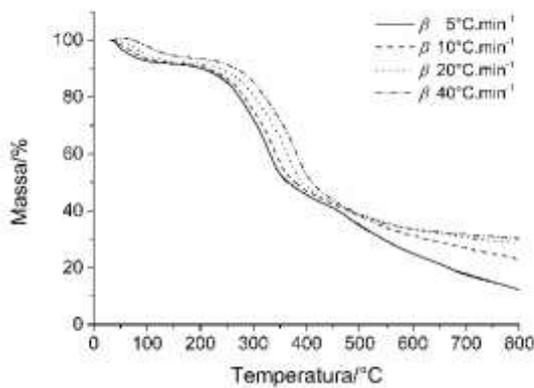
c



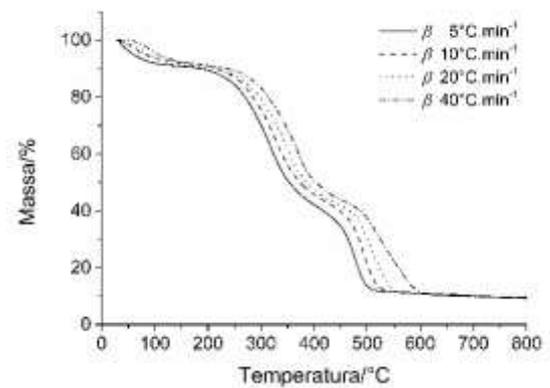
d



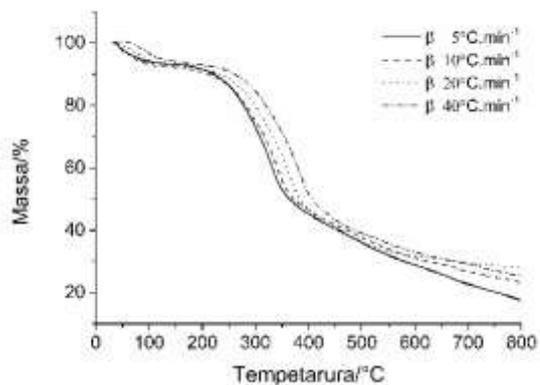
e



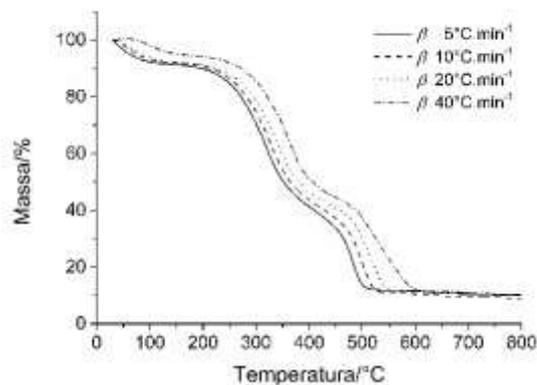
f



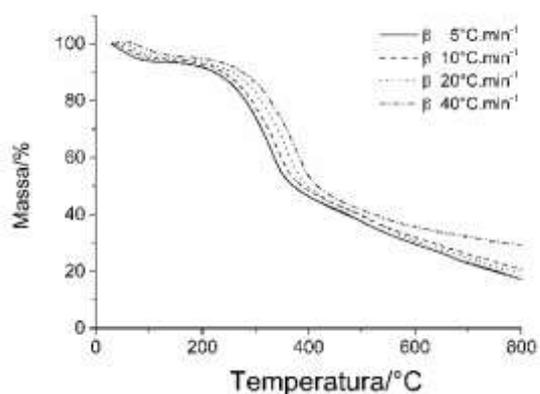
g



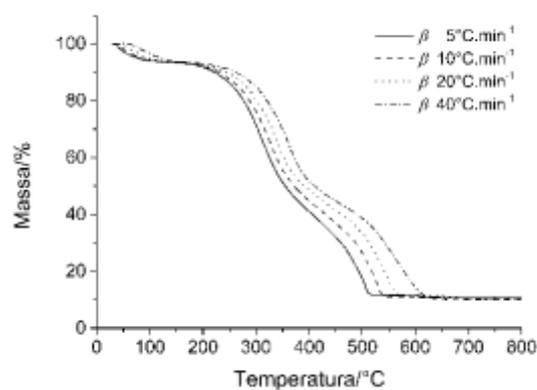
h



i



j



Legenda: a - F0 NITRO, b - F0 AIR, c - F5 NITRO, d - F5 AIR, e - F8 NITRO, f - F8 AIR, g - F9 NITRO, h - F9 AIR, i - F10 NITRO, j - F10 AIR. Fonte: O autor (2020)

Foi avaliado se existiam diferenças estatísticas que poderiam diferenciar os tamanhos das partículas em atmosferas e β diferentes usando a T_{onset} , nas etapas de degradação térmica (segunda e quarta para a atmosfera de nitrogênio e segundo e terceiro para a atmosfera de ar sintético) e o resíduo (Tabela 6).

Para o resíduo mineral, houve diferenças estatísticas significativas apenas para os tamanhos de partícula na atmosfera de ar sintético com p -valor de 0,002, mas não ocorreram diferenças significativas para os β em ambas as atmosferas estudadas.

Na 2ª etapa de degradação ocorreram diferenças significativas entre as taxas de aquecimento (β) em ambas as atmosferas estudadas, mas não houve diferenças significativas para os tamanhos de partículas, com p -valor de 0,816 e 0,821 para as atmosferas de nitrogênio e ar sintético, respectivamente. Não houveram diferenças nos eventos térmicos atribuídos à degradação de macro- e microconstituintes, possivelmente devido à perda de massa que ocorreu durante esses eventos tenha

sido originária de substâncias voláteis ou da degradação seguida de volatilização em altas temperaturas (DA COSTA et al., 2013).

Tabela 6 - Determinação das diferenças estatísticas entre as amostras usando o *p-valor* em taxas de aquecimento e atmosferas diferentes

Etapas	Atmosfera de nitrogênio		Atmosfera de ar sintético	
	β	Tamanho de partícula	β	Tamanho de partícula
	<i>p-valor</i>	<i>p-valor</i>	<i>p-valor</i>	<i>p-valor</i>
2ª Etapa	0	0,816	0	0,821
3ª Etapa	-	-	0,002	0,116
4ª Etapa	0,839	0,026	-	-
Resíduo	0,056	0,953	0,676	0,002

Fonte: O autor (2020)

Na 2ª etapa de degradação ocorreram diferenças significativas entre as taxas de aquecimento (β) em ambas as atmosferas estudadas, mas não houve diferenças significativas para os tamanhos de partículas, com *p-valor* de 0,816 e 0,821 para as atmosferas de nitrogênio e ar sintético, respectivamente. Não houve diferenças nos eventos térmicos atribuídos à degradação de macro e microconstituintes, possivelmente devido à perda de massa que ocorreu durante esses eventos tenha sido originária de substâncias voláteis ou da degradação seguida de volatilização em altas temperaturas (DA COSTA et al., 2013).

Para os eventos relacionados à formação de carbono elementar e ciclização de grupos aromáticos, a 3ª etapa na atmosfera de ar sintético não mostrou diferenças entre os tamanhos das partículas (*p-valor* 0,1116), mas apresentou diferenças para β com *p-valor* de 0,002. Para a 4ª etapa na atmosfera de nitrogênio, não houve diferenças entre a β (*p-valor* 0,839), mas houve diferenças na T_{onset} para os diferentes tamanhos de partículas (*p-valor*), com maior influência para F0 e F9.

No estudo cinético de decomposição térmica foi aplicado o modelo de Ozawa utilizando a TG dinâmica, na aplicação deste modelo, os tamanhos de partícula foram submetidos a quatro taxas de aquecimento diferentes (5, 10, 20 e 40 °C.min⁻¹). A fracção de decomposição (alfa 0,2) entre T_{onset} e T_{endset} do evento de decomposição foi determinada através da derivada do principal evento de degradação (segundo evento). A ordem da reação foi igual a zero para todas as amostras e a E_a e A

mostraram diferentes valores nas atmosferas de nitrogênio e ar sintético, como mostrado na Tabela 7. Os valores de E_a obtidos foram da seguinte ordem: F5> F0> F9> F10> F8 e F10> F0> F8> F9> F5 para as atmosferas de nitrogênio e ar sintético, respectivamente. Na atmosfera de nitrogênio, a E_a foi maior para F0 e F5, enquanto na atmosfera de ar sintético não ocorreu influência da E_a pelos tamanhos de partícula.

Tabela 7 - Tripleto cinético de Arrhenius calculado usando o modelo cinético de Ozawa para as folhas de graviola em tamanhos de partícula e atmosferas diferentes

Amostras	Atmosfera de nitrogênio			Atmosfera de ar sintético		
	E_a kJ.mol ⁻¹	A min ⁻¹	n	E_a kJ.mol ⁻¹	A min ⁻¹	n
F0	131,16 ± 3,49	9,96E+09	0	146,03 ± 5,02	2,67E+11	0
F5	135,79 ± 4,10	7,11E+10	0	119,48 ± 3,27	1,32E+09	0
F8	117,66 ± 4,18	8,39E+08	0	132,21 ± 2,52	1,92E+10	0
F9	126,15 ± 2,60	4,74E+09	0	124,10 ± 7,10	4,44E+09	0
F10	125,59 ± 5,43	3,33E+09	0	153,85 ± 3,13	1,72E+12	0

Legenda: E_a – Energia de ativação, A – Fator frequência, n – Ordem de reação. Fonte: O autor (2020)

Correia et al. (2015) estudaram os diferentes tamanhos de partícula de *Tabebuia caraíba*, onde a cinética de decomposição foi de ordem zero para todas as amostras. A cinética térmica não mostrou uniformidade nos valores de E_a atribuído a variações no processo de degradação, os autores concluíram que a decomposição térmica não foi semelhante no material vegetal em diferentes granulometrias, e os valores E_a das amostras variaram quando submetidos às mesmas condições e tratamentos de dados. Os resultados encontrados neste estudo são semelhante aos observados por Correia et al. (2015), no entanto, outros trabalhos também descreveram uma redução na E_a com a diminuição do tamanho de partícula das amostras (BRANDÃO et al., 2016), portanto, a complexidade da matriz vegetal pode induzir alterações nos parâmetros cinéticos para os diferentes tamanhos de partícula, dependendo das características intrínsecas do material vegetal.

5.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS FOLHAS DE *A. muricata*

Os infusos das folhas da graviola foram capazes de inibir o crescimento de todas as cepas bacterianas gram-positivas (*S. aureus*) e gram-negativas (*P. aeruginosa*, *E. coli* e *K. pneumoniae*) estudadas. São mostradas, na Tabela 8 as concentrações inibitórias mínimas (CIM) dos infusos.

A melhora da atividade antimicrobiana com a redução no tamanho das partículas pode ser atribuída à maior área superficial, permitindo melhor extração de metabólitos secundários ativos com ação antimicrobiana.

Tabela 8 - Atividade antimicrobiana e determinação da CIM das folhas da graviola contra microrganismos.

Amostras	CIM			
	microrganismos			
	<i>S.a</i>	<i>E.c</i>	<i>P.a</i>	<i>K.p</i>
F0	3,12	1,56	3,12	3,12
F5	1,56	1,56	3,12	3,12
F8	1,56	1,56	1,56	1,56
F9	0,78	1,56	1,56	0,78
F10	0,78	0,78	1,56	0,78

Legenda: *S.a.*: *Staphylococcus aureus*; *E.c.*: *Escherichia coli*; *P.a.*: *Pseudomonas aeruginosa*; *K.p.*: *Klebsiella pneumoniae*, concentração inibitória mínima em mg.mL⁻¹. Fonte: O autor (2020)

Estudos anteriores mostraram atividade de outras espécies do gênero Annonaceae, o extrato etanólico de *A. crassiflora* mostrou atividade contra *Bordetella bronchiseptica*, *P. aeruginosa*, *Rhodococcus equi* e *S. aureus* (VALLE et al., 2014); os extratos de *A. ambotay* Aubl. (casca) e *A. cherimolia* Mill (folhas) apresentaram atividade contra *Bacillus subtilis* e *S. aureus* (TAKAHASHI et al., 2006).

Os extratos de graviola apresentaram atividade antimicrobiana contra *Mycobacterium tuberculosis* (RADJI; KURNIATI; KIRANASARI, 2015; VAN DE VENTER et al., 2014), mas os extratos hexânico das folhas de graviola não mostraram atividade contra *B. subtilis*, *E. coli*, *Micrococcus luteus*, *P. aeruginosa* e *S. aureus* (TAKAHASHI et al., 2006).

A atividade antimicrobiana presente nos extratos aquosos e a presença de atividade contra bactérias gram-positivas e gram-negativas podem ser explicadas pela influência do solvente e do método de extração na variedade de metabólitos secundários extraídos (KOSTOVA; DINCHEV, 2005; VIEIRA et al., 2010).

5.4 TRIAGEM FITOQUÍMICA

Os resultados da triagem fitoquímica foram positivos para flavonoides, taninos e acetogeninas e negativos para alcaloides e saponinas (Tabela 9). Outro estudo analisou os extratos etanólico e aquoso (brutos e concentrados em rota-evaporador) das folhas de *A. muricata* e reportaram a presença de alcaloides, flavonoides, terpenoides, cumarinas, lactonas, antraquinonas, taninos, glicosídeos cardiotônicos, fenóis, fitoesteróis e saponinas, sendo as concentrações dos metabolitos extraídos influenciados pelo solvente extrator (GAVAMUKULYA et al., 2014).

Nosso estudo avaliou apenas o extrato hidroalcoólico concentrado em rota-evaporador, a ausência de alcaloides e saponinas no nosso extrato pode estar relacionado à nutrição das plantas, região de cultivo ou período de colheita. A presença de flavonoides e taninos totais pode sugerir uma possível atividade, anti-inflamatória, antitumoral e antioxidante (WAHAB et al., 2018; CORIA-TÉLLEZ et al., 2018), já as acetogeninas possuem atividade anticancerígenas (MOGHADAMTOUSI et al., 2014).

Tabela 9 - Triagem fitoquímica do extrato hidroalcoólico de *A. muricata*

Método	Classe dos constituintes	Intensidade
Mayer		-
Dragendorff	Alcaloides	-
Ácido Sílico-tungstico		-
Bouchardat		-
Lieberman-Burchard	Esteroides	+
Kedde	Acetogeninas	+
FeCl ₃ 2%	Taninos	++
Fluorescência	Flavonoides	+
Espuma	Saponinas	-

Legenda: (-) ausência dos constituintes; (+) presença dos constituintes em baixa a média concentração; (++) presença dos constituintes em média a alta concentração; (+++) presença dos constituintes em alta concentração. Fonte: O autor (2020)

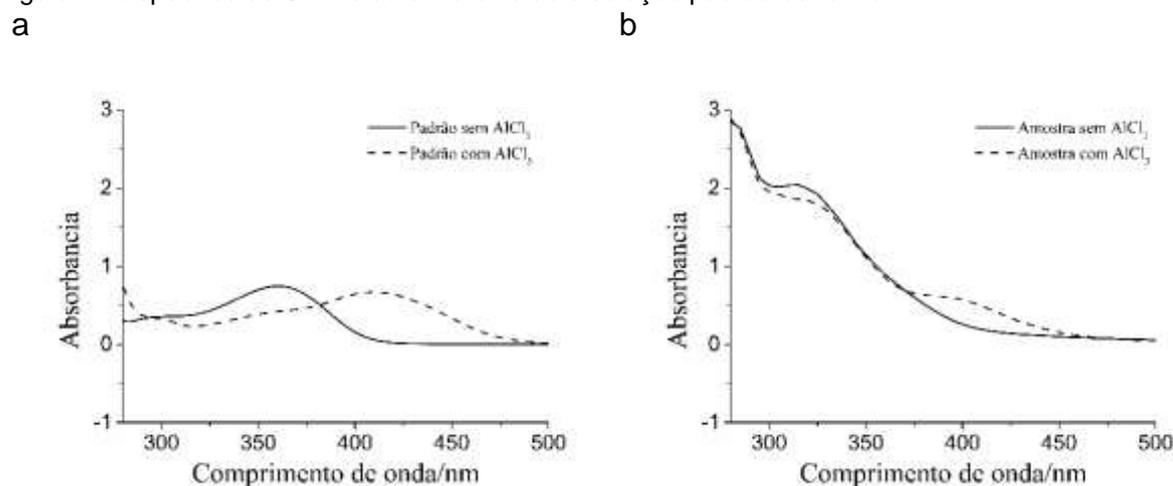
5.5 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE FLAVONOIDES TOTAIS

Partindo da triagem fitoquímica que confirmou a presença de compostos polifenóis como taninos e flavonoides, associado ao fato da ANVISA através da RDC 26/2014, que considera indispensável a quantificação dos constituintes químicos presentes nos medicamentos fitoterápicos e, na ausência de métodos analíticos descritos em compêndios oficiais, um método analítico deve ser validado segundo resolução vigente (BRASIL, 2014).

Métodos analíticos para a quantificação de flavonoides totais por espectroscopia Uv-vis estão bem descritos na literatura (CHABARIBERI et al., 2009; MATIĆ; SABLJIĆ; JAKOBEK, 2017; MEDA et al., 2005; RAMOS et al., 2017), no entanto, devido à complexidade das matrizes vegetais e a ausência de um método farmacopeico para quantificação de *FT*, optamos pela validação do método analítico segunda a RDC N° 166/2017 (BRASIL, 2017). A preparação dos reagentes e preparo de amostra foi adaptado do estudo descrito por MEDA et al., 2005.

A especificidade do método foi comprovada pela comparação do espectro de absorvância das amostras e padrão com e sem adição do $AlCl_3$ onde na sua ausência não ocorre o efeito de deslocamento do pico de absorção para maior comprimento de onda (deslocamento batocrômico) (Figura 7).

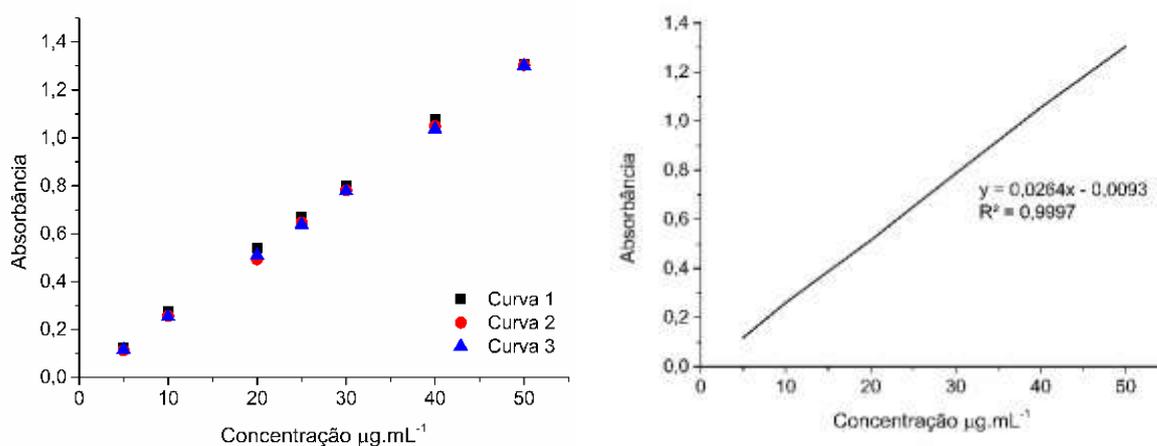
Figura 7 - Espectros de UV-vis do extrato fluido e solução padrão de rutina



Legenda: a - Espectros de UV-vis da solução padrão, b – Espectro de UV-vis do extrato fluido com e sem adição de $AlCl_3$. Fonte: O próprio autor (2020).

A linearidade foi realizada através da construção de três curvas da solução padrão nas concentrações de 5 a 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. As curvas obtidas demonstraram que os resultados são diretamente proporcionais à concentração do marcador na amostra, como mostrado na Figura 8 e Tabela 10.

Figura 8 - Curvas da linearidade e equação da reta
A B



Legenda: a – linearidades individuais, b – Linearidade média de três repetições e determinação da equação da reta. Fonte: O autor (2020)

Tabela 10 - Absorbâncias relativas as curvas de calibração obtidas no estudo de linearidade

Concentração	Curva 1	Curva 2	Curva 3	¹ Média	CV%
5	0,112	0,113	0,116	0,114	4,373524
10	0,243	0,256	0,253	0,251	4,137772
20	0,495	0,493	0,510	0,499	4,626914
25	0,636	0,647	0,638	0,640	2,364793
30	0,764	0,781	0,778	0,774	1,589407
40	1,043	1,049	1,037	1,043	2,05055
50	1,309	1,304	1,301	1,305	0,269247

Legenda: ¹Média das três curvas da linearidade, Concentração em $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Fonte: O autor (2020)

Os dados da ANOVA para avaliação da aplicabilidade e ajuste do modelo mostram que a relação entre a área e a concentração é estatisticamente significativa, ao nível de significância de 95%, pois o valor de $F (54593,699) > F \text{ crítico } (4,381)$. É possível visualizar também que não há falta de ajuste do modelo, pois o valor de $F (1,690) < F \text{ crítico } (2,958)$.

Como o *p*-valor foi igual a 0 no teste F da ANOVA e é menor que 0,05, não rejeitamos a significância do modelo linear ao nível 5%. Portanto, o coeficiente angular é diferente de 0 (zero). Já para o coeficiente linear o *p*-valor foi igual a 0 no teste t student da ANOVA e é menor que 0,05, não rejeitamos a significância do intercepto ao nível 5%.

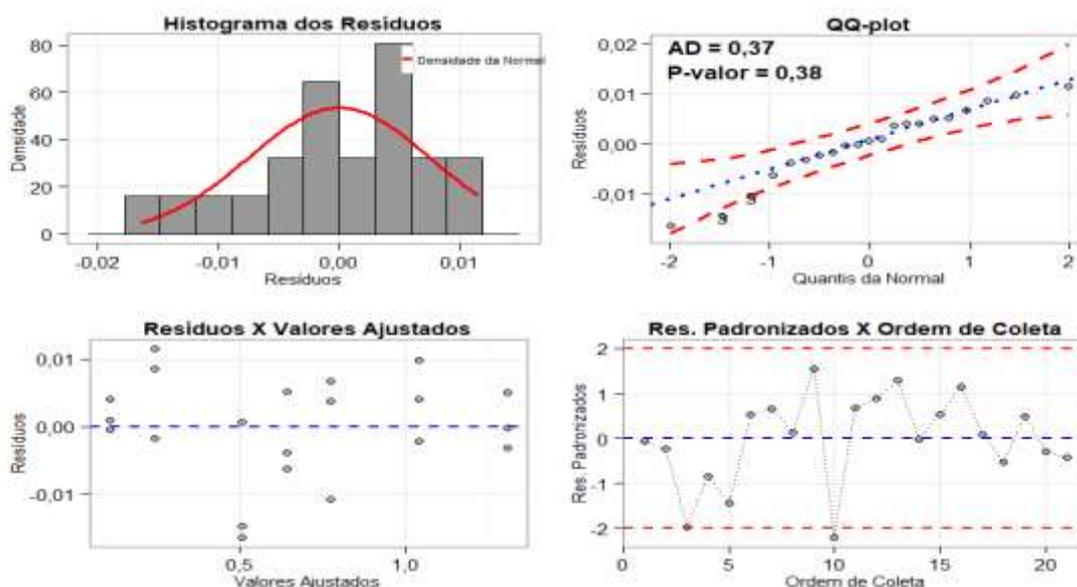
A avaliação da normalidade, da homocedasticidade e independência das observações foram avaliados pelos testes de Anderson-Darling, de Cochran e de Durbin-Watson, respectivamente, onde os *p*-valor foram maiores que 0,05 (Tabela 11). A Figura 9 mostra o gráfico de probabilidade normal, o histograma e a plotagem dos resíduos versus o ajuste e a ordem de obtenção dos dados.

Tabela 11 - Parâmetros estatísticos da linearidade

Teste	Métodos	<i>p</i> -valor
Teste F da ANOVA	ANOVA	0
Teste de normalidade dos resíduos	Anderson-Darling	0,3841
Teste de homocedasticidade	Cochran	1
Valores extremos na resposta		
Teste de independência das observações	Durbin-Watson	0,4071

Fonte: O autor (2020)

Figura 9 - Parâmetros estatísticos obtidos na análise dos resíduos da linearidade do método para determinação do teor de FT utilizando espectroscopia Uv-vis



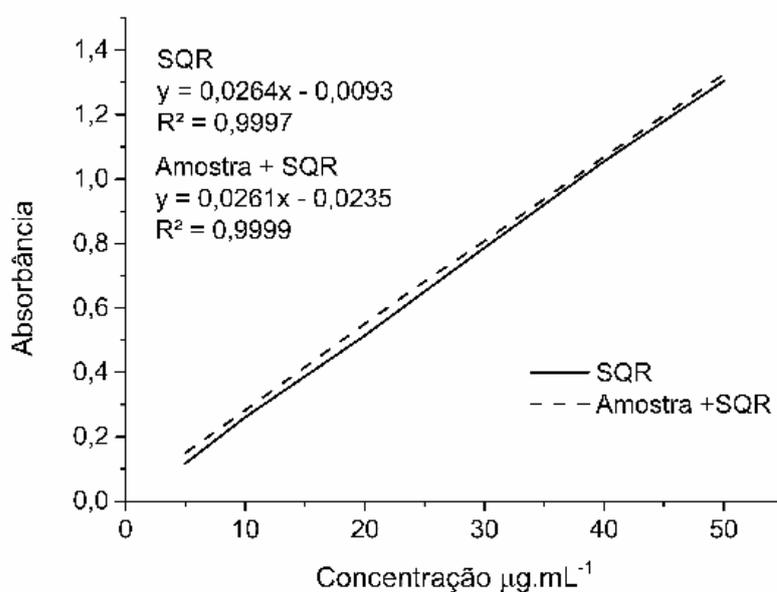
Fonte: O autor (2020)

A partir dos valores da curva de calibração foram estimados os limites de quantificação (LQ) e detecção (LD). Os valores de LQ e LD são 3,36 e 1,11 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,

respectivamente. O intervalo é a faixa de trabalho onde a amostra apresenta boa precisão e exatidão e, neste trabalho o intervalo de trabalho foi definido entre 5 e 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Para a determinação do efeito matriz o coeficiente angular das curvas analíticas da SQR e da amostra fortificada com o SQR foram analisados. É mostrado, na Figura 10 as curvas da amostra mais SQR e do SQR, o *p*-valor (0,4548) foi maior que 0,05, mostrando que as curvas são paralelas, também foi verificado que as mesmas possuem intercepto semelhantes (*p*-valor 0,2463), portanto, o método não apresenta interferência provocada pela matriz complexa do extrato.

Figura 10 - Curvas do efeito matriz



Legenda: SQR – substância química de referência. Fonte: O autor (2020)

Para determinar a concentração percentual presente na amostra, tomou-se como concentração teórica o valor de 15 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. A repetibilidade e precisão intermediária obtiveram coeficientes de variação menores que 1% como observado na Tabela 12, confirmando boa precisão do método analítico, com *p*-valor igual a 0,81.

A exatidão do método analítico foi avaliada através da análise em três concentrações: baixa, média e alta, referentes aos valores de 50, 100 e 150% da concentração obtida na precisão, onde é possível visualizar que o método tem exatidão, com erro padrão relativo (EPR) entre -3,81 e 2,60, e *p*-valor 0,2023 (Tabela 12). A análise do extrato fluido mostrou valores ligeiramente superiores a 100% do

valor teórico para a precisão e pode estar relacionado a concentração do EHA devido a evaporação do solvente extrator.

Tabela 12 - Repetibilidade, precisão intermediária e exatidão em três diferentes níveis

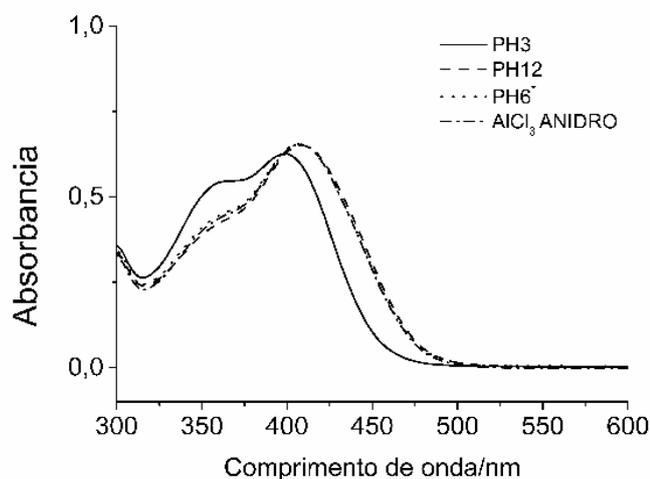
Nível %	Conc teórica $\mu\text{g.mL}^{-1}$	¹ ABS	¹ Conc experimental		CV%	EPR	* <i>p</i> -valor
			$\mu\text{g.mL}^{-1}$	%			
Precisão							
1º dia	15	0,6295	15,36	102,42	0,68	-	
2º dia	15	0,6302	15,39	102,62	0,96	-	0,81
Inter-dia	15	0,6298	15,38	102,52	0,80	-	
Exatidão							
50%	23	0,8793	23,67	102,60	0,39	2,60	0,2023
100%	30	1,0786	29,85	96,67	1,06	-3,33	
150%	38	1,2628	36,92	96,19	1,24	-3,81	

Legenda: Conc - Concentração, ABS - Absorbância, EPR - Erro padrão relativo da média, ¹Media de 3 determinações, *Valores estatisticamente diferentes para *p*-valor $\leq 0,05$. CV% (Coeficiente de variação). Fonte: O autor (2020)

Os parâmetros monitorados na robustez foram pH (3, 6 e 12) e diferentes tipos de AlCl_3 (anidro ou hexa-hidratado). Investigou-se variações no teor de *FT* em função da absorbância. As avaliações foram realizadas em uma sequência de três corridas nas condições de preparo de amostra estabelecidas no método e levou-se em consideração na análise estatística do parâmetro robustez (Tabela 13).

A variação do pH na robustez mostrou redução dos valores de absorbância no pH 3, para a solução amostra e padrão, esse fenômeno ocorreu devido a ligação 3',4' dihidroxido do anel B dos flavonoides serem instáveis em meio ácido (HCl) (MABRY; MARKHAM; THOMAS, 1970). Este fenômeno não foi observado para os demais pHs (Figura 11).

Figura 11 - Espectros UV-vis das amostras na robustez



Fonte: O autor (2020)

Tabela 13 - Dados para avaliação da robustez considerando diferentes pH e AlCl₃

Condições	¹ ABS	¹ Concentração		CV%	² p-valor
		$\mu\text{g.mL}^{-1}$	%		
pH	3	0,5850	14,84 ^b	98,93	0,036
	*6	0,6487	15,20 ^{ab}	101,33	
	12	0,6497	15,60 ^a	104,06	
AlCl ₃	Anidro	0,6296	14,94 ^{ab}	99,61	0,49

Legenda: ¹Valores médios (n = 3 para cada nível). ²Valores estatisticamente diferentes para p-valor \leq 0,05. *Condição normal de análise pH 6 e AlCl₃.6H₂O. Valores de uma mesma coluna, com a mesma letra, não diferem significativamente entre si (Teste de Tukey ao nível de 5% de significância). Fonte: O autor (2020)

As análises utilizando AlCl₃ anidro apresentaram concentração e absorvância próximos dos resultados na condição normal de análise, com CV% de 0,49%, como vantagem da utilização do AlCl₃.6H₂O estão a menor higroscopicidade e o menor risco de acidentes, pois o AlCl₃ anidro durante sua solubilização ocorre uma reação exotérmica com aquecimento e risco de queimadura.

O método analítico para quantificação de flavonoides totais apresentou boa precisão com coeficiente de variação menor que 1%, a exatidão do método em três níveis mostraram EPR entre -3,81 e 2,60%, o preparado da amostra pode ser feito com AlCl₃ anidro ou hidratado e numa faixa de pH entre ácido fraco à básico, a matriz vegetal não influenciou na quantificação da rutina, os LD e LQ foram estimados em

3,36 e 1,11 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente. A faixa de trabalho foi determinada entre 5 e 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de acordo com a linearidade. O método analítico para a quantificação de flavonoides totais atende aos critérios estabelecidos pela RDC nº 166 de 2017 (BRASIL, 2017).

5.6 OTIMIZAÇÃO E PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO

Após a validação do método analítico para a quantificação dos flavonoides totais das folhas de graviola, foram avaliadas as melhores condições de extração dos marcadores químicos da planta.

A maceração é um método utilizado para a extração dos constituintes químicos das drogas vegetais, tendo como vantagens o baixo custo de operação e a facilidade de transposição de escala. Nesse contexto, o método de extração por maceração foi escolhido para a realização do planejamento fatorial 3^2 .

É mostrado, na Tabela 14 que o aumento da polaridade do solvente extrator induz ao aumento da quantidade de flavonoides totais extraídos utilizando a mesma proporção de droga/solvente, onde ocorreu incremento de 30% de *FT* se comparado as proporções de 30 e 70% de etanol. O teste comparativo de Tukey não mostrou diferenças significativas para as amostras extraídas com 50 ou 70% de etanol, usando a mesma proporção de droga/solvente.

Tabela 14 - Planejamento fatorial 3^2 em diferentes proporções do solvente extrator e droga/solvente e os valores de concentração de *FT* e resíduo seco

Amostras	Solvente (etanol/água)	Proporção (droga/solvente)	Concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Resíduo Seco (%)
1	30% (-)	5% (-)	13,25 ^a	1,33
2	30% (-)	10% (0)	24,08 ^b	2,55
3	30% (-)	15% (+)	33,67 ^c	3,44
4	50% (0)	5% (-)	16,42 ^d	1,48
5	50% (0)	10% (0)	29,63 ^e	2,78
6	50% (0)	15% (+)	45,13 ^f	3,88
7	70% (+)	5% (-)	16,65 ^d	1,48
8	70% (+)	10% (0)	29,89 ^e	2,77
9	70% (+)	15% (+)	44,07 ^f	4,11

Legenda: Valores em linhas diferentes, com a mesma letra, não diferem significativamente entre si (Teste de Tukey ao nível 5% de significância). Fonte: O autor (2020)

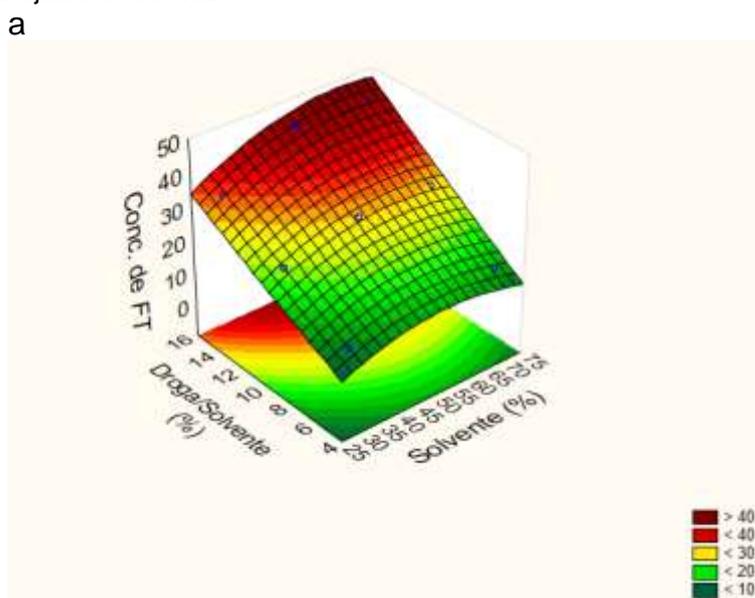
É mostrado, na Tabela 15 os *p*-valor para a concentração de *FT* e resíduo seco (variáveis dependentes). Para a concentração de *FT*, as variáveis independentes solvente e proporção droga/solvente mostraram diferença significativa em separado, mas não ocorreu diferença significativa para união das variáveis. Para o resíduo seco, as variáveis independentes em separado e sua união mostraram diferença significativa. O modelo de superfície resposta e diagrama de Pareto mostraram que a proporção de droga/solvente é a variável com maior influência sobre o teor de *FT* e do resíduo seco, esta resposta é esperada, devido uma maior quantidade de droga vegetal possuir maiores teores de constituintes químicos (Figura 12).

Tabela 15 - Análise estatística ANOVA para as variáveis independentes do planejamento fatorial 3².

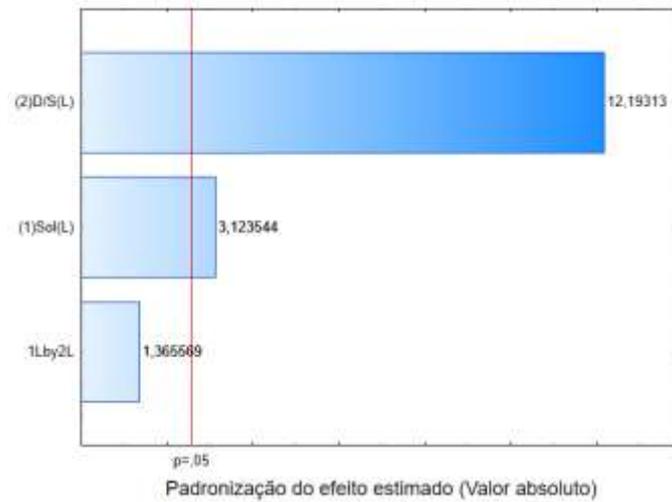
Fator Variável	GL	Concentração		Resíduo seco
		<i>p</i> -valor		
1-Solvente (%)	2	0,0270*	0,0146*	
2-Droga/solvente (%)	2	0,00083*	0,000058*	
1*2	1	0,1321	0,0281*	
Error	3			
Total	8			

Legenda: *significativo ao nível de 5%, valores do error para concentração e resíduo seco 2,9018 e 0,0042, respectivamente, concentração em $\mu\text{g.mL}^{-1}$, Resíduo seco em %. Fonte: O autor (2020)

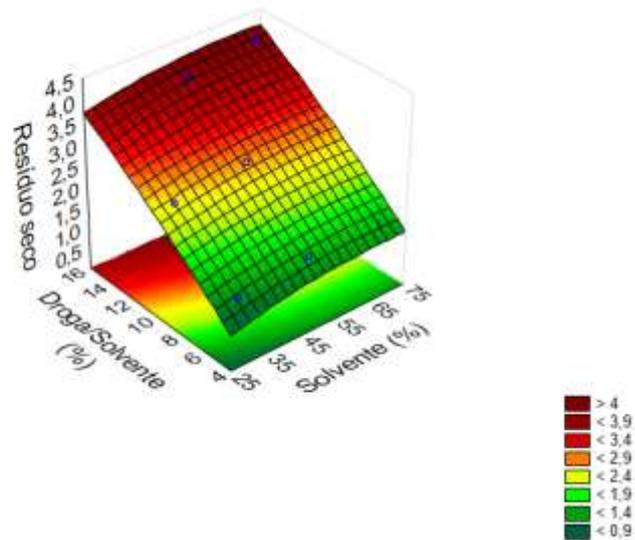
Figura 12 - Modelo superfície resposta (MSR) e Diagrama de Pareto para as variáveis independentes do planejamento fatorial



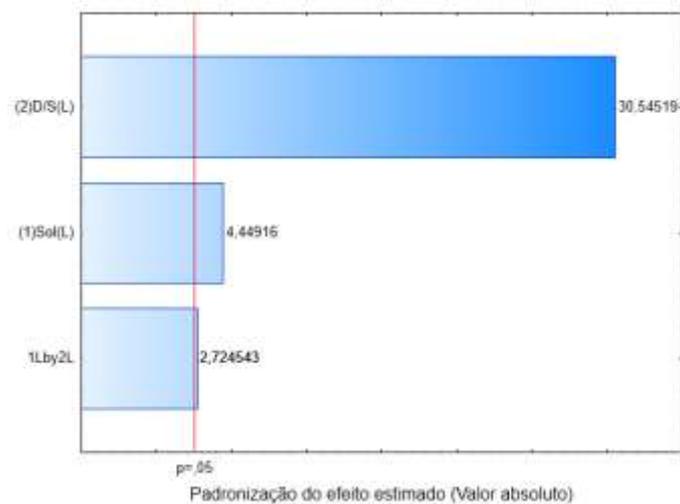
b



c



d



Legenda: a - MSR da concentração da *FT* em $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, b - Diagrama de Pareto da concentração de *FT*, c - MSR do resíduo seco em %, d - Diagrama de Pareto do resíduo seco; D/S – Proporção droga/solvente em %; Sol – Solvente extrator em %. Fonte: O autor (2020)

Nas etapas iniciais do desenvolvimento dos medicamentos fitoterápicos, a caracterização física, química e físico-química é necessária para garantir a segurança, eficácia e qualidade dos produtos, a droga vegetal foi caracterizada, a quantificação do marcador químico do extrato de graviola e o EHA foi padronizado e caracterizado. O método selecionado para a extração foi a maceração a frio e a proporção droga/solvente e solvente extrator foram 15% e 50-70% respectivamente.

As formas farmacêuticas sólidas são preferidas em relação às líquidas, devido a maior estabilidade, facilidade de transporte e conveniência. As vantagens anteriormente citadas favorecem o desenvolvimento e produção de extratos seco. Para este fim, foi realizado um planejamento fatorial completo com o objetivo de obter extratos secos com propriedades físicas e químicas adequadas ao desenvolvimento de produtos farmacêuticos sólidos, o EHA padronizado foi seco por *spray dryer*, utilizando DS como adjuvante de secagem.

5.7 OBTENÇÃO E AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS TECNOLÓGICOS DOS EXTRATOS SECOS DE *A. muricata*

5.7.1 Rendimento do processo

O rendimento do processo (*RP*) variou entre 50,54 e 71,60% (Tabela 16) e sofreu influência com o aumento da concentração de adjuvante de secagem (*C*). A análise estatística mostrou diferença significativa com *p-valor* igual a 0,019 e valor de *F* de 21,665 (Tabela 17), com $R^2 = 0,9352$, valores de $R^2 > 0,85$ são apropriados para explicar os efeitos das variáveis independentes nas respostas selecionadas (GALLO; RAMÍREZ-RIGO; BUCALÁ, 2019). Em escala laboratorial, rendimentos acima de 50% são considerados satisfatórios (AL-KHATTAWI et al., 2018; VLADIĆ et al., 2016).

Estudos anteriores relataram a obtenção de pós secos das folhas de *A. muricata* utilizando SD, os rendimentos de processo variaram entre 4,44 – 13,73% e 0,79 – 6,67% (DAUD et al., 2017, CASTRO JR; MAGSINO; CUARTO, 2018). Os *RP* relatados diferem dos obtidos neste trabalho e podem estar relacionados as proporções e tipo de adjuvante de secagem (ADS) utilizados. O *RP* pode aumentar com o aumento da concentração do ADS (TONTUL; TOPUZ, 2017; VASCONCELOS et al., 2005).

O aumento da concentração de DS levou a um aumento no rendimento devido a um aumento no teor sólidos totais da mistura, o que aumenta sua viscosidade (SABLANIA; BOSCO, 2018).

5.7.2 Teor de Flavonoides totais do extrato seco

O extrato líquido apresentou resíduo seco de $1,52 \pm 0,01\%$ e *FT* de $12,14 \pm 0,10 \text{ mg.g}^{-1}$, enquanto os ES apresentaram *FT* entre 37,50 e 49,40 mg.g^{-1} . A análise estatística mostrou diferenças significativas entre as amostras, onde a variável C apresentou influência no processo de secagem com valor de F de 666,12 (*p*-valor = 0,0015) (Tabela 17). Para avaliar se o aumento do *FT* foi causado pela redução de DS ou degradação do marcador, as concentrações de *FT* foram calculadas subtraindo a massa de DS das amostras (*FT*_{SDS}). O *FT*_{SDS} variou entre 51,64 e 54,89 mg.g^{-1} (Tabela 16), e não houve diferença estatística significativa com valor de *p*-valor = 0,3580, adicionalmente os valores de $R^2 = 0,9971$ e 0,9151 para *FT* e *FT*_{SDS} (Tabela 17), respectivamente mostrando que o processo de secagem é homogêneo.

Tabela 16 - Projeto experimental para execuções da secagem por aspersão, variáveis independentes e valores de respostas obtidos

Amostras	FA	B	C	RP	FT	FT _{SDS}	TU	Ea
ES01	3 (-)	130 (-)	10 (-)	64,10	49,40±2,46	54,89±2,73	4,76±0,18	67,13±0,66
ES02	9 (+)	130 (-)	10 (-)	54,63	49,06±1,53	54,51±1,70	3,17±0,07	113,3±0,97
ES03	3 (-)	170 (+)	10 (-)	50,54	46,48±3,26	51,64±3,63	4,34±0,37	98,22±6,15
ES04	9 (+)	170 (+)	10 (-)	56,10	47,52±1,65	52,80±1,83	4,49±0,26	61,49±3,97
ES05	3 (-)	130 (-)	30 (+)	71,60	38,12±0,77	54,46±1,10	2,47±0,43	63,62±3,05
ES06	9 (+)	130 (-)	30 (+)	71,53	37,50±0,48	53,58±0,68	2,61±0,31	143,01±10,36
ES07	3 (-)	170 (+)	30 (+)	69,41	38,00±0,42	54,29±0,60	2,66±0,25	85,76±7,40
ES08	9 (+)	170 (+)	30 (+)	66,00	38,36±0,72	54,80±1,03	2,97±0,03	107,66±5,02
ES09	6 (0)	150 (0)	20 (0)	66,24	43,66±1,00	54,57±1,25	4,76±0,13	80,93±1,88
ES10	6 (0)	150 (0)	20 (0)	68,43	43,69±0,62	54,62±0,78	4,24±0,24	71,46±2,17
Amostras	Dv	DA	DC	FH	IC	AR	TF	
ES01	25,69	0,43±0,01	0,57±0,01	1,33±0,02	24,81±1,13	18,51±1,12	7,00±0,56	
ES02	50,60	0,36±0,01	0,47±0,02	1,31±0,02	23,77±1,10	18,40±0,63	4,83±0,11	
ES03	33,68	0,23±0,01	0,34±0,01	1,46±0,07	31,57±1,24	∞	∞	
ES04	46,55	0,46±0,02	0,57±0,03	1,24±0,06	18,95±1,30	20,59±1,83	1,52±0,70	
ES05	11,51	0,22±0,01	0,30±0,01	1,36±0,01	26,44±0,54	∞	∞	
ES06	26,86	0,31±0,01	0,42±0,02	1,35±0,02	26,10±1,32	22,29±0,85	7,93±0,38	
ES07	7,26	0,19±0,02	0,27±0,02	1,42±0,04	29,56±2,04	∞	∞	
ES08	23,20	0,36±0,01	0,47±0,01	1,33±0,02	24,54±1,24	23,59±0,28	7,47±1,40	
ES09	29,51	0,32±0,01	0,39±0,01	1,22±0,03	18,19±1,14	16,87±1,32	4,06±0,23	
ES10	22,64	0,27±0,01	0,36±0,01	1,33±0,03	24,88±1,55	16,52±1,32	5,36±0,31	

Legenda: FA-Fluxo de alimentação (mL.min⁻¹); B- Temperatura de entrada (°C); C- Concentração de adjuvante de secagem (%); RP- Rendimento do processo (%); FT - Teor de flavonoides totais em mg.g⁻¹ do ES; FT_{SDS} - Teor de flavonoides totais em mg.g⁻¹ do ES sem DS; TU- Teor de umidade (%); Ea- Energia de ativação (kJ.mol⁻¹); Dv- Diâmetro médio de partícula (µm); DA- Densidade aparente (g.cm⁻³); DC- Densidade compactada (g.cm⁻³); FH- Fator de Hausner; IC- Índice de Carr (%); AR- Ângulo de Repouso (°); TF- taxa de fluxo (g.s⁻¹); ∞- não apresentaram fluxo de pó. Fonte O autor (2020)

Tabela 17 - Dados estatísticos ANOVA do planejamento fatorial para secagem do extrato de *A. muricata*

FV	GL	Teste F								
		<i>RP</i>	<i>FT</i>	<i>TU</i>	<i>Dv</i>	<i>Ea</i>	<i>DA</i>	<i>DC</i>	<i>FH</i>	<i>IC</i>
FA	1	0,41852	0,080	0,125	38,960*	1,862	17,488	9,593	1,629	1,796
B	1	3,00746	5,646 ⁿ	0,275	0,129	1,665	0,561	0,518	0,090	0,061
C	1	21,66529*	666,123*	4,703	62,797*	3,123	16,514	11,096	0,261	0,282
FA*B	1	1,04727	2,262	0,469	1,071	3,644	14,901	8,325	1,090	1,312
FA*C	1	0,00142	0,372	0,462	0,344	1,036	0,695	1,403	0,300	0,342
B*C	1	0,14635	10,978	0,015	1,147	0,281	1,387	1,265	0,001	0,001
FA*B*C	1	2,58612	0,068	0,312	1,303	1,286	4,894	2,775	0,216	0,236
Resíduo	2									
Total	9									
R ²		0,9352	0,9971	0,7608	0,91467	0,8658	0,9658	0,9459	0,6420	0,6683

Legenda: FA- Fluxo de alimentação; B- Temperatura de entrada; C- Concentração de adjuvante de secagem; RP- Rendimento do processo; FT - Teor de flavonoides totais; TU- Teor de umidade; *Dv*- Diâmetro médio de partícula; *DA*- Densidade aparente; *DC*- Densidade compactada; *FH*- Fator de Hausner; *IC*- Índice de Carr; *Ea*- Energia de ativação. *Significativo ao nível de 5% pelo teste F. GL – grau de liberdade; FV - Fontes de variação. Fonte: O autor (2020)

5.7.3 Teor de umidade

O teor de umidade (TU) do pó final desempenha um papel importante em sua fluidez, viscosidade e estabilidade durante o armazenamento (MOGHBELI et al., 2020). Os ES obtiveram TU entre 2,47 e 4,76% (Tabela 16). A análise estatística não mostrou diferença significativa para TU (p -valor 0,0596), sendo o $R^2 = 0,7608$. Pós com TU inferior a 5% apresentam baixa atividade da água, baixo ocorrência de contaminação microbiana, favorecendo o armazenamento por longo prazo e, além disto, a baixa umidade limita a capacidade da água de agir como um plastificante, reduzindo a aglomeração dos pós (TONTUL; TOPUZ, 2017; VIDOVIĆ et al., 2014).

Os ES com 30% de DS apresentaram os melhores rendimentos de processo e menor TU . Em contraponto, os ES com 10% de adjuvante de secagem apresentaram aspecto escuro com aglomerados e uma compactação de pó mais intensa em relação aos demais, após algumas semanas. Fato semelhante foi relatado (observado) para o ES de *Rapanea ferruginea* Mez (BACCARIN et al., 2016).

5.7.4 Tamanho de Partícula

O tamanho de partícula está diretamente relacionado as propriedades de fluxo dos pós, influenciando assim na qualidade dos produtos intermediários e finais (LOCH-NECKEL et al., 2018). O D_v apresentou variação entre 7,26 e 50,60 μm (Tabela 16). O teste de Fisher mostrou influência das variáveis independentes FA e C com valores de F de 38,96 (p -valor = 0,0247) e 62,80 (p -valor = 0,0155), respectivamente, com $R^2 = 0,9147$. O aumento do fluxo de alimentação e a redução da concentração de DS aumentaram o diâmetro médio das partículas. Esse é um resultado esperado, pois com o aumento do fluxo de alimentação também ocorre um aumento no tamanho das gotículas do spray e, conseqüentemente, do tamanho das partículas (AL-KHATTAWI et al., 2018).

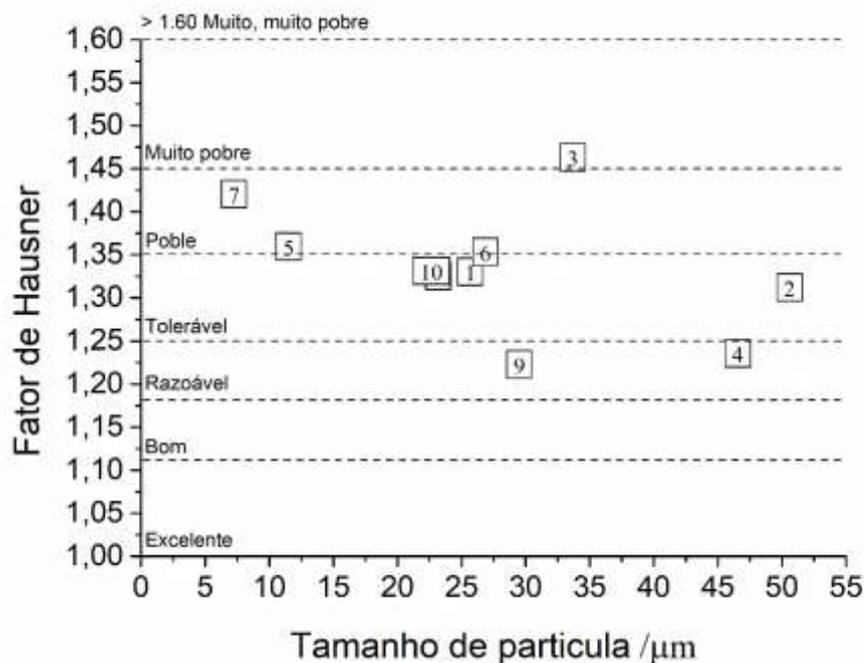
5.7.5 Avaliação das propriedades de fluxo dos pós

As densidades aparente (DA) e compactada (DC) variaram entre 0,19 e 0,46 e entre 0,27 e 0,57 $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$, respectivamente. A análise estatística não mostrou diferenças significativas com $p\text{-valor} = 0,2300$ e $0,1821$, respectivamente.

O Fator de Hausner (FH) e o índice de Carr (IC) são métodos indiretos úteis na predição das características de fluxo dos pós (AULTON, M. E.; TAYLOR, 2016). O FH variou entre 1,22 e 1,46 e o IC variou entre 18,19 e 31,57% (Tabela 16). A análise estatística dos valores de FH e IC obtidos não mostraram diferenças significativas com $p\text{-valor} = 0,9620$ ($R^2 = 0,6420$) e $p\text{-valor} = 0,9532$ ($R^2 = 0,6683$), respectivamente. Os valores de R^2 para FH e IC mostraram média correlação dos dados.

O FH correlaciona indiretamente o atrito entre as partículas ao fluxo dos pós. Os ES foram classificados em pós com tendência de fluxo razoável a muito fraco para o fator de Hausner (Figura 13) e índice de Carr (Tabela 1) (SINGH; KUMAR, 2012).

Figura 13 - Relação entre a fator de Hausner e o tamanho das partículas



Fonte: O autor (2020)

Os valores de AR variaram entre 15° e 25° (Tabela 16), exceto ES03, ES05 e ES07 que não apresentaram fluxo de pó, esse fenômeno pode ser explicado pela alta coesão entre as partículas provocada pelas forças de Van der Waals em pós secos

com D_v inferior a $< 20 \mu\text{m}$ (JALLO et al., 2012; MULLARNEY et al., 2011). Segundo Sollohub, Krzysztof; Cal (2010) a principal causa da baixa fluidez do pó é o tamanho reduzido das partículas. Os ES que apresentaram as melhores taxas de fluxo foram ES06, ES08 e ES01, que também apresentaram D_v semelhantes. De acordo com o AR dos ES, esses foram classificados em pós com excelente fluxo (Tabela 1), no entanto, os resultados obtidos para o AR não corroboram com os resultados para FH e IC .

A taxa de fluxo é um método direto de avaliar o fluxo dos pós. A velocidade que os pós escoam livremente nas tremonhas influenciam a uniformidade de peso e velocidade de produção, neste estudo, a taxa de escoamento variou entre 1,52 e 7,93 $\text{g}\cdot\text{s}^{-1}$, com destaques para ES06, ES08 e ES01.

Desta forma, a combinação de variáveis (tamanho de partícula, teor de umidade, densidade, morfologia das partículas, entre outros) influenciaram nas propriedades de fluxo dos pós.

5.7.6 Caracterização e estudo de estabilidade térmica dos extratos secos

As técnicas termoanalíticas são aplicadas à caracterização de drogas vegetais e seus derivados (CARTAXO-FURTADO et al., 2017; CORREIA et al., 2018; GUIMARÃES et al., 2018), bem como ao estudo de compatibilidade de ES com excipientes farmacêuticos (FERNANDES et al., 2018; SANTANA et al., 2018) e também foi útil para prever a estabilidade de ES de *Urtica dioica* L. utilizando o modelo cinético de Ozawa (CUINICA; MACÊDO, 2018).

Para a descrição dos eventos térmicos, optamos por detalhar os resultados obtidos para o ES10 (ponto central), a descrição pode ser extrapolada para os demais experimentos observando as temperaturas de início ($T_{início}$), as variações de massa (Δm) dos eventos e o valores percentuais do resíduo ao final da análise (Tabela 18).

Tabela 18 - Eventos de perda de massa observados para os extratos secos de graviola

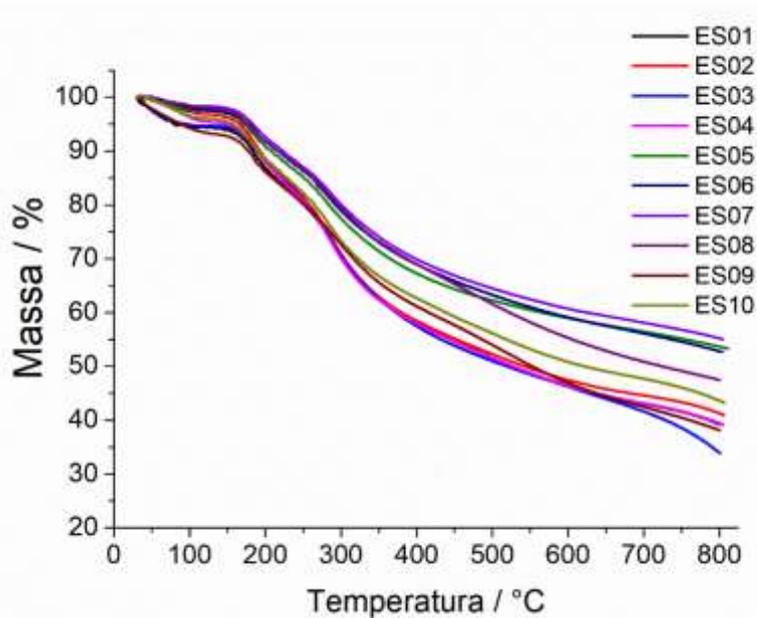
Amostras	1º Evento		2º Evento		3º Evento		4º Evento		Resíduo %
	$T_{início}$	Δm	$T_{início}$	Δm	$T_{início}$	$\Delta m\%$	$T_{início}$	Δm	
ES01	38,81	4,67	144,26	12,97	242,46	22,81	391,03	19,54	33,81
ES02	47,08	3,25	143,10	12,83	233,70	21,18	353,24	21,37	41,12
ES03	32,65	5,10	155,40	10,57	229,78	25,12	385,06	24,75	34,03
ES04	49,10	4,61	154,42	11,94	234,26	21,47	360,00	21,93	39,51
ES05	36,98	2,56	141,67	9,99	229,95	19,75	393,99	14,01	53,56
ES06	49,46	2,37	144,95	9,71	238,29	18,90	403,03	15,94	52,81
ES07	50,07	1,79	145,27	8,66	228,23	19,05	391,75	15,47	55,25
ES08	40,42	1,86	144,98	8,69	226,37	15,92	350,74	25,60	47,75
ES09	34,96	4,90	147,68	11,42	231,21	18,77	368,15	25,59	38,15
ES10	34,77	4,09	144,71	10,45	223,43	21,69	383,16	20,35	43,54

Legenda: $T_{início}$ em °C, Δm variação de massa em %. Fonte: O autor (2020)

O perfil térmico dos ES10 (Figura 14) mostrou quatro eventos de perda de massa, o 1º evento ocorreu entre 34,77 e 105,00 °C ($T_{início}$ e T_{final}), com Δm 4,09% relacionado à perda de água e constituintes voláteis, como etanol. O 2º evento ocorreu entre 144,71 °C e 223,43 °C (Δm 10,45%), o 3º evento térmico ocorreu entre 223,43 °C e 383,16 °C (Δm 21,69%), O 2º e 3º eventos podem estar associados à decomposição térmica de carboidratos e outros compostos orgânicos (DA COSTA et al., 2013), o 4º evento ocorreu entre 383,16 °C e 799,77 °C (Δm 20,35%) referente a ciclização de aromáticos e a formação de carboxilatos com resíduo de 43,54%, o resíduo pode ser atribuídos ao dióxido de silício coloidal, aos carboxilatos e aos minerais da amostra (LEITE et al., 2018).

Durante a degradação, as substâncias presentes no ES podem interagir umas com as outras em reações paralelas de degradação ou formação de novos compostos. No perfil térmico dos ES, é possível observar que, a partir do 2º evento até o final da análise, os eventos são contínuos, ou seja, a $T_{início}$ do evento subsequente é igual a T_{final} do evento anterior e que ocorreu mudança no perfil térmico no 4º evento de degradação.

Figura 14 - Curvas TG dos extratos secos das folhas de graviola em atmosfera de nitrogênio e β de $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$



Fonte: O autor (2020)

Outros estudos utilizaram o DS como adjuvante de secagem e obtiveram altos teores de resíduos. Leite et al. (2018) observaram resíduo de 48,9% para ES de *M. urundeuva* Allemão, Santana et al. (2018) relataram resíduo de 43,52% para o ES de *X. americana* L. e Baccarin et al. (2016) relataram resíduo de 60,78% para o ES de *R. ferruginea* Mez, os estudos citados utilizaram DS nas concentrações de 10, 20 e 30%, respectivamente, também foi observado aumento do teor de resíduo com o aumento das concentração de DS neste estudo.

A $T_{início}$ do 2º evento variou entre 141,67 e 155,40 °C e representa o início da degradação térmica dos constituintes químicos presentes nos ES. Os ES ficam poucos segundos expostos as altas temperaturas de entrada na câmara de secagem do SD e são direcionados para o coletor da amostra onde as temperaturas são mais brandas, as temperaturas de saída do secador ($T_{saída}$) variaram entre 69 a 130 °C e foram inferiores a $T_{início}$ do 2º evento para todas as amostras.

A energia de ativação foi calculada utilizando o 2º evento de perda de massa na curva TG. A E_a variou entre 61,49 e 143,01 $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ (Tabela 16). A análise estatística não mostrou diferença significativa com $p\text{-valor} = 0,1921$ ($R^2 = 0,8658$). A E_a é a energia mínima necessária para que ocorra uma reação (HUYNH-BA, 2008), sendo a E_a é diretamente proporcional à estabilidade (OLIVEIRA; YOSHIDA; GOMES, 2011). Os ES apresentaram mecanismo de degradação de ordem igual a

zero, significando que a velocidade de degradação é constante e não depende da concentração da amostra (LOFTSSON, 2014). A partir da avaliação da E_a pode-se observar uma tendência de aumento da estabilidade com a redução da temperatura de secagem, aumento do fluxo de alimentação e aumento da concentração do adjuvante de secagem, com destaques para os pós ES06, ES02 e ES08.

O DS é um excipiente comumente aplicado na secagem de extratos vegetais por SD (OLIVEIRA; PETROVICK, 2010), possui baixa toxicidade oral com eliminação nas fezes (YUN et al., 2015), com evidências de melhora nas propriedades reológicas dos pós, menor tendência de aderência aos secadores e maior proteção aos fitoconstituintes (GEORGETTI et al., 2008) essas características de menor aderência de pós no secador e proteção dos constituintes químicos também foram observados neste estudo.

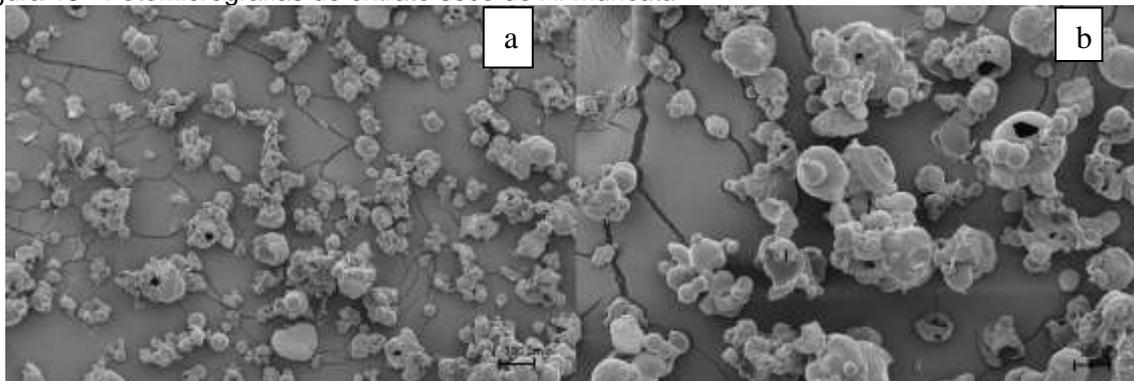
Os extratos secos obtidos neste estudo apresentam rendimento de processo satisfatórios para todas as amostras, baixo teor de umidade, boa estabilidade, mas o foram classificados com o fluxo de pó entre razoável a muito fraco, segundo o fator de Hausner e índice de Carr. O ES06 apresentou RP maior que 70%, boa estabilidade e taxa de fluxo de pós, sendo considerado o pó mais adequado a transposição de escala.

O fluxo de pó dos ES, classificados entre razoável a muito fraco não inviabiliza seu uso, porém exige a utilização de vibradores, forçadores de pó ou a mistura com excipientes farmacêuticos, no entanto, antes da mistura de IFAs com excipiente é recomendável a realização de estudos de compatibilidade, no intuito de prever possíveis interações químicas e/ou físicas entre os ingredientes.

5.7.7 Microscopia eletrônica de varredura do extrato seco de *A. muricata*

As fotomicrografias do ES (Figura 15) mostraram partículas com tamanhos irregulares, formas esféricas e ocas. Esferas ocas tendem a melhorar a solubilidade do produto devido ao aumento na área superficial (DE SOUZA et al., 2018). Essas características são geralmente encontradas em extratos secos de plantas obtidas por aspersão (CUINICA; MACÊDO, 2018; OLIVEIRA; PETROVICK, 2010).

Figura 15 - Fotomicrografias do extrato seco de *A. muricata*



Legenda: fotomicrografias do ES utilizando 10% de DS, fluxo de alimentação 8 mL.min⁻¹ e temperatura de secagem de 160 °C. a - aumento 500x; b – aumento de 1000x. Fonte: O autor (2020)

5.8 ESTUDO DE COMPATIBILIDADE DO EXTRATO SECO DA GRAVIOLA E EXCIPIENTES FARMACÊUTICOS

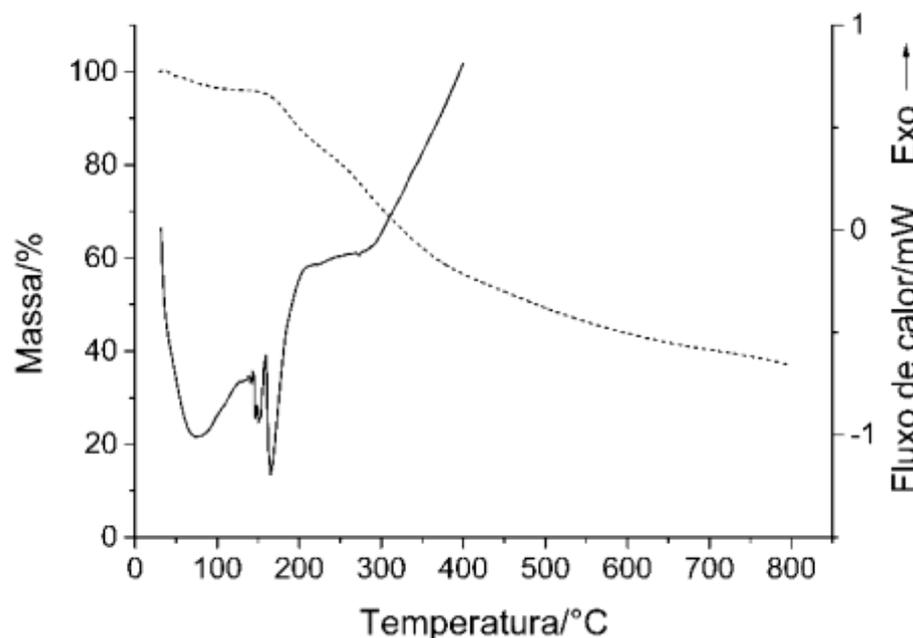
As técnicas de DSC e TG são métodos confiáveis para analisar a compatibilidade de misturas de IFAs e excipientes. Em particular, o DSC apresenta vantagens significativas e é considerado uma ferramenta de triagem rápida para interações fármaco-excipiente durante os estudos de pré-formulação, pois alterações no perfil térmico indicam a possibilidade de interações induzidas pelo calor (TIȚA et al., 2011).

O perfil térmico do ES na curva TG mostrou quatro eventos de perda de massa (Δm) (Figura 16), o 1º evento ocorreu com $T_{início}$ de 37 °C e T_{final} de 105 °C, com Δm de 4,09%, relacionado à perda de água e constituintes voláteis, como etanol, o 2º evento ocorreu entre 145,14 e 237,95 °C (Δm de 14,08%), o 3º evento térmico ocorreu entre 237,95 e 388,42 °C (Δm de 24,70%), o 2º e 3º eventos podem estar associado a decomposição térmica de carboidratos e outros compostos orgânicos (LEITE et al., 2018) e o 4º evento ocorreu entre 389,19 e 797,83 °C (Δm de 20,61%), seguido de perda de massa lenta e progressiva resultando em resíduo mineral de 37,39%.

A curva DSC apresentou três processos endotérmicos, o 1º processo com T_{pico} de 75,74 °C ($T_{início}$ de 38,29 e T_{final} de 124,00 °C) e variação de entalpia (ΔH) de -82,12 J.g⁻¹, o 2º processo ocorreu com T_{pico} de 150,03 °C ($T_{início}$ de 142,96 e T_{final} de 156,57 °C) e ΔH de -6,54 J.g⁻¹ podendo está relacionado a substâncias que interagem uma com as outras dentro da matriz da planta (DA COSTA et al., 2013), o 3º processo

endotérmico com T_{pico} de 165,22 °C ($T_{início}$ de 160,25 e T_{final} de 223,87 °C) e ΔH de -30,76 J.g⁻¹ referente a degradação do ES e o 4º evento, exotérmico, com $T_{início}$ de 294,22 °C, no entanto, sua entalpia não foi determinado devido ao final do processo ultrapassar a temperatura de análise na DSC.

Figura 16 - Curvas TG e DSC do ES de *A. muricata*, em atmosfera de nitrogênio e β 10 °C.min⁻¹

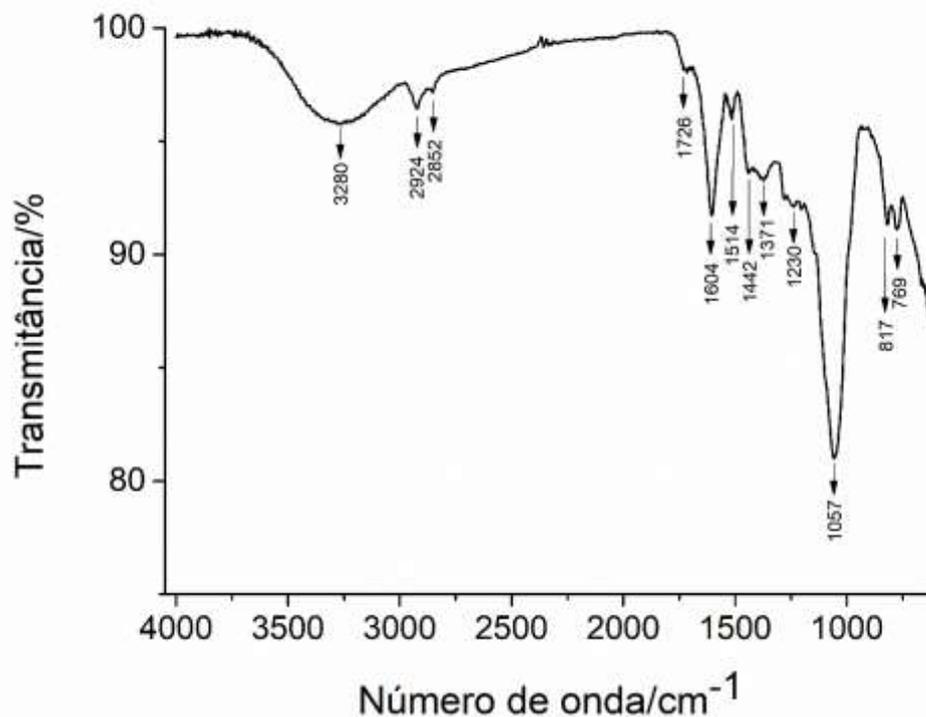


Fonte: O autor (2020)

O espectro infravermelho da ES (Figura 17) mostrou forte absorção na região de 3280 cm⁻¹, característica do alongamento axial de O-H que pode estar relacionado a hidroxilas de diferentes metabólitos secundários e umidade residual da amostra. As bandas de absorção na região de 2924 cm⁻¹ são típicas da vibração de alongamento C-H. As bandas de absorção na região de 1726 cm⁻¹ são características do estiramento de carbonila (C=O), e a intensidade baixa desta banda pode estar relacionado a microencapsulação dos metabólitos secundários pelo ADS. A banda de absorção em 1604 cm⁻¹ é indicativa da ligação dupla C=C de aromáticos, e as bandas dobráveis nas regiões 1442 e 1371 cm⁻¹ são indicativas de alcanos.

Uma banda com forte intensidade em 1050 cm⁻¹ é característica da absorção de Si-O e C-O. A ligação Si-O está presente na estrutura química do DS e os grupos CO são componentes de grupos funcionais, como álcoois e fenóis.

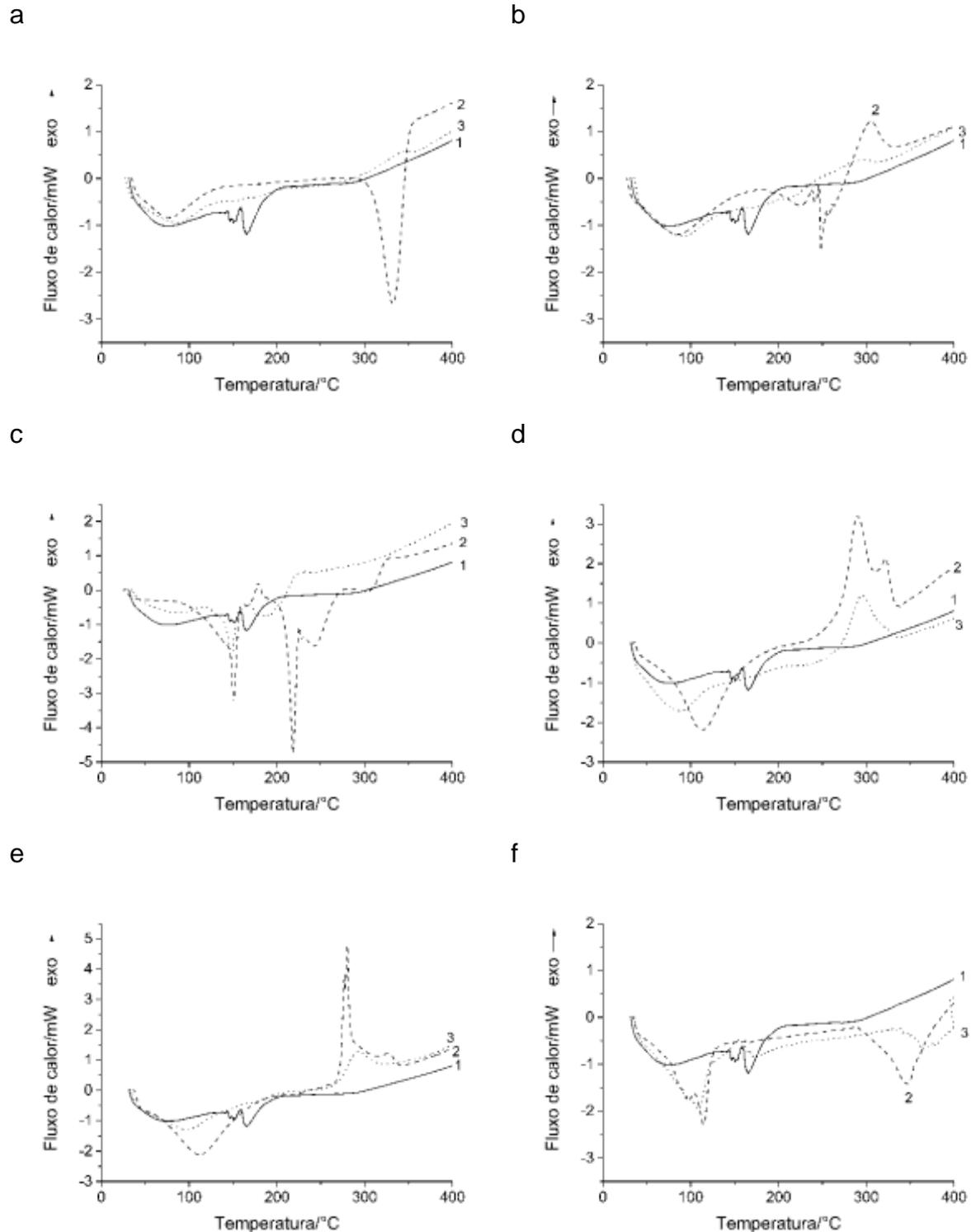
Figura 17 - Espectro de absorção no infravermelho do extrato seco de *A. muricata*



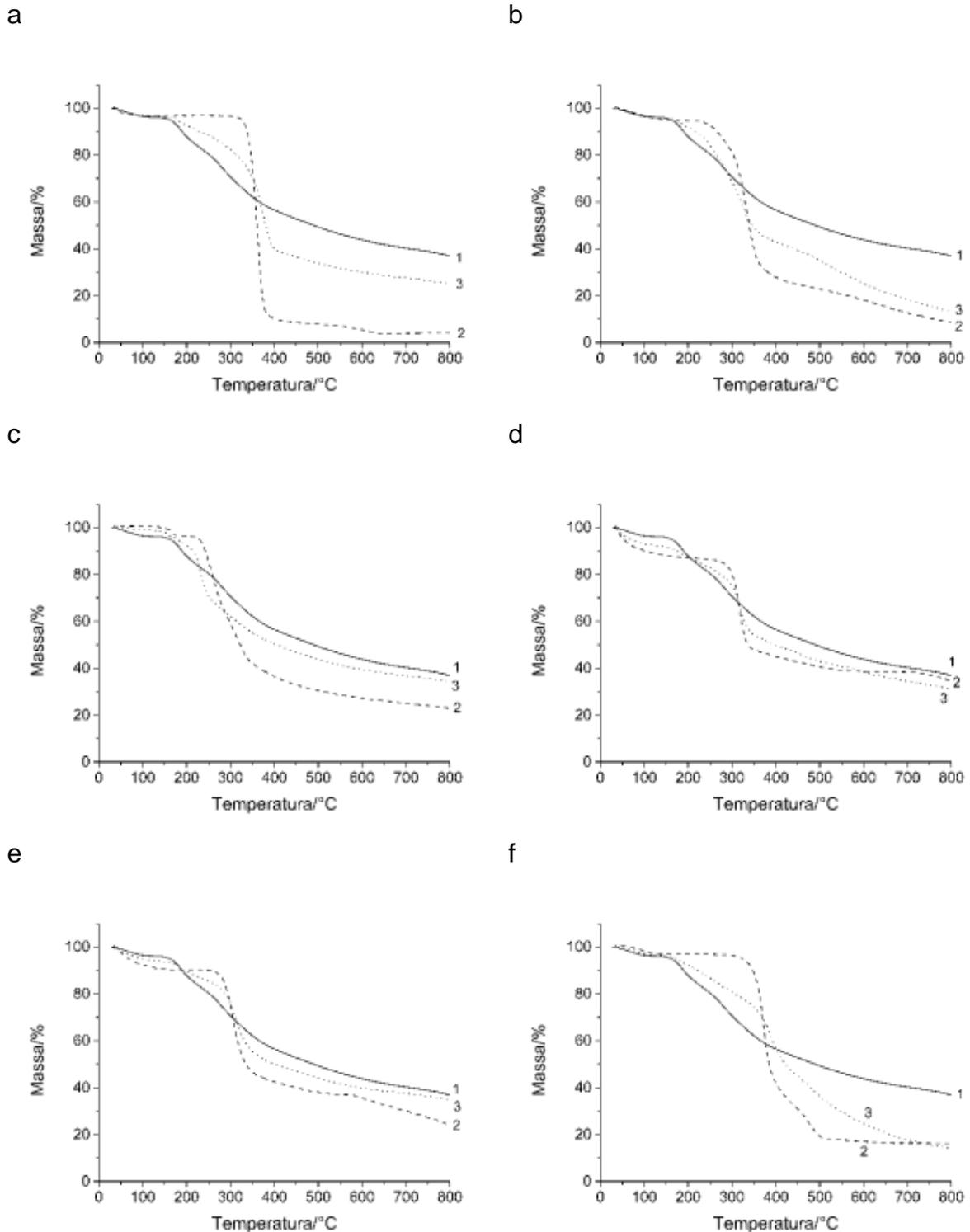
Fonte: O autor (2020)

É mostrado, nas Figuras 18 e 19 as curvas DSC e TG das substâncias e suas misturas, respectivamente.

É mostrado, na curva DSC do excipiente celulose dois processos endotérmicos (Figura 18a), o 1º processo com T_{pico} de 77,99 °C (ΔH de -89,29 J.g⁻¹) referente a perda de umidade, confirmado pela curva TG com Δm de 3,03% (Tabela 19), o 2º processo apresentou T_{pico} de 331,71 °C (ΔH de -272,12 J.g⁻¹) e está relacionado a decomposição térmica, confirmada pela curva TG com Δm de 86,94% (Figura 19a) (FERNANDES et al., 2016). A curva DSC da mistura ES-Cel (Figura 18a) mostrou 3 processos endotérmicos, o 1º processo relacionado a perda de água e componentes voláteis da mistura com T_{pico} de 86,63 °C (ΔH de -85,27 J.g⁻¹) e Δm de 3,51% na curva TG, o 2º processo ocorreu com T_{pico} de 156,07 °C (ΔH de -1,20 J.g⁻¹) e o 3º processo ocorreu com T_{pico} de 173,65 °C (ΔH de -1,64 J.g⁻¹), e um processo exotérmico com T_{pico} de 346,35 °C (ΔH de 10,05 J.g⁻¹). A MF apresentou redução de entalpia do processo referente a degradação do excipiente de -272,12 para 10,05 J.g⁻¹ para Cel e ES-Cel, respectivamente.

Figura 18 - Curvas DSC das misturas físicas de *A. muricata* e excipientes

Legenda: a - 1 (ES), 2 (Cel), 3 (ES-Cel); b - 1 (ES), 2 (Malt), 3 (ES-Malt); c - 1 (ES), 2 (Lac), 3 (ES-Lac); d - 1 (ES), 2 (Crosc), 3 (ES-Crosc); e - 1 (ES), 2 (AGlic), 3 (ES-AGlic); f - 1 (ES), 2 (EstMg), 3 (ES-EstMg). Fonte: O autor (2020)

Figura 19 - Curvas TG das misturas físicas de *A. muricata* e excipientes

Legenda: a - 1 (ES), 2 (Cel), 3 (ES-Cel); b - 1 (ES), 2 (Malt), 3 (ES-Malt); c - 1 (ES), 2 (Lac), 3 (ES-Lac); d - 1 (ES), 2 (Crosc), 3 (ES-Crosc); e - 1 (ES), 2 (AGlic), 3 (ES-AGlic); f - 1 (ES), 2 (EstMg), 3 (ES-EstMg). Fonte: O autor (2020)

A curva DSC da Malt (Figura 18b) apresentou três processos endotérmicos, o 1º processo com T_{pico} de 89,95 °C (ΔH de -156,04 J.g⁻¹) relacionado a perda de umidade, confirmado na curva TG (Δm de 5,09%), o 2º e 3º processos endotérmico

com T_{pico} de 224,70 e 249,43 °C e ΔH de -22,74 e -40,22 J.g⁻¹, respectivamente, o 4º processo, exotérmico, ocorreu com T_{pico} de 305,19 °C (ΔH de 55,67 J.g⁻¹). A curva TG da Malt (Figura 19b) apresentou 3 eventos de perda de massa, o 1º evento relacionado a perda de umidade, o 2º e 3º eventos relacionados a degradação térmica do excipiente com $T_{início}$ de 261,79 e T_{final} de 295,84 °C (Δm de 12,20%) e $T_{início}$ de 315,46 e T_{final} de 355,68 °C (Δm de 55,08%), respectivamente, seguida de perda de massa lenta e progressiva resultando em resíduo mineral de 8,79% (SAMPALHO et al., 2016).

A curva DSC da ES-Malt (Figura 18b) mostrou três processos endotérmicos, o 1º processo com T_{pico} de 90,90 °C (ΔH de -77,46 J.g⁻¹) relacionado a perda de água e componentes voláteis, o 2º e 3º processos com T_{pico} de 200,10 °C e 235,08 °C e com ΔH de -2,57 e -5,34 J.g⁻¹, respectivamente, o 4º processo, exotérmico, na curva DSC com T_{pico} de 298,60 °C (ΔH de 7,89 J.g⁻¹) mostrando redução na entalpia de degradação referente ao 4º processo na mistura em relação ao ES e excipiente puro. Na curva TG (Figura 19b) a MF apresentou perfil semelhante a sobreposição do ES e Malt.

A curva DSC da Lac (Figura 18c) mostrou um processo endotérmico com T_{pico} de 150,75 °C (ΔH de -29,58 J.g⁻¹) e Δm de 3,61% na curva TG, relacionado a perda de água de cristalização, seguido de um processo exotérmico com T_{pico} de 178,75 °C (ΔH de 14,11 J.g⁻¹), correspondendo a transição cristalina da α - em β -lactose anidra, o 3º processo (endotérmico) com T_{pico} de 218,25 °C (ΔH de -91,43 J.g⁻¹) referente a fusão da β -lactose, o 4º e 5º processos endotérmicos correspondem a degradação da Lac com T_{pico} de 240,42 °C (ΔH de -29,27 J.g⁻¹) e T_{pico} de 302,06 °C (ΔH de -32,51 J.g⁻¹) e Δm de 24,10 e 34,68%, respectivamente, na curva TG (Figura 19c) (LAVOR et al., 2014; PEREIRA et al., 2014).

A curva DSC do ES-Lac (Figura 18c) mostrou 3 processos endotérmicos, o 1º processo com T_{pico} de 88,21 °C (ΔH de -44,38 J.g⁻¹) e Δm de 1,54% na curva TG, relacionado a perda de água e componentes voláteis do ES, o 2º e 3º processos com T_{pico} de 148,06 e 188,31 °C e ΔH de -28,67 e -67,77 J.g⁻¹, respectivamente, o 2º processo refere-se a perda de água de cristalização com Δm de 2,03% na curva TG, no 3º processo ocorreu alargamento do processo térmico com sobreposição dos processos de transição da α - em β -lactose, fusão da β -lactose e início da degradação da Lac e do ES.

A curva DSC da Crosc mostrou 3 processos térmicos (Figura 18d), o 1º processo endotérmico com T_{pico} de 113,13 °C ($T_{início}$ de 60,19 e T_{final} de 150,65 °C) e ΔH de -343,13 J.g⁻¹, na curva TG ocorreu Δm de 9,79%, relacionado a perda de umidade, o 2º e 3º processos (exotérmicos) com T_{pico} de 290,07 e 321,98 °C, respectivamente, apresentaram sobreposição de picos, o somatório das entalpias do 2º e 3º processos foi de 278,13 J.g⁻¹. Na curva TG (Figura 19d) os eventos relacionados a degradação da Crosc apresentaram $T_{início}$ de 301,60 e T_{final} de 329,61 °C (Δm de 38,37%) e $T_{início}$ de 353,67 e T_{final} de 479,86 °C (Δm de 8,02%), respectivamente (PEREIRA et al., 2014).

A curva DSC da ES-Crosc (Figura 18d) mostrou 3 processos endotérmicos, o 1º processo com T_{pico} de 87,67 °C (ΔH de -151,57 J.g⁻¹) e Δm de 7,09% na curva TG, relacionado a perda de umidade e componentes voláteis da mistura, o 2º e 3º processos endotérmicos com T_{pico} de 164,90 e 188,79 °C e ΔH de -1,75 e -1,30 J.g⁻¹, respectivamente, o 4º processo (exotérmico), na curva DSC com T_{pico} de 296,20 °C (ΔH de 131,21 J.g⁻¹), na curva TG a mistura apresentou perfil semelhante a sobreposição do ES e Crosc (Figura 19d).

A curva DSC do AGlic mostrou 3 processos térmicos (Figura 18e), o 1º processo endotérmico com T_{pico} de 112,18 °C (entre 66,47 e 157,82 °C), ΔH de -311,36 J.g⁻¹ e Δm de 8,77% na curva TG, relacionado a perda de umidade, o 2º e 3º processos (exotérmicos) com T_{pico} de 280,12 e 326,41 °C e ΔH de 113,89 e 8,88 J.g⁻¹, respectivamente. Na curva TG (Figura 19e) os eventos relacionados a degradação do AGlic apresentaram $T_{início}$ de 286,74 °C e T_{final} de 329,10 °C (Δm de 45,18%) e $T_{início}$ de 371,81 °C e T_{final} de 403,34 °C (Δm de 7,28%), respectivamente, seguido de um evento de perda de massa progressivo a partir de 575,90 °C.

Os principais processos térmicos na DSC da ES-AGlic mostraram um processo endotérmico com T_{pico} de 96,73 °C (ΔH de -105,65 J.g⁻¹) e Δm de 5,98% na curva TG referente a perda de umidade da mistura, e um processo exotérmico com T_{pico} de 293,20 (ΔH de 60,74 J.g⁻¹). O principal evento de perda de massa na TG com $T_{início}$ de 289,90 °C e T_{final} de 335,11 °C (Δm de 34,93%). As curvas DSC dos desintegrantes apresentaram entalpias para os processos de degradação da Crosc e do AGlic de 278,13 e 113,89 J.g⁻¹ e para suas misturas ES-Crosc e ES-AGlic de 131,21 e 60,74 J.g⁻¹, respectivamente. As reduções nas entalpias dos picos de degradação relacionados foram proporcionais a diminuição da quantidade do excipiente nas misturas de ambos os desintegrantes.

Tabela 19 - Estudo de compatibilidade do extrato seco de *A. muricata* e excipientes usando DSC e TG em atmosfera de nitrogênio e β 10 °C.min⁻¹

Amostras	1º Evento			2º Evento			3º Evento			4º Evento		
	DSC		TG	DSC		TG	DSC		TG	DSC		TG
	T_{pico} °C	ΔH J.g ⁻¹	Δm %	T_{pico} °C	ΔH J.g ⁻¹	Δm %	T_{pico} °C	ΔH J.g ⁻¹	Δm %	T_{pico} °C	ΔH J.g ⁻¹	Δm %
ES	75,74	-82,12	4,09	150,03	-6,54	14,08	165,22	-30,76	24,70	-	-	20,61
CEL	77,99	-89,29	3,03	-	-	-	-	-	-	331,71	-272,12	86,94
ES-CEL	86,63	-85,27	3,51	156,07	-1,20	6,92	173,65	-1,64	9,44	346,35	10,05	40,28
MALT	89,95	-156,04	5,09	224,70	-22,74	12,20	249,43	-40,22	12,20	305,19	55,67	55,08
ES-MALT	90,90	-77,46	3,97	200,10	-2,57	4,57	235,08	-5,34	14,08	298,60	7,89	32,40
LAC	150,75	-29,58	3,61	178,75	14,11	-	218,25	-91,43	-	240,42; 302,06	-29,27; -32,51	24,10; 34,68
ES-LAC	88,21	-44,38	1,54	148,06	-28,67	2,03	188,31	-67,77	4,16	-	-	25,5; 15,75
CROSC	113,13	-343,13	9,79	290,07	278,13	38,37	321,98	-	8,02	-	-	-
ES-CROSC	87,67	-151,57	7,09	164,90	-1,75	7,40	188,79	-1,30	-	296,20	131,21	32,39
AGlic	112,18	-311,36	8,77	280,12	113,89	45,18	326,41	8,88	7,28	-	-	-
ES-AGlic	96,73	-105,65	5,98	293,20	60,74	34,93	-	-	-	-	-	-
EstMg	90,63	-	3,12	97,42	-	-	114,68	-	-	342,07	-163,44	59,78
ES-EstMg	74,26	-	3,60	96,25	-	-	108,91	-	-	363,71	-36,69	32,96

Fonte: O autor (2020)

A curva DSC do EstMg apresentou quatro processos endotérmicos. Os três processos com valores de T_{pico} de 90,63; 97,42 e 114,68 °C referem-se à perda de umidade, perda de água ligada e fusão, respectivamente. Devido à sobreposição dos processos, não foi possível calcular a entalpia individual dos eventos (SANTANA et al., 2018). O quarto processo mostrou um T_{pico} de 342,07 °C (ΔH de - 163,44 J.g⁻¹). A principal etapa de degradação na curva de TG (Figura 19f) ocorreu com um $T_{início}$ de 354,41 °C e T_{final} de 385,82 °C (Δm de 59,78%).

A curva DSC do ES-EstMg (Figura 18f) mostrou quatro processos endotérmicos. Os três processos com valores de T_{pico} de 74,26, 96,25 e 108,91 °C relacionados à perda de umidade, perda de água ligada e derretimento do excipiente, respectivamente. Os processos mostraram antecipação do T_{pico} para a MF em comparação com o excipiente isoladamente. O quarto processo teve um T_{pico} de 363,71 °C (ΔH de -36,69 J.g⁻¹). Na curva TG, o evento principal ocorreu com um $T_{início}$ de 362,20 °C e T_{final} de 411,35 °C (Δm de 32,96%). A curva DSC da ES-EstMg apresentou deslocamentos de pico e uma redução na entalpia de degradação. Na curva TG, o resíduo da mistura física foi menor que o observado para o excipiente puro (Figura 19f).

A espectroscopia de infravermelho é uma técnica simples, não destrutiva e rápida para aquisição de dados. Em estudos de compatibilidade, o desaparecimento de um pico ou redução na intensidade do pico, bem como o aparecimento de novos picos, pode ser indicativo de interações entre o excipiente e os medicamentos investigados (LILTORG et al., 2011).

Os espectros de infravermelho (IV) do ES isolado e dos excipientes são apresentados na Figura 20. O espectro do IFA e excipientes e suas MF tiveram uma quebra na região de 2700–1900 cm⁻¹, porque a região de absorbância no IV não apresentou eventos relevantes para o estudo de compatibilidade. É mostrado, na Figura 17 o espectro de IV do ES sem a quebra mencionada. O espectro do ES-Cel (Figura 20a) não mostrou alterações no perfil do ES; observou-se um somatório das bandas de absorção do ES e do excipiente. Isso sugere que nenhuma interação ocorre entre os grupos funcionais desses componentes. Perfis semelhantes foram observados para o ES-Lac e ES-Cros (Figuras 20c e 20d). Na banda de absorção do ES-AGlic observou-se deslocamento de 1005 cm⁻¹ (AGlic) para 1020 cm⁻¹

¹ (Figura 20e). Também houve um aumento na intensidade de absorção da ES-Malt na região de 1100-1000 cm^{-1} (Figura 20b).

O espectro de ES-EstMg mostrou o desaparecimento da banda de absorção em 1604 cm^{-1} , e o deslocamento dos picos de 1568 para 1571 cm^{-1} e de 1539 para 1543 cm^{-1} . Essas mudanças indicam a formação de um sal de magnésio (AIGNER et al., 2011).

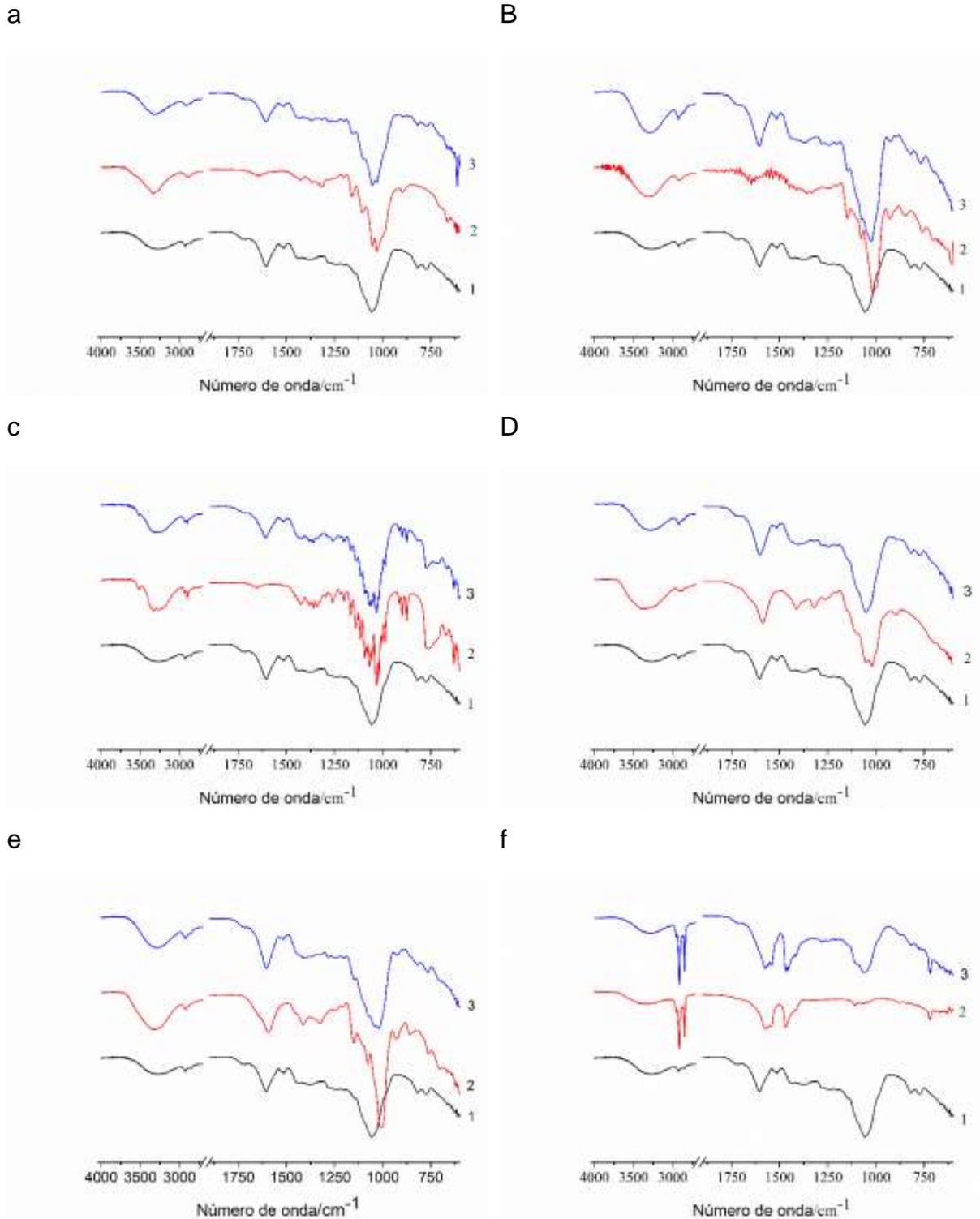
Estudos de compatibilidade entre quitosana e Cel, Lac e Crosc (PEREIRA et al., 2014) revelaram alterações nos perfis térmicos, mas a espectroscopia de infravermelho não mostrou evidências de interações nas misturas. Resultados semelhantes foram observados no presente estudo, onde sinais de incompatibilidade na análise térmica foram observados com os excipientes Cel e Lac, mas nenhuma evidência de incompatibilidade foi detectada nos espectros de IV das misturas físicas.

No espectro de ES-Malt, foi observado um aumento na intensidade da banda de absorção na região de 1100-1000 cm^{-1} e confirma o que é suportado pelos resultados do DSC do presente estudo. Leite et al. (2018) relataram a incompatibilidade do MF do extrato seco de *M. urundeuva* Allemão e o excipiente maltodextrina.

Relatos na literatura mostraram que o EstMg (lubrificante farmacêutico) apresentou incompatibilidade com várias IFAs (PEREIRA et al., 2014; TITA et al., 2011; SANTANA et al., 2018; AIGNER et al., 2011). Aigner et al. (2011) relataram alterações no perfil térmico e desaparecimento da banda de absorção nos espectros de IV da mistura física de aceclofenaco com EstMg. Para o ES-EstMg, A MF altera o perfil térmico, juntamente com o desaparecimento e deslocamento das bandas de absorção no espectro IV.

Assim, observou-se que os excipientes celulose microcristalina, lactose, croscarmelose sódica e amido glicolato de sódio foram os mais adequados para o desenvolvimento de um novo medicamento fitoterápico, utilizando o extrato seco das folhas de *A. muricata* L.

Figura 20 - Espectros de IV das misturas físicas de *A. muricata* e excipientes



Legenda: a - 1 (ES), 2 (Cel), 3 (ES-Cel); b - 1 (ES), 2 (Malt), 3 (ES-Malt); c - 1 (ES), 2 (Lac), 3 (ES-Lac); d - 1 (ES), 2 (Crosc), 3 (ES-Crosc); e - 1 (ES), 2 (AGlic), 3 (ES-AGlic); f - 1 (ES), 2 (EstMg), 3 (ES-EstMg). Fonte: O autor (2020)

6 CONCLUSÃO

A caracterização físico-química da matéria-prima vegetal e dos extratos foi realizada através da determinação de água, granulometria, cinzas totais, materiais estranhos, pH aparente, densidade relativa, os resultados obtidos estão de acordo com a Farmacopeia Brasileira, a triagem fitoquímica confirmou a presença de flavonoides, taninos e acetogeninas.

A caracterização térmica da droga vegetal mostrou que os resíduos ao final da análise TG em atmosfera de ar sintético corroboraram com os valores obtidos na determinação de cinzas totais e foi observada uma degradação incompleta na atmosfera inerte. A cinética de degradação térmica foi determinada e todas as amostras apresentaram ordem de degradação igual a zero.

O flavonoide rutina foi escolhido como substância química de referência e um método para quantificação foi validado por espectroscopia UV-vis segundo resolução vigente. O método apresentou precisão, exatidão, robustez adequados, a matriz vegetal não influenciou na quantificação da rutina e a sua faixa de trabalho foi determinada entre 5 e 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de acordo com a linearidade.

O modelo de superfície resposta e o diagrama de Pareto foi aplicado na padronização do extrato hidroalcoólico utilizando um método de extração clássico e solventes atóxicos. Os dados estatísticos mostraram que existe diferença estatística com a variação da proporção da droga/solvente, mas não existe diferença significativa na proporção do solvente extrator para 50 e 70% de etanol, mantendo a mesma proporção da droga/solvente. A maceração a frio nas proporções de droga/solvente de 15% e solvente extrator escolhidos de 50 a 70% foram consideradas mais adequadas para a extração do marcador químico neste estudo.

Os extratos secos obtidos por *spray dryer* utilizando dióxido de silício coloidal 200 como adjuvante de secagem apresentam alto rendimento de processo 50,54 e 71,60% e teor de umidade inferior a 5%, com destaques para os ES com 30% de DS. A estabilidade térmica dos pós foi avaliada utilizando a energia de ativação e os pós obtidos com condições mais brandas de secagem (temperatura de secagem de 130 °C e 9 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$) apresentaram maior estabilidade. As propriedades reológicas dos pós mostraram pós coesos e com baixa densidade e a microscopia eletrônica de varredura mostrou partículas esféricas e ocas com tamanhos de partícula que

variaram entre 7,26 e 50,60 μm , apresentando fluxo de pó entre razoável a muito fraco, esses resultados não inviabilizam o uso dos ES, mas exigem a utilização de vibradores, forçadores de pó ou a mistura com excipientes farmacêuticos para a produção de medicamentos fitoterápicos em escala industrial.

O ES06 foi o pó que apresentou as melhores características como alto rendimento, baixa umidade, melhor taxa de fluxo e maior estabilidade.

Estudos de compatibilidade térmica do ES com excipientes farmacêuticos foram realizadas utilizando TG, DSC e IV. As misturas físicas apresentaram mudanças no seu perfil térmico com redução da entalpia, antecipação e sobreposição de picos para a celulose e lactose, no entanto, não ocorreram mudanças significativas nos espectros de absorvância no IV, o uso desses excipientes deve ser feito com cautela. As técnicas térmicas e a IV foram úteis na elucidação de possíveis interações entre o ES e os insumos, onde a celulose microcristalina, lactose, croscarmelose sódica e amido glicolato de sódio foram os insumos mais adequados para o desenvolvimento de um novo medicamento fitoterápico, utilizando o extrato seco das folhas de *A. muricata*.

A caracterização analítica da droga vegetal e obtenção dos extratos secos podem ser utilizadas no desenvolvimento de novos medicamentos fitoterápicos, sendo os resultados obtidos neste trabalho úteis na transposição de escala e controle de qualidade de produtos originários das folhas de *A. muricata* L.

REFERÊNCIAS

ADEFEGHA, S. A.; OYELEYE, S. I.; OBOH, G. Distribution of Phenolic Contents, Antidiabetic Potentials, Antihypertensive Properties, and Antioxidative Effects of Soursop (*Annona muricata* L.) Fruit Parts in Vitro. **Biochemistry Research International**, v. 2015, 2015.

AIGNER, Z. et al. Compatibility studies of aceclofenac with retard tablet excipients by means of thermal and FT-IR spectroscopic methods. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 104, n. 1, p. 265–271, 2011.

AL-KHATTAWI, A. et al. The design and scale-up of spray dried particle delivery systems. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 15, n. 1, p. 47–63, 2018.

ALALI, F. Q.; LIU, X. X.; MCLAUGHLIN, J. L. Annonaceous acetogenins: Recent progress. **Journal of Natural Products**, v. 62, n. 3, p. 504–540, 1999.

ALONSO-CASTRO, A. J. et al. Mexican medicinal plants used for cancer treatment: Pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, n. 3, p. 945–972, 2011.

ALVES, R. et al. Thermal behavior and decomposition kinetics of rifampicin polymorphs under isothermal and non-isothermal conditions. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, n. 2, p. 343–351, 2010.

ANDRADE, J. C. et al. Thermal characterization of *Aspidosperma pyriforme* Mart. plant drugs. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 3, p. 3747–3756, 2019.

ARAGÃO, C. F. S.; FILHO, J. M. B.; MACÊDO, R. O. Thermal characterization of warifteine by means of TG and a DSC photovisual system. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 64, n. 1, p. 185–191, 2001.

ARTHUR, F. K. N.; WOODE, E.; TERLABI, E. O.; LARBIE, C. Evaluation of acute and subchronic toxicity of *Annona Muricata* (Linn .) aqueous extract in animals. **European Journal of Experimental Biologi**, v. 1, n. 4, p. 115–124, 2011.

ARTHUR, F. K. N. et al. Evaluation of hepatoprotective effect of aqueous extract of *Annona muricata* (Linn.) leaf against carbon tetrachloride and acetaminophen-induced liver damage. **International Journal of Shoulder Surgery**, v. 6, n. 2, p. 25–30, 2012.

ASASE, A.; HESSE, D. N.; SIMMONDS, M. S. J. Uses of multiple plants prescriptions for treatment of malaria by some communities in southern Ghana. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 144, n. 2, p. 448–452, 2012.

AULTON, M. E.; TAYLOR, K. M. G. **Aulton delineamento de formas farmacêuticas**. 4 Ed. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

BACCARIN, T. et al. Influence of process conditions on physicochemical properties

and antinociceptive activity in vivo of spray-dried *Rapanea ferruginea* Mez. stem bark extract. **Powder Technology**, v. 291, p. 66–74, 2016.

BARBOSA, E. R.; SALLEM, F. A. S. Doença de Parkinson - Diagnóstico. **Revista Neurociências**, v. 13, n. 3, p. 158–165, 2005.

BATISTA, R. S. DE A. et al. Evaluation of crystallization technique relating to the physicochemical properties of cinnamic acid. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 7, 2019.

BLESSY, M. et al. Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs - A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 4, n. 3, p. 159–165, 2014.

BOYOM, F. F. et al. Potent antiplasmodial extracts from Cameroonian Annonaceae. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 134, n. 3, p. 717–724, 2011.

BRANDÃO, D. O. et al. Model Analytical Development for Physical, Chemical, and Biological Characterization of *Momordica charantia* Vegetable Drug. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v. 2016, 2016.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira Quarta Edição Parte I**. 4ª edição ed. Brasília: 1988.

BRASIL. Resolução de Diretoria Colegiada Nº 26 de 13 de maio de 2014, Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. **Diário Oficial da União, Poder Executivo, DF, Brasília**, p. 1–34, 2014.

BRASIL. RDC Nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, v. 2017, p. 22, 2017.

BRASIL. **RESOLUÇÃO - RDC Nº 318, DE 6 DE NOVEMBRO DE 2019** Diário Oficial da União, Poder Executivo, DF, Brasília, 2019a.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**. 6ª edição ed. Brasília, v. 1, 2019.

BYEON, J. C. et al. Recent formulation approaches to oral delivery of herbal medicines. **Journal of Pharmaceutical Investigation**, v. 49, n. 1, p. 17–26, 2019.

CAPARROS-LEFEBVRE, D. et al. Guadeloupean parkinsonism: A cluster of progressive supranuclear palsy-like tauopathy. **Brain**, v. 125, n. 4, p. 801–811, 2002.

CAPARROS-LEFEBVRE, D.; ELBAZ, A. Possible relation of atypical parkinsonism in the French West Indies with consumption of tropical plants: A case-control study. **Lancet**, v. 354, n. 9175, p. 281–286, 1999.

CARDOSO, I. C. et al. Influência da técnica de extração e do tamanho de partícula do material vegetal no teor de compostos fenólicos totais da tintura das folhas de *Alpinia zerumbet*. **Revista Fitos**, v. 11, p. 62–68, 2017.

CARTAXO-FURTADO, N. A. DE O. et al. Physicochemical characterization of a new

raw material obtained from leaves of *Syzygium cumini* (L.) Skeel (Myrtaceae). **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 127, n. 2, p. 1137–1141, 2017.

CARTAXO-FURTADO, N. A. DE O. et al. Investigation of thermal and kinetic behavior of the *Stryphnodendron adstringens* dry extract with antimicrobial activity. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 5, 2019.

CARVALHO, J. L. S. . et al. PHYTOCHEMICAL SCREENING OF *Nasturtium officinale* R. Br.: QUALITY CONTROL. **Visão Acadêmica**, v. 7, n. 2, p. 1–14, 2006.

CASTRO-LÓPEZ, C. et al. Impact of extraction techniques on antioxidant capacities and phytochemical composition of polyphenol-rich extracts. **Food Chemistry**, v. 237, p. 1139–1148, 2017.

CASTRO JR, M. A. DE; MAGSINO, R. F.; CUARTO, P. M. Development of Spray-Dried Guyabano (*Annona muricata* Linn .) Extract in Three Process Schedules. **American Journal of Food Science and Technology**, v. 6, n. 2, p. 87–91, 2018.

CERCATO, L. M. et al. A systematic review of medicinal plants used for weight loss in Brazil: Is there potential for obesity treatment? **Journal of Ethnopharmacology**, v. 176, p. 286–296, 2015.

CHABARIBERI, R. D. A. O. et al. Determinação espectrométrica dos flavonóides das folhas de *Maytenus* (Celastraceae) e de *Passiflora* (Passifloraceae) e comparação com método CLAE-UV. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 4, p. 860–864, 2009.

CHAMPY, P. et al. Annonacin, a lipophilic inhibitor of mitochondrial complex I, induces nigral and striatal neurodegeneration in rats: possible relevance for atypical parkinsonism in Guadeloupe. **Journal of Neurochemistry**, v. 88, n. 1, p. 63–69, 2003.

CHAMPY, P. et al. Quantification of acetogenins in *Annona muricata* linked to atypical Parkinsonism in Guadeloupe. **Movement Disorders**, v. 20, n. 12, p. 1629–1633, 2005.

CHANG, L. S. et al. Storage stability, color kinetics and morphology of spray-dried soursop (*Annona muricata* L.) powder: Effect of anticaking agents. **International Journal of Food Properties**, v. 21, n. 1, p. 1937–1954, 2018.

CHUN, S. C. et al. Enhanced Harnessing of the *Graviola* bioactive components using a neoteric sonication cum microwave coadjuvant extraction protocol. **Applied Sciences (Switzerland)**, v. 8, n. 2, 2018.

CIJO GEORGE, V. et al. Quantitative assessment of the relative antineoplastic potential of the n-butanolic leaf extract of *Annona Muricata* Linn. in normal and immortalized human cell lines. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 13, n. 2, p. 699–704, 2012.

COLLIER, J. W. et al. Influence of formulation and processing factors on stability of levothyroxine sodium pentahydrate. **AAPS PharmSciTech**, v. 11, n. 2, p. 818–825, 2010.

CORIA-TÉLLEZ, A. V. et al. *Annona muricata*: A comprehensive review on its

traditional medicinal uses, phytochemicals, pharmacological activities, mechanisms of action and toxicity. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 11, n. 5, p. 662–691, 2018.

CORREA-GORDILLO, J. et al. Actividad antioxidante en guanábana (*Annona muricata* L.). **Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat**, v. 11, n. 2, p. 111–126, 2012.

CORREIA, L. P. et al. Characterization of herbal medicine with different particle sizes using pyrolysis GC/MS, SEM, and thermal techniques. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 111, n. 3, p. 1691–1698, 2013.

CORREIA, L. P. et al. Herbal medicine physical quality evaluation by thermal analysis using adapted Ozawa method. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 122, n. 1, p. 207–214, 2015.

CORREIA, L. P. et al. *Sideroxylon obtusifolium* herbal medicine characterization using pyrolysis GC/MS, SEM and different thermoanalytical techniques. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 123, n. 2, p. 993–1001, 2016.

CORREIA, L. P. et al. Physical and chemical characteristics of *Maytenus rigida* in different particle sizes using SEM/EDS, TG/DTA and pyrolysis GC–MS. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 131, n. 1, p. 743–752, 2018.

CORTÉS-ROJAS, D. F.; OLIVEIRA, W. P. Physicochemical Properties of Phytopharmaceutical Preparations as Affected by Drying Methods and Carriers. **Drying Technology**, v. 30, n. 9, p. 921–934, 2012.

CORTES, D.; FIGADERE, B.; CAVÉ, A. Bis-tetrahydrofuran acetogenins from annonaceae. **Phytochemistry**, v. 32, n. 6, p. 1467–1473, 1993.

COSTA, A. R. DE M. et al. Quercetin-PVP K25 solid dispersions : Preparation, thermal characterization and antioxidant activity. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 104, n. 1, p. 273–278, 2011.

CUINICA, L. G.; MACÊDO, R. O. Thermoanalytical characterization of plant drug and extract of *Urtica dioica* L. and kinetic parameters analysis. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 133, n. 1, p. 591–602, 2018.

DA COSTA, E. M. et al. Thermal characterization of the quercetin and rutin flavonoids. v. 393, p. 79–84, 2002.

DA COSTA, J. DE P.; ROCHA, É. M. DE F. F.; DA COSTA, J. M. C. Study of the physicochemical characteristics of soursop powder obtained by spray-drying. **Food Science and Technology**, v. 34, n. 4, p. 663–666, 2014.

DA COSTA, R. S. et al. Investigation of thermal behavior of *Heliotropium indicum* L. lyophilized extract by TG and DSC. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 111, n. 3, p. 1959–1964, 2013.

DAI, S. et al. A compression behavior classification system of pharmaceutical powders for accelerating direct compression tablet formulation design. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 572, n. 11, p. 118742, 2019.

DAUD, N. N. N. M. N. et al. OPTIMIZATION OF FORMULATION INGREDIENTS OF ANTICANCER SUPPLEMENT FROM *Annona Muricata* LEAVES EXTRACT USING D-. **Science International**, v. 29, n. 1, p. 45–49, 2017.

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

DE ANDRADE, F. H. D. et al. Thermal characterization and microbiology assay of *Annona muricata* L. leaves. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 0123456789, 2019.

DE LEMOS, E. E. P. A Produção de Anonáceas no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, p. 86–93, 2014.

DE MENDONÇA, C. M. S. et al. Thermal compatibility between hydroquinone and retinoic acid in pharmaceutical formulations. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 115, n. 3, p. 2277–2285, 2014.

DE MORAES, I. V. M. et al. UPLC–QTOF–MS and NMR analyses of graviola (*Annona muricata*) leaves. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 26, n. 2, p. 174–179, 2016.

DE SOUSA, O. V. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of the ethanol extract of *Annona muricata* L. leaves in animal models. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, n. 5, p. 2067–2078, 2010.

DE SOUZA, C. M. P. et al. Thermal analysis study of solid dispersions hydrochlorothiazide. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 131, n. 1, p. 681–689, 2018.

DE SOUZA, E. B. R. et al. Enhanced extraction yields and mobile phase separations by solvent mixtures for the analysis of metabolites in *Annona muricata* L. leaves. **Journal of Separation Science**, v. 32, n. 23–24, p. 4176–4185, 2009.

EKERE, K. E. et al. Differential scanning calorimetry and thin layer chromatography: Emerging tools for predicting stability of herbal products. **Journal of Herbal Medicine**, v. 9, p. 74–80, 2017.

EMAMI, S. et al. Development and physicochemical characterization of sirolimus solid dispersions prepared by solvent evaporation method. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 4, n. 4, p. 369–374, 2014.

EMERY, E. et al. Flowability of moist pharmaceutical powders. **Powder Technology**, v. 189, n. 3, p. 409–415, 2009.

FERNANDES, F. H. A. et al. Thermal characterization of dried extract of medicinal plant by DSC and analytical techniques. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 113, n. 2, p. 443–447, 2013.

FERNANDES, F. H. A. et al. Evaluation of compatibility between *Schinopsis brasiliensis* Engler extract and pharmaceutical excipients using analytical techniques

associated with chemometric tools. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 123, n. 3, p. 2531–2542, 2016.

FERNANDES, F. H. A. et al. Development of a sunscreen by thermal compatibility study using *Schinopsis brasiliensis* Engler extract as preservative. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 131, n. 1, p. 753–763, 2018.

FERNANDES, F. H. A.; BOYLAN, F.; SALGADO, H. R. N. Quality standardization of herbal medicines of *Spondias dulcis* Parkinson using analytical and microbiological analysis. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 134, n. 3, p. 1923–1928, 2018.

FERNANDES, M. R. V. et al. Antioxidant and antimicrobial activities of *Psidium guajava* L. spray dried extracts. **Industrial Crops and Products**, v. 60, p. 39–44, 2014.

FERNÁNDEZ, A. E. L. ET AL. Evaluation of emerging methods on the polyphenol content, antioxidant capacity and qualitative presence of acetogenins in soursop pulp (*Annona muricata* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 39, n. 1, p. 1–8, 2017.

FLORENCE, N. T. et al. Antidiabetic and antioxidant effects of *Annona muricata* (Annonaceae), aqueous extract on streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 151, n. 2, p. 784–790, 2014.

FOONG, C. P.; HAMID, R. A. Evaluation of anti-inflammatory activities of ethanolic extract of *Annona muricata* leaves. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 6, p. 1301–1307, 2012.

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

GALLO, L.; RAMÍREZ-RIGO, M. V.; BUCALÁ, V. Development of porous spray-dried inhalable particles using an organic solvent-free technique. **Powder Technology**, v. 342, p. 642–652, 2019.

GALVÃO, F. P. et al. Thermal characterization of some guanilhydrazones by thermal and nonthermal techniques. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, p. 879–887, 2014.

GAVAMUKULYA, Y. et al. Phytochemical screening, anti-oxidant activity and in vitro anticancer potential of ethanolic and water leaves extracts of *Annona muricata* (Graviola). **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 7, n. S1, p. S355–S363, 2014.

GAVAMUKULYA, Y.; WAMUNYOKOLI, F.; EL-SHEMY, H. A. *Annona muricata*: Is the natural therapy to most disease conditions including cancer growing in our backyard? A systematic review of its research history and future prospects. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 10, n. 9, p. 835–848, 2017.

GEORGETTI, S. R. et al. Spray drying of the soybean extract: Effects on chemical properties and antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 41, n. 8,

p. 1521–1527, 2008.

GIRON, D. Contribution of thermal methods and related techniques to the rational development of pharmaceuticals - Part 1. **Pharmaceutical Science and Technology Today**, v. 1, n. 5, p. 191–199, 1998.

GOMES, I. B. et al. Bioactivity of microencapsulated soursop seeds extract on *Plutella xylostella*. **Ciência Rural**, v. 46, n. 5, p. 771–775, 2016.

GROMEK, D.; HOCQUEMILLER, R.; CAVÉ, A. Qualitative and quantitative evaluation of annonaceous acetogenins by high performance liquid chromatography. **Phytochemical Analysis**, v. 5, n. 3, p. 133–140, 1994.

GUIMARÃES, G. P. et al. Thermoanalytical characterization of herbal drugs from *Poincianella pyramidalis* in different particle sizes. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 131, n. 1, p. 661–670, 2018.

HUYNH-BA, K. **Handbook of stability testing in pharmaceutical development: regulations, methodologies, and best practices**. 1^a Ed. Springer Science & Business Media, 2008.

JALLO, L. J. et al. Improvement of flow and bulk density of pharmaceutical powders using surface modification. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 423, n. 2, p. 213–225, 2012.

JIMÉNEZ, V. M. et al. Identification of phenolic compounds in soursop (*Annona muricata*) pulp by high-performance liquid chromatography with diode array and electrospray ionization mass spectrometric detection. **Food Research International**, v. 65, n. PA, p. 42–46, 2014.

JORDÁN-SUÁREZ, O.; GLORIO-PAULET, P.; VIDAL, L. Microstructure of *Annona muricata* L. Leaves Extract Microcapsules Linked to Physical and Chemical Characteristics. **Journal of Encapsulation and Adsorption Sciences**, v. 08, n. 03, p. 178–193, 2018.

JUBAER, H. et al. Identification of regions in a spray dryer susceptible to forced agglomeration by CFD simulations. **Powder Technology**, v. 346, p. 23–37, 2019.

KLEIN, T. et al. Fitoter??picos: Um mercado promissor. **Revista de Ciências Farmaceuticas Basica e Aplicada**, v. 30, n. 3, p. 241–248, 2009.

KOSTOVA, I.; DINCHEV, D. Saponins in *Tribulus terrestris* - Chemistry and bioactivity. **Phytochemistry Reviews**, v. 4, n. 2–3, p. 111–137, 2005.

KRISHNAIAH, D.; SARBATLY, R.; NITHYANANDAM, R. Microencapsulation of *Morinda citrifolia* L. extract by spray-drying. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 90, n. 5, p. 622–632, 2012.

LAVOR, E. P. et al. Application of thermal analysis to the study of antituberculosis drugs-excipient compatibility. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 115, n. 3, p. 2303–2309, 2014.

LEDEȚI, I. et al. Kinetic analysis of solid-state degradation of pure pravastatin versus pharmaceutical formulation. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 121, n. 3, p. 1103–1110, 2015.

LEITE NETA, M. T. S. et al. Effect of spray drying on bioactive and volatile compounds in soursop (*Annona muricata*) fruit pulp. **Food Research International**, v. 124, n. September 2018, p. 70–77, 2019.

LEITE, R. D. S. et al. Standardization and Stability Evaluation of Dry Extracts of Myracrodruon Urundeuva Allemão Obtained By Spray Drier. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 9, n. 2, p. 154, 2017.

LEITE, R. DA S. et al. Evaluation of compatibility between dried extracts of Myracrodruon urundeuva Allemão and pharmaceutical excipients by TG and DTA. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 133, n. 1, p. 633–639, 2018.

LILTORP, K. et al. Solid state compatibility studies with tablet excipients using non thermal methods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 55, n. 3, p. 424–428, 2011.

LIU, H. et al. Pyrolysis characteristics and kinetic modeling of *Artemisia apiacea* by thermogravimetric analysis. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 131, n. 2, p. 1783–1792, 2018.

LIZARRAGA, E.; ZABALETA, C.; PALOP, J. A. Thermal stability and decomposition of pharmaceutical compounds. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 89, n. 3, p. 783–792, 2007.

LOCH-NECKEL, G. et al. Obtenção de extratos secos de carotenoides a partir da biomassa da microalga *Haematococcus pluvialis* por secagem em torre de aspersão (spray-drying). **Matéria (Rio de Janeiro)**, v. 23, n. 4, 2018.

LOFTSSON, T. **Drug Stability for Pharmaceutical Scientists**. 1^a ed. Elsevier, 2014.

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

MABRY, T. J. .; MARKHAM, K. R. .; THOMAS, M. B. **The systematic identification of flavonoids**. 1^a ed, New York, Springer, p. 362, 1970.

MACHADO, A. R. T. et al. Total α,β -Unsaturated- γ -Lactone Acetogenins in *Annona muricata* by Proton NMR Spectroscopy. **Applied Magnetic Resonance**, v. 46, n. 2, p. 153–160, 2014.

MATIĆ, P.; SABLJIĆ, M.; JAKOBEK, L. Validation of Spectrophotometric Methods for the Determination of Total Polyphenol and Total Flavonoid Content. **Journal of AOAC International**, v. 100, n. 6, p. 1795–1803, 2017.

MATSUSHIGE, A. et al. Annonamine, a new aporphine alkaloid from the leaves of *Annona muricata*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 60, n. 2, p. 257–259, 2012.

MAYORAL, M. C. et al. Different approaches to proximate analysis by thermogravimetry analysis. **Thermochimica Acta**, v. 370, n. 1–2, p. 91–97, 2001.

MCLAUGHLIN, J. L. Paw paw and cancer: Annonaceous acetogenins from discovery to commercial products. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 7, p. 1311–1321, 2008.

MEDA, A. et al. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. **Food Chemistry**, v. 91, n. 3, p. 571–577, 2005.

MEREGALLI, M. M. **ESTUDO COMPARATIVO DE DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DA CASCA DO ARAÇÁ-VERMELHO (*Psidium cattleianum* Sabine)**. [s.l.] UNIVERSIDADE REGIONAL INTEGRADA DO ALTO URUGUAI E DAS MISSÕES, 2017.

MOGHADAMTOUSI, S. Z. et al. *Annona muricata* leaves induced apoptosis in A549 cells through mitochondrial-mediated pathway and involvement of NF- κ B. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, n. 1, p. 1–13, 2014.

MOGHADAMTOUSI, S. Z. et al. *Annona muricata* (Annonaceae): A review of its traditional uses, isolated acetogenins and biological activities. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 7, p. 15625–15658, 2015.

MOGHBELI, S. et al. A Taguchi approach optimization of date powder production by spray drying with the aid of whey protein-pectin complexes. **Powder Technology**, v. 359, p. 85–93, 2020.

MORAES, I. V. M. D. et al. Concentration of hydroalcoholic extracts of graviola (*Annona muricata* L.) pruning waste by ultra and nanofiltration: Recovery of bioactive compounds and prediction of energy consumption. **Journal of Cleaner Production**, v. 174, p. 1412–1421, 2018.

MULIA, K. et al. Selective polarity-guided extraction and purification of acetogenins in *Annona muricata* L. leaves. **International Journal of Technology**, v. 6, n. 7, p. 1221–1227, 2015.

MULLARNEY, M. P. et al. Applying dry powder coatings to pharmaceutical powders using a comil for improving powder flow and bulk density. **Powder Technology**, v. 212, n. 3, p. 397–402, 2011.

MUTHU, S.; DURAIRAJ, B. Molecular docking studies on interaction of *Annona muricata* compounds with antiapoptotic proteins Bcl-2 and survivin. **Sky Journal of Biochemistry Research**, v. 5, n. 2, p. 14–17, 2016.

NAGESWARA RAO, R.; NAGARAJU, V. An overview of the recent trends in development of HPLC methods for determination of impurities in drugs. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 33, n. 3, p. 335–377, 2003.

NAJMUDDIN, S. U. F. et al. Anti-cancer effect of *Annona Muricata* Linn Leaves Crude Extract (AMCE) on breast cancer cell line. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 16, n. 1, p. 1–20, 2016.

NAWWAR, M. et al. A flavonol triglycoside and investigation of the antioxidant and cell stimulating activities of *Annona muricata* Linn. **Archives of Pharmacal Research**, v. 35, n. 5, p. 761–767, 2012.

NEAMSUVAN, O.; KOMONHIRAN, P.; BOONMING, K. Medicinal plants used for hypertension treatment by folk healers in Songkhla province, Thailand. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 214, n. August 2017, p. 58–70, 2018.

OJEZELE, O. J.; OJEZELE, M. O.; ADEOSUN, A. M. Comparative Phytochemistry and Antioxidant Activities of Water and Ethanol Extract of *Annona muricata* Linn Leaf, Seed and Fruit. **Advances in Biological Research**, v. 10, n. 4, p. 230–235, 2016.

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

OLIVEIRA, O. W.; PETROVICK, P. R. Secagem por aspersão (spray drying) de extratos vegetais: Bases e aplicações. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n. 4, p. 641–650, 2010.

OSORIO, E. et al. Antiprotozoal and cytotoxic activities in vitro of Colombian Annonaceae. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 3, p. 630–635, 2007.

PEREIRA, H. N. et al. Physicochemical characterization of the vegetal drug and nebulized extract of the roots from *Apodanthera congestiflora* Cogn. (Cucurbitaceae): An efficient experience in quality control of plant raw materials. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 137, n. 2, p. 361–368, 2019.

PEREIRA, M. A. V. et al. Compatibility study between chitosan and pharmaceutical excipients used in solid dosage forms. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 116, n. 2, p. 1091–1100, 2014.

PETROVICK, G. F.; PETROVICK, P. R.; BASSANI, V. L. *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC., Asteraceae: Development of granules from spray dried powder. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n. 5, p. 803–811, 2010.

PFERSCHY-WENZIG, E. M.; BAUER, R. The relevance of pharmacognosy in pharmacological research on herbal medicinal products. **Epilepsy and Behavior**, v. 52, p. 344–362, 2015.

PINTO, A. C. Q. . et al. **Annona Species**. UK: International Centre for Underutilised Crops, 2005. v. 1

PINTO, J. D. B. . et al. AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES FÍSICO-MECÂNICAS DE PARACETAMOL GRANULADO PARA PRODUÇÃO DE COMPRIMIDOS POR COMPRESSÃO DIRETA. **Interbio**, v. 9, n. 01–06, p. 21–30, 2015.

PLANTE, A. F.; FERNÁNDEZ, J. M.; LEIFELD, J. Application of thermal analysis techniques in soil science. **Geoderma**, v. 153, n. 1–2, p. 1–10, 2009.

POOZESH, S.; BILGILI, E. Scale-up of pharmaceutical spray drying using scale-up rules: A review. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 562, n. January, p. 271–

292, 2019.

RADAPONG, S. et al. Chronic toxicity of *Annona muricata* L. Leaf extract. **Agriculture and Natural Resources**, v. 53, n. 1, p. 53–60, 2019.

RADJI, M.; KURNIATI, M.; KIRANASARI, A. Comparative antimycobacterial activity of some Indonesian medicinal plants against multi-drug resistant *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 5, n. 1, p. 019–022, 2015.

RAMOS, R. T. . et al. Spectrophotometric Quantification of Flavonoids in Herbal Material, Crude Extract, and Fractions from Leaves of *Eugenia uniflora* Linn. **Pharmacognosy Research**, v. 9, n. 3, p. 253–260, 2017.

RASAI, S.; GEORGE, A. P.; KANTHARAJAH, A. S. Tissue culture of *Annona* spp. (cherimoya, atemoya, sugar apple and soursop): A review. **Scientia Horticulturae**, v. 62, n. 1–2, p. 1–14, 1995.

SABLANIA, V.; BOSCO, S. J. D. Optimization of spray drying parameters for *Murraya koenigii* (Linn) leaves extract using response surface methodology. **Powder Technology**, v. 335, p. 35–41, 2018.

SAMPAIO, R. D. C. A. et al. Thermal characterization of *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B. Verl. dry extracts obtained by spray dryer. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 123, n. 3, p. 2469–2475, 2016.

SANTANA, C. P. et al. Compatibility study of dry extract of *Ximenia americana* L. and pharmaceutical excipients used in solid state. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 133, n. 1, p. 603–617, 2018a.

SANTANA, C. P. et al. Dissolution and uniformity of content of tablets developed with extract of *Ximenia americana* L. **PLoS ONE**, v. 13, n. 5, p. 1–18, 2018b.

SANTANA, C. P.; MEDEIROS, F. D.; CORREIA, L. P. Dissolução e uniformidade de conteúdo de comprimidos desenvolvidos com extrato de *Ximenia americana* L. p. 1–11, 2018.

SANTIVARANGKNA, C.; KULOZIK, U.; FOERST, P. Alternative drying processes for the industrial preservation of lactic acid starter cultures. **Biotechnology Progress**, v. 23, n. 2, p. 302–315, 2007.

SÃO JOSÉ, A. R. et al. Atualidades e perspectivas das Anonáceas no mundo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. SPEC. EDITION 1, p. 86–93, 2014.

SEMALTY, A.; TANWAR, Y. S.; SEMALTY, M. Preparation and characterization of cyclodextrin inclusion complex of naringenin and critical comparison with phospholipid complexation for improving solubility and dissolution. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 115, n. 3, p. 2471–2478, 2014.

SHIBULA, K.; VELAVAN, S. DETERMINATION OF BIOACTIVE COMPOUNDS IN *Annona muricata* LEAF EXTRACT. **Jornal of bioscience and Technology**, v. 7, n. 3, p. 762–768, 2016.

SHISHIR, M. R. I.; CHEN, W. Trends of spray drying: A critical review on drying of fruit and vegetable juices. **Trends in Food Science and Technology**, v. 65, p. 49–67, 2017.

SILVA, K. E. R. et al. Modelos de avaliação da estabilidade de fármacos e medicamentos para a indústria farmacêutica. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 2, p. 129–135, 2009.

SINGH, I.; KUMAR, P. Preformulation studies for direct compression suitability of cefuroxime axetil and paracetamol: A graphical representation using SeDeM diagram. **Acta Polonae Pharmaceutica - Drug Research**, v. 69, n. 1, p. 87–93, 2012.

SOLLOHUB, KRZYSZTOF; CAL, K. Spray Drying Technique: II. Current Applications in Pharmaceutical Technology. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 99, n. 2, p. 587–597, 2010.

TAIKA, B. et al. An overview of anti-diabetic plants used in Gabon: Pharmacology and toxicology. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 216, n. January, p. 203–228, 2018.

TAKAHASHI, J. A. et al. Antibacterial activity of eight Brazilian Annonaceae plants. **Natural Product Research**, v. 20, n. 1, p. 21–26, 2006.

TIȚA, B. et al. Compatibility study between ketoprofen and pharmaceutical excipients used in solid dosage forms. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 56, n. 2, p. 221–227, 2011.

TONTUL, I.; TOPUZ, A. Spray-drying of fruit and vegetable juices: Effect of drying conditions on the product yield and physical properties. **Trends in Food Science and Technology**, v. 63, p. 91–102, 2017.

VALLE, A. C. . et al. Ethanol extract of plants from biome 'cerrado' active against bacteria related to respiratory disease in pets. **Planta Medica**, v. 80, n. 16, p. 1–15, 2014.

VAN'T KLOOSTER, C.; VAN ANDEL, T.; REIS, R. Patterns in medicinal plant knowledge and use in a Maroon village in Suriname. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 189, p. 319–330, 2016.

VAN DE VENTER, M. . et al. In vitro anti-HIV and-TB activities of *Annona muricata* and *Artemisia afra* extracts. **Planta Medica**, v. 80, n. 16, p. 1–29, 2014.

VASCONCELOS, E. A. F. et al. Influência da temperatura de secagem e da concentração de Aerosil®200 nas características dos extratos secos por aspersão da *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 3, p. 243–249, 2005.

VASS, P. et al. Drying technology strategies for colon-targeted oral delivery of biopharmaceuticals. **Journal of Controlled Release**, v. 296, n. January, p. 162–178, 2019.

VIDOVIĆ, S. S. et al. Maltodextrin as a carrier of health benefit compounds in *Satureja montana* dry powder extract obtained by spray drying technique. **Powder**

Technology, v. 258, p. 209–215, 2014.

VIEIRA, G. H. F. et al. Antibacterial effect (in vitro) of moringa oleifera and annona muricata against gram positive and gram negative bacteria. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 52, n. 3, p. 129–132, 2010.

VIEIRA, G. S. et al. Determination of anthocyanins and non-anthocyanin polyphenols by ultra performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry (UPLC/ESI–MS) in jussara (*Euterpe edulis*) extracts. **Journal of Food Science and Technology**, v. 54, n. 7, p. 2135–2144, 2017.

VLADIĆ, J. et al. Recycling of filter tea industry by-products: Production of *A. millefolium* powder using spray drying technique. **Industrial Crops and Products**, v. 80, p. 197–206, 2016.

VYAZOVKIN, S. et al. ICTAC Kinetics Committee recommendations for collecting experimental thermal analysis data for kinetic computations. **Thermochimica Acta**, v. 590, p. 1–23, 2014.

WAHAB, S. M. A. et al. Exploring the leaves of *Annona muricata* L. as a source of potential anti-inflammatory and anticancer agents. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, n. JUN, 2018.

YANG, C. et al. Synergistic interactions among flavonoids and acetogenins in *Graviola* (*Annona muricata*) leaves confer protection against prostate cancer. **Carcinogenesis**, v. 36, n. 6, p. 656–665, 2015.

YANG, H. et al. Supercritical fluid CO₂ extraction and simultaneous determination of eight annonaceous acetogenins in *Annona* genus plant seeds by HPLC-DAD method. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 49, n. 1, p. 140–144, 2009.

YANG, H. et al. HPLC method for the simultaneous determination of ten annonaceous acetogenins after supercritical fluid CO₂ extraction. **International Journal of Biomedical Science**, v. 6, n. 3, p. 202–207, 2010.

YUN, J. W. et al. Comparative toxicity of silicon dioxide, silver and iron oxide nanoparticles after repeated oral administration to rats. **Journal of Applied Toxicology**, v. 35, n. 6, p. 681–693, 2015.

ZAFRA-POLO, M. C. et al. Acetogenins from annonaceae, inhibitors of mitochondrial complex I. **Phytochemistry**, v. 42, n. 2, p. 253–271, 1996.

APÊNDICE A - THERMAL CHARACTERIZATION AND MICROBIOLOGY ASSAY OF ANNONA MURICATA L. LEAVES.

Publicado no *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, fator de impacto 2,471

Journal of Thermal Analysis and Calorimetry

<https://doi.org/10.1007/s10973-019-08050-w>



Fabrcio Havy Dantas de Andrade^{1,2} . Rayanne Sales de Araujo Batista². Taynara Batista Lins². Felipe Hugo Alencar Fernandes³. Deysiane Oliveira Brandao². Rui Oliveira Macedo^{1,2}. Fbio Santos de Souza². Almir Goncalves Wanderley¹

Received: 31 August 2018 / Accepted: 29 January 2019

Akadémiai Kiadó, Budapest, Hungary 2019

Abstract

Annona muricata L., Annonaceae, popularly known as soursop, has anticancer and antidiabetic pharmacological properties. This work aims the characterization by thermoanalytical technique and determination of antimicrobial activity of different *A. muricata* L. leaves particle sizes. The leaves were dried, knifed, and separated by particle size. Samples were characterized by scanning electron microscopy (SEM) and thermogravimetry (TG) using the Ozawa kinetics model in two atmospheres (nitrogen and synthetic air). The antimicrobial activity and minimum inhibitory concentration of infusions were performed by the broth microdilution method to *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Klebsiella pneumoniae*. SEM analysis suggests heterogeneous distribution in the observed particle sizes. TG curves were able to differentiate the degradation events and the residue contents in the samples analyzed in the nitrogen and synthetic air atmospheres. In nitrogen atmosphere curves, the different particle sizes presented four mass loss events, and residue ranged from 20.90 to 26.80% at the end of the analysis. In synthetic air atmosphere, the different particle sizes presented three mass loss events, and residue ranged from 7.80 to 10.42%. Ozawa model showed reaction order equal to zero for all samples assayed, and the activation energy (E_a) ranged from 121.36 to 135.42 and 115.50 to 141.00 kJ mol^{-1} for the nitrogen and synthetic air atmospheres, respectively. Antibacterial activity was confirmed for all particle sizes, in special to AM4 with *S. aureus*, *E. coli*, and *K. pneumoniae*. These results indicate that leaves from *A. muricata* L. have great potential for a variety of medicinal applications.

APÊNDICE B - CHARACTERIZATION AND COMPATIBILITY OF DRY EXTRACT FROM *ANNONA MURICATA* L. AND PHARMACEUTICAL EXCIPIENTS

Publicado no *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, fator de impacto 2,471

Journal of Thermal Analysis and Calorimetry
<https://doi.org/10.1007/s10973-019-09159-8>



Characterization and compatibility of dry extract from *Annona muricata* L. and pharmaceutical excipients

Fabrício Havy Dantas de Andrade^{1,2}  · Rayanne Sales de Araújo Batista² · Taynara Batista Lins Melo² · Felipe Hugo Alencar Fernandes³ · Rui Oliveira Macedo^{1,2} · Fábio Santos de Souza² · Almir Gonçalves Wanderley¹

Received: 25 October 2018 / Accepted: 5 December 2019

© Akadémiai Kiadó, Budapest, Hungary 2019

Abstract

The aim of this study was to characterize and evaluate the compatibility of the dry extract (DE) of leaves of *Annona muricata* L. with pharmaceutical excipients usually used in the manufacturing of medicines. Characterization of the DE and binary mixtures of the extract and excipients was carried out using scanning electron microscopy (SEM), differential scanning calorimetry, thermogravimetry (TG) and Fourier transform infrared attenuated total reflection spectroscopy. Spray drying technique produced extract to form spherical and hollow particles revealed by SEM, with four stages of mass loss in the TG curve. Pre-formulation study showed compatibility between the extract and microcrystalline cellulose, lactose, croscarmellose sodium and sodium starch glycolate. New medicines containing herbal drugs enter the market every year, and our study demonstrates that thermoanalytical techniques can be used in the development and quality control of herbal medicines.

Keywords *Annona muricata* L. · Dry extract · Herbal medicines · Pre-formulation · Pharmaceutical excipients

APENDICE C - RESUMO DOS MÉTODOS E RESULTADOS ESPERADOS NA OBTENÇÃO DO EXTRATO SECO DAS FOLHAS DA GRAVIOLA

Resumo dos métodos e resultados esperados para a obtenção de extratos secos das folhas da graviola

Objetivo	Métodos	Resultado esperados
Obtenção da DV	Selecionar as folhas sem a presença de fungos, sujeiras, larvas e ovos de insetos; Higienizar as folhas com hipoclorito de sódio a 0,04%, enxaguar com água correto; Secar em estufa com circulação de ar à 40 ± 2 °C por 120 h; Triturar as folhas secas em moinhos de facas ou equivalente; Armazenar protegida da luz e umidade	Folhas secas pulverizadas; Cor e odor característicos; Umidade inferior a 8%; Ausência de contaminantes como pedras, areia e insetos;
Obtenção do EHA	Macerar a fria por 62 horas; Proporção droga/solvente 15%; Solvente extrator: etanol:água entre 50-70%	Extrato hidroalcoólico com forte coloração verde e odor característico das folhas de graviola; Rendimento do processo de $\pm 60\%$; Teor de <i>FT</i> de $\pm 45,0$ mg.g ⁻¹ e resíduo seco de $\pm 4\%$ (utilizando etanol à 70% como solvente extrator); Densidade relativa de $\pm 0,9$ g.cm ⁻³ e pH aparente de $\pm 5,5$.
Obtenção do ES	Secar em Spray dryer; utilizar DS na concentração de 30% em relação ao resíduo seco do EHA; Fluxo de alimentação 9 mL.min ⁻¹ ; Temperatura de entrada de ar de 130 °C; Atomizador com bocal de duplo fluido pneumático e orifício de abertura de 0,7 mm, Fluxo de ar 35 m ³ .h ⁻¹ .	Pó secos com rendimento de processo de $\pm 70\%$, teor de umidade < 3%, teor de flavonoides totais de ± 38 mg.g ⁻¹ do ES. O pó apresenta baixa densidade, sem aglomerados e fluidez maior que 7 g.s ⁻¹ .

Legenda: DV – Droga vegetal; EHA – Extrato hidroalcoólico; ES – Extrato seco; DS – Dióxido de silício coloidal 200; *FT* – Flavonoides totais. Fonte: O autor (2020).