



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

LARISSA PEREIRA ALVES

**DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS COM EXTRATO DE
AMOREIRA (*Morus nigra* L.) COMO ESTRATÉGIA TERAPÊUTICA
CONTRA A HIPERTENSÃO ARTERIAL**

RECIFE

2024

LARISSA PEREIRA ALVES

**DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS COM EXTRATO DE
AMOREIRA (*Morus nigra* L.) COMO ESTRATÉGIA TERAPÊUTICA
CONTRA A HIPERTENSÃO ARTERIAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Fármacos e medicamentos.

Orientador: Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto

RECIFE

2024

Catálogo na fonte:
Bibliotecária: Kyria Macedo, CRB4:1693

A474d	<p>Alves, Larissa Pereira Desenvolvimento de nanopartículas com extrato de amoreira (Morus nigra L.) como estratégia terapêutica contra a hipertensão arterial / Larissa Pereira Alves. – 2024. 264 f. : il., tab.</p> <p>Orientador: Pedro José Rolim Neto. Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2024. Inclui referências, apêndice e anexo.</p> <p>1. Hipertensão. 2. Sistemas de Liberação de Fármacos por Nanopartículas. 3. Rubus. 4. Extratos Vegetais. I. Rolim Neto, Pedro José (orientador). II. Título.</p> <p>617.6 CDD (23.ed.) UFPE (CCS 2024 - 084)</p>
-------	---

LARISSA PEREIRA ALVES

**DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS COM EXTRATO DE
AMOREIRA (*Morus nigra* L.) COMO ESTRATÉGIA TERAPÊUTICA
CONTRA A HIPERTENSÃO ARTERIAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Fármacos e medicamentos.

Aprovado em 22 / 03 /2024

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto (Presidente)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Fábio Rocha Formiga (Examinador Interno)
Instituto Aggeu Magalhães

Prof.^a Dr.^a Larissa Araújo Rolim (Examinadora Externa)
Universidade Federal do Vale do São Francisco

Prof.^a Dr.^a Héliida Maria de Lima Maranhão Brasileiro (Examinadora Externa)
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Danilo Augusto Ferreira Fontes (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

Grata à Deus por tudo que aconteceu e acontece em minha vida, pois é junto à Ele que me mantenho firme em todas dificuldades até aqui. Sua proteção e presença em cada passo desta jornada, manteve-me segura sob qualquer adversidade e principalmente nas minhas idas e vindas de Recife a minha cidade natal.

À minha família, por todo apoio, carinho, compreensão e amor, pois sem eles não teria trilhado meus passos e não chegaria até aqui. Em especial aos meus pais, por serem meu porto seguro, pelas orações e todo o aconselhamento durante essa jornada.

Aos meus amigos Joandra, Thayse, Rafaela e Maria Alice pelo incentivo, paciência, atenção e amizade de sempre.

Ao professor Dr. Pedro José Rolim Neto por toda confiança, orientação, conhecimento transmitido e apoio constante, sua dedicação foi fundamental para o meu crescimento acadêmico e profissional. Agradeço por sempre acreditar no meu potencial e me incentivar na vida acadêmica, você foi e é um verdadeiro mentor na ciência.

A professora Dra. Larissa Rolim por todo incentivo e suporte dado para a realização desta pesquisa.

Aos meus amigos de laboratório em especial à Lavinya e Demis, a presença e apoio de vocês foram verdadeiros pilares durante toda essa jornada. As palavras de incentivo, ombros para chorar e risadas compartilhadas tornaram os desafios mais leves e as conquistas mais significativas. Levarei vocês para sempre em meu coração. À Bruna, Emerson, Myla, Fernanda, Lucas e Widson por todas conversas, saídas e ajudas. Estar com vocês é um verdadeiro significado de leveza e risadas garantidas. À Joanellys, Natália, Laysa, Stéfani e Aline pelo convívio no laboratório. À Lourenço pela disponibilidade e todos os apoios técnicos.

Aos pesquisadores parceiros, especialmente à Nathália Carvalho da UNIVASF, que sempre foi muito solícita e se destacou como a que mais me ajudou em bancada durante toda essa trajetória. Sua colaboração e apoio foram fundamentais para o sucesso deste trabalho. Sou imensamente grata pelo acolhimento em Petrolina, por toda paciência e conhecimento repassado. Ao Prof. Lamartine e Prof.^a Monica que abriram as portas do NCQMC quando o sonificador do laboratório não funcionava.

Agradeço também aos membros da banca examinadora, por dedicarem seu tempo e expertise na avaliação deste trabalho. Por fim, às instituições que viabilizaram esse doutorado: FACEPE, pelo auxílio financeiro, UFPE, UNIVASF e ao PPGCF.

RESUMO

A hipertensão arterial é uma preocupação global de saúde, especialmente no Brasil, onde os tratamentos atuais apresentam limitações. Busca-se por alternativas terapêuticas promissoras, como os compostos fenólicos das folhas de *Morus nigra* L., que mostram potencial na regulação da pressão arterial. Nesse contexto, este estudo visou desenvolver nanopartículas contendo compostos fenólicos do extrato aquoso de *Morus nigra* L. para o tratamento da hipertensão arterial. Inicialmente, houve um controle e padronização das condições extrativas do extrato de *Morus nigra* L. obtido por folhas de duas localidades diferentes (Pernambuco PE e Paraíba PB, Brasil), utilizando um planejamento fatorial fracionado para maximização dos compostos majoritários por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Além disso, foi determinado o teor de compostos fenólicos totais, bem como, atividade antioxidante para comparação dos extratos escolhidos. Para o desenvolvimento das formulações, foi efetivada uma otimização através de planejamento experimental de triagem (fatorial fracionado) e de superfície (Box-Behnken), que possibilitou a escolha de nanopartículas (NPs) com melhor tamanho, índice de polidispersão (PDI), potencial zeta (PZ) e eficiência de encapsulamento (EE) através de duas técnicas de obtenção de NPs (nanoprecipitação e dupla emulsificação por evaporação do solvente). Além disso, foi realizado o teste de compatibilidade entre os componentes da formulação Espectroscopia de Infravermelho (FTIR) e Termogravimetria (TG). Os NPs escolhidos também foram caracterizados por testes *in vitro* de cinética de liberação, Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e citotoxicidade em células endoteliais. Desta forma, a maior concentração de fenólicos consistiu do extrato obtido da PB com 7,05 mg equivalentes de ácido gálico/g de amostra, enquanto o extrato obtido de PE apresentou 3,42 mg equivalente de ácido gálico/ g de amostra. Os resultados dos estudos revelaram que o extrato aquoso obtido no estado da PB teve a atividade inibitória do radical DPPH maior (43,99%), comparado ao estado de PE (29,33%), sendo assim, o extrato da PB com condições extrativas de infusão usando temperatura de 85°C; droga:solvente (25:250) e tempo de 30 minutos foi o escolhido para encapsulação em NPs. Os resultados demonstraram compatibilidade entre o extrato e os componentes da formulação. O planejamento experimental resultou em NPs com tamanho de 175 nm, PDI 0,1855, PZ + 35,2 mV e EE 93,46% para dupla emulsificação, enquanto que para o método de nanoprecipitação, obteve NPs com tamanho de 274 nm, PZ +41,4 mV e EE 89,39%. O MEV comprovou a formação de NPs esféricas, lisas e com tamanhos similares ao encontrado por espalhamento de luz. Os compostos fenólicos foram liberados de maneira apropriada das NPs, seguindo o modelo de Weibull. Esse processo foi aplicado tanto na nanoprecipitação quanto na dupla emulsificação. A etapa subsequente envolveu a liofilização, sendo empregada maltodextrina como crioprotetor, em condições de liberação semelhantes. Não houve citotoxicidade em células endoteliais do cordão umbilical humano através das concentrações utilizadas do extrato aquoso, enquanto as NPs foram citotóxicas nas concentrações acima de 375 µg/mL. Portanto, foi possível obter NPs com propriedades físico-químicas adequadas, com cinética de liberação prolongada, que podem ser promissoras para administração oral, porém, mais estudos são necessários para comprovar sua eficácia e desempenho.

Palavras-chave: nanocarreador; liberação modificada; amoreira; extrato vegetal; experimental design.

ABSTRACT

High blood pressure is a global health concern, especially in Brazil, where current treatments have limitations. There is a search for promising therapeutic alternatives, such as phenolic compounds from the leaves of *Morus nigra* L., which show potential in regulating blood pressure. In this context, this study aimed to develop nanoparticles containing phenolic compounds from the aqueous extract of *Morus nigra* L. for the treatment of arterial hypertension. Initially, there was control and standardization of the extractive conditions of the *Morus nigra* L. extract obtained from leaves from two different locations (Pernambuco PE and Paraíba PB, Brazil), using a fractional factorial design to maximize the majority compounds by high-performance liquid chromatography. (HPLC). Furthermore, the content of total phenolic compounds was determined, as well as antioxidant activity for comparison of the chosen extracts. For the development of the formulations, optimization was carried out through experimental planning of screening (fractional factorial) and surface (Box-Behnken), which made it possible to choose nanoparticles (NPs) with better size, polydispersity index (PDI), potential zeta (PZ) and encapsulation efficiency (EE) through two techniques for obtaining NPs (nanoprecipitation and double emulsification by solvent evaporation). Furthermore, a compatibility test was carried out between the components of the Infrared Spectroscopy (FTIR) and Thermogravimetry (TG) formulation. The chosen NPs were also characterized by *in vitro* release kinetic tests, Scanning Electron Microscopy (SEM) and cytotoxicity in endothelial cells. Thus, the highest concentration of phenolics consisted of the extract obtained from PB with 7.05 mg gallic acid equivalents/g of sample, while the extract obtained from PE presented 3.42 mg gallic acid equivalent/g of sample. The results of the studies revealed that the aqueous extract obtained in the PB state had a higher DPPH radical inhibitory activity (43.99%), compared to the PE state (29.33%), thus, the PB extract with conditions infusion extractives using a temperature of 85°C; drug:solvent (25:250) and a time of 30 minutes was chosen for encapsulation in NPs. The results demonstrated compatibility between the extract and the components of the formulation. The experimental planning resulted in NPs with a size of 175 nm, PDI 0.1855, PZ + 35.2 mV and EE 93.46% for double emulsification, while for the nanoprecipitation method, NPs with a size of 274 nm, PZ +41.4 mV and EE 89.39%. The SEM confirmed the formation of spherical, smooth NPs with sizes similar to those found by light scattering. The phenolic compounds were appropriately released from the NPs, following the Weibull model. This process was applied to both nanoprecipitation and double emulsification. The subsequent step involved freeze-drying, using maltodextrin as a cryoprotectant, under similar conditions. There was no cytotoxicity in human umbilical cord endothelial cells by the aqueous extract, while the NPs were cytotoxic at concentrations above 375 µg/mL. Therefore, it was possible to obtain NPs with adequate physicochemical properties, with prolonged release kinetics, which may be promising for oral administration, however, more studies are needed to prove their efficacy and performance.

Keywords: nanocarrier; modified release; mulberry; plant extract; experimental design.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-	Os principais sistemas neuroendócrinos envolvidos na regulação da pressão arterial.....	22
Figura 2-	Classificação taxonômica de <i>Morus nigra</i> L.(Mulberry).....	35
Figura 3-	Folhas e frutos de <i>Morus nigra</i> L.....	35
Figura 4-	Representação esquemática das micelas normais e inversas.....	66
Figura 5-	Representação de nanopartículas poliméricas.....	66
Figura 6-	Fluxograma do método de Folin- Ciocalteu.....	90
Figura 7-	Histograma de distribuição granulométrica das folhas moídas de <i>Morus nigra</i> L.....	96
Figura 8-	Curvas acumulativas de retenção e passagem referente as amostras de <i>Morus nigra</i> L. Paraíba.....	97
Figura 9-	Curvas acumulativas de retenção e passagem referente as amostras de <i>Morus nigra</i> L. Pernambuco.....	97
Figura 10-	Cromatoplaça referente a análise dos flavonoides e derivados cinâmicos.....	100
Figura 11-	Sobreposição dos espectros UV-VIS dos flavonoides.....	102
Figura 12-	Espectro de absorção UV-VIS do ácido clorogênico.....	102
Figura 13-	Perfil cromatográfico dos padrões analíticos em 340 nm.....	103
Figura 14-	Perfil dos extratos de <i>Morus nigra</i> L. de Pernambuco.....	104
Figura 15-	Perfil cromatográfico do extrato de <i>Morus nigra</i> L. de Paraíba.....	104
Figura 16-	Fluxograma de obtenção do extrato aquoso de <i>Morus nigra</i> L.....	106
Figura 17-	Influência das variáveis X1 (T °C), X2 (T min) e X3 (Droga:solvente) do extrato de Pernambuco e de suas interações sobre as variáveis respostas de isoquercetina(A), rutina (B) e ácido clorogênico (C).....	114
Figura 18-	Influência das variáveis X1 (T °C), X2 (T min) e X3 (Droga:solvente) do extrato da Paraíba e de suas interações sobre as variáveis respostas de isoquercetina (A), rutina (B) e ácido clorogênico (C).....	115
Figura 19-	Superfícies de resposta que descrevem as interações das variáveis em relação ao teor de isoquercetina para o extrato obtido de Pernambuco (A, B e C) e da Paraíba (D) em função da razão temperatura (X1), tempo de extração (X2) e droga:solvente (X3).....	116
Figura 20-	Cromatograma de comparação entre o extrato aquoso EA2PE e o liófilo.....	118
Figura 21-	Cromatograma de comparação entre o extrato aquoso EA4PB e o liófilo.....	121
Figura 22-	Curvas de TG das drogas vegetais e extratos seco de <i>Morus nigra</i> L. obtidos da Paraíba e Pernambuco.....	124
Figura 23-	Reação do Ácido Gálico com Molibdênio, componente do reagente do Folin-Ciocalteu.....	125
Figura 24-	Espectro de varredura (400-900 nm) do ácido gálico e do extrato aquoso obtido a partir da matéria-prima de <i>Morus nigra</i> L.....	126

Figura 25-	Curva analítica média do ácido gálico.....	129
Figura 26-	Distribuição da análise de resíduos da linearidade do ácido gálico.....	131
Figura 27-	Representação gráfica da curva de linearidade do extrato das folhas de <i>Morus nigra</i> L. coletadas na Paraíba.....	133
Figura 28-	Distribuição da análise de resíduos da linearidade do extrato da Paraíba.....	133
Figura 29-	Curva analítica média do extrato de Pernambuco.....	133
Figura 30-	Distribuição da análise de resíduos da linearidade do extrato de Pernambuco.....	135
Figura 31-	Comparação entre a curva de especificidade e linearidade do extrato de <i>Morus nigra</i> L. da Paraíba.....	136
Figura 32-	Comparação entre a curva de especificidade e linearidade do extrato de <i>Morus nigra</i> L. de Pernambuco.....	137
Figura 33-	Gráfico de heterogeneidade das variâncias dos resíduos obtidos no teste de especificidade das amostras de extrato da Paraíba.....	138
Figura 34-	Gráfico de heterogeneidade das variâncias dos resíduos obtidos no teste de especificidade das amostras de extrato de Pernambuco.....	139
Figura 35-	Fluxograma da obtenção de nanopartículas por nanoprecipitação.....	152
Figura 36-	Fluxograma de obtenção das nanopartículas pelo método de dupla emulsificação por evaporação do solvente.....	154
Figura 37-	Gráficos de pareto mostrando a significância das variáveis (A) PDI, (B) tamanho de partícula e (C) potencial zeta.....	170
Figura 38-	Gráfico de superfície das variáveis para as respostas PDI (A e B) e potencial zeta (C).....	171
Figura 39-	Gráficos de pareto dupla emulsificação triagem (A) PDI, (B) tamanho de partícula e (C) potencial zeta.....	178
Figura 40-	Gráfico de superfície das variáveis de triagem por dupla emulsificação para PDI (A, B e C) e Potencial Zeta (D).....	179
Figura 41-	Espectro de infravermelho das substâncias isoladas, misturas ternárias e mistura total.....	179
Figura 42-	Curvas de Tg das substâncias isoladas, misturas binárias e ternárias.....	183
Figura 43-	Nanopartículas obtidas pela nanoprecipitação a partir do planejamento Box-Behnken.....	185
Figura 44-	Gráfico de Pareto planejamento Box-Behnken de nanopartículas por nanoprecipitação.....	189
Figura 45-	Nanopartícula obtida pela função de desejabilidade a partir do planejamento Box-Behnken por nanoprecipitação.....	191
Figura 46-	Nanopartículas obtidas por dupla emulsificação a partir do planejamento Box-Behnken.....	192
Figura 47-	Gráfico de Pareto planejamento Box-Behnken de nanopartículas por dupla emulsificação.....	198
Figura 48-	Gráficos de superfície das interações entre as variáveis independentes para resposta PDI.....	201
Figura 49-	Gráficos de superfície das interações entre as variáveis independentes para resposta tamanho.....	202

Figura 50-	Gráficos de superfície das interações entre as variáveis independentes para resposta eficiência de encapsulação.....	203
Figura 51-	Nanopartícula obtida pela função de desejabilidade a partir do planejamento Box-Benhken por dupla emulsificação.....	204
Figura 52-	Gráfico das variações de diâmetro médio, PDI (A) e potencial zeta (B) da nanopartícula armazenada sob temperatura ambiente.....	206
Figura 52-	Gráfico das variações de diâmetro médio, PDI (A) e potencial zeta (B) da nanopartícula armazenada sob temperatura ambiente.....	206
Figura 54-	Microscopia Eletrônica de Varredura das nanopartículas por dupla emulsificação.....	209
Figura 55-	Microscopia Eletrônica de Varredura das nanopartículas por nanoprecipitação.....	210
Figura 56-	Diâmetro e índice de polidispersão das nanopartículas liofilizados com crioprotetores em diferentes proporções.....	211
Figura 57-	Potencial zeta das nanopartículas liofilizados com crioprotetores em diferentes proporções.....	212
Figura 58-	Espectro de infravermelho das substâncias isoladas da liofilização e das nanopartículas brancas (Np Branca) e nanopartículas contendo o extrato (NpMn).....	214
Figura 59-	Estudo de liberação <i>in vitro</i> das nanopartículas e do extrato de <i>Morus nigra</i> L.....	217
Figura 60-	Estudo de liberação <i>in vitro</i> das nanopartículas liofilizadas e do extrato de <i>Morus nigra</i> L.....	224
Figura 61-	Gráfico de viabilidade celular em HUVEC do extrato e das nanopartículas.....	226

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Condições cromatográficas para identificação do perfil químico por CC.....	86
Quadro 2- Análise fitoquímica das folhas de <i>Morus nigra</i> L.....	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Níveis de desenho experimental para o método de extração do EA Mn.....	86
Tabela 2-	Sistema gradiente utilizado nas análises por CLAE-DAD.....	87
Tabela 3-	Matriz de design experimental e resultados obtidos para o teor dos polifenóis.....	109
Tabela 4-	ANOVA para o teste de falta de ajuste para a isoquercetina, rutina e ácido clorogênico obtidos de <i>Morus nigra</i> L. Pernambuco.....	110
Tabela 5-	ANOVA para o teste de falta de ajuste para a isoquercetina, rutina e ácido clorogênico obtidos de <i>Morus nigra</i> L. Paraíba.....	111
Tabela 6-	Quantificação dos marcadores analíticos em extratos vegetais de <i>Morus nigra</i> L.....	122
Tabela 7-	Diferentes concentrações do reagente carbonato de sódio quanto ao tempo de análise e absorbância média.....	127
Tabela 8-	Análise de variância da linearidade do ácido gálico.....	129
Tabela 9-	Teste de significância do coeficiente angular.....	130
Tabela 10-	Análise de variância da curva analítica do extrato de <i>Morus nigra</i> L. Paraíba.....	132
Tabela 11-	Análise de variância da curva analítica do extrato de <i>Morus nigra</i> L. Pernambuco.....	134
Tabela 12-	Análise estatística do teste de especificidade do extrato da Paraíba.....	138
Tabela 13-	Análise estatística do teste de especificidade do extrato de Pernambuco.....	138
Tabela 14-	Teor de polifenóis totais (PT) obtidos nos testes intra-dia e inter-dia do extrato aquoso de <i>Morus nigra</i> L. da Paraíba.....	140
Tabela 15-	Teor de polifenóis totais (PT) obtidos nos testes intra-dia e inter-dia do extrato aquoso de <i>Morus nigra</i> L. de Pernambuco.....	141
Tabela 16-	Teor de polifenóis totais obtidos no teste de exatidão do extrato da Paraíba e seus respectivos percentuais de recuperação.....	142
Tabela 17-	Teor de polifenóis totais obtidos no teste de exatidão do extrato da Pernambuco e seus respectivos percentuais de recuperação.....	142
Tabela 18-	Médias dos teores fenólicos totais obtidas no teste de robustez do extrato de <i>Morus nigra</i> L da Paraíba.....	143
Tabela 19-	Médias dos teores fenólicos totais obtidas no teste de robustez do extrato de <i>Morus nigra</i> L de Pernambuco.....	143
Tabela 20-	Teor de compostos fenólicos totais (PT) dos extratos de <i>Morus nigra</i> L.....	144
Tabela 21-	Atividade antioxidante dos extratos das folhas de <i>Morus nigra</i> L.....	145
Tabela 22-	Níveis de desenho experimental para o método de obtenção de nanopartículas por nanoprecipitação.....	150
Tabela 23-	Níveis de desenho experimental para o método de obtenção de nanopartículas por nanoprecipitação.....	151
Tabela 24-	Níveis de desenho experimental para o método de obtenção de nanopartículas por dupla emulsificação do solvente.....	153

Tabela 25-	Níveis de desenho experimental para o método de obtenção de nanopartículas por nanoprecipitação com extrato.....	156
Tabela 26-	Níveis de desenho experimental para o método de obtenção de nanopartículas por dupla emulsificação com extrato.....	157
Tabela 27-	Projeto de planejamento fatorial fracionado obtido para seleção de fatores por nanoprecipitação.....	166
Tabela 28-	Resultado da ANOVA modelo quadrático de nanopartículas por nanoprecipitação.....	167
Tabela 29-	Projeto de planejamento fatorial fracionado obtido para seleção de fatores na obtenção por dupla emulsificação.....	173
Tabela 30-	Resultado da ANOVA modelo quadrático de nanopartículas por dupla emulsificação.....	175
Tabela 31-	Matriz de planejamento Box-Behnken e respostas das nanopartículas por nanoprecipitação.....	186
Tabela 32-	Resultado da ANOVA de nanopartículas por nanoprecipitação modelo Box-Behnken.....	188
Tabela 33-	Resultados da otimização do planejamento Box-Behnken por nanoprecipitação.....	191
Tabela 34-	Matriz de planejamento Box-Behnken e respostas das nanopartículas por dupla emulsificação.....	193
Tabela 35-	Resultado da ANOVA de nanopartículas por dupla emulsificação modelo Box-Behnken.....	195
Tabela 36-	Resultados da otimização do planejamento Box-Behnken por dupla emulsificação.....	204
Tabela 37-	Modelos cinéticos obtidos a partir da liberação <i>in vitro</i>	221

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	16
2.	OBJETIVOS	18
2.1	OBJETIVO GERAL.....	18
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
3.	REFERENCIAL TEÓRICO	19
3.1	HIPERTENSÃO ARTERIAL.....	19
3.1.1	Caracterização da doença	19
3.1.1.1	<i>Principais vias moleculares envolvidas na disfunção da pressão arterial</i>	22
3.1.1.1.1	Sistema nervoso simpático.....	22
3.1.1.1.2	Sistema renina angiotensina aldosterona.....	24
3.1.1.1.3	Regulação do óxido nítrico (NO).....	25
3.1.1.1.4	Estresse oxidativo.....	27
3.1.1.1.5	Regulação da homeostase do sódio.....	28
3.1.2	Tratamentos disponíveis	30
3.2	A PLANTA <i>Morus nigra</i> L.....	33
3.2.1	Informação botânica	33
3.2.2	Composição química <i>Morus nigra</i> L	36
3.2.3	Análise farmacológica	40
3.2.3.1	<i>Antioxidante</i>	40
3.2.3.2	<i>Antidiabético</i>	44
3.2.3.3	<i>Anti-hiperlipidêmico</i>	46
3.2.3.4	<i>Atividade anti-inflamatória</i>	47
3.2.3.5	<i>Atividade antimicrobiana</i>	50
3.2.3.6	<i>Atividade anticancerígena</i>	51
3.2.3.7	<i>Atividade anti-hipertensiva</i>	53
3.2.4	Aspectos toxicológicos de <i>Morus nigra</i> L	55
3.2.4.1	<i>Toxicidade aguda e subaguda</i>	55
3.2.4.2	<i>Toxicidade reprodutiva</i>	56
3.2.4.3	<i>Interações entre <i>Morus nigra</i> L. e medicamentos</i>	57
3.2.4.4	<i>Citotoxicidade em linhagem de células in vitro</i>	58

3.2.4.5	<i>Efeito protetor contra substâncias toxigênicas.....</i>	59
3.3	SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS BASEADO EM NANOMATERIAIS.....	61
3.3.1	Nanopartículas poliméricas.....	65
3.3.1.1	<i>Métodos de preparação das nanopartículas.....</i>	67
3.1.1.1.1	Evaporação do solvente.....	67
3.1.1.1.2	Nanoprecitação.....	68
3.1.1.1.3	Emulsificação/Difusão de Solvente.....	69
3.1.1.1.4	Emulsificação/salting-out reverso.....	71
3.3.1.2	<i>Caracterização.....</i>	71
3.3.1.2.1	Morfologia.....	71
3.3.1.2.2	Distribuição de tamanho de partícula.....	72
3.3.1.2.3	Propriedades e estabilidade da superfície.....	74
3.4	ENCAPSULAMENTO DE COMPOSTOS BIOATIVOS.....	74
3.5	ENSAIO DE PRÉ-FORMULAÇÃO E OTIMIZAÇÃO.....	77
4.	MÉTODOS.....	79
5.	RESULTADOS.....	80
5.1	ARTIGO 1- OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE FOLHAS DE <i>Morus nigra</i> L. UTILIZANDO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....	81
5.1.1	Introdução.....	81
5.1.2	Material e métodos.....	82
5.1.3	Resultados e discussão.....	95
5.1.4	Considerações finais.....	146
5.2	ARTIGO 2- DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS PARA INCORPORAÇÃO DO EXTRATO AQUOSO DE <i>Morus nigra</i> L.....	148
5.2.1.	Introdução.....	148
5.2.2.	Material e métodos.....	149
5.2.3	Resultados e discussão.....	162
5.2.4	Considerações finais.....	227
6.	CONCLUSÃO.....	228
7.	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	229

REFERÊNCIAS.....	230
APÊNDICE A - DISTRIBUIÇÃO DE DIÂMETRO.....	262
ANEXO A - PRODUÇÕES.....	263

1. INTRODUÇÃO

A hipertensão é uma doença crônica definida como pressão arterial (PA) sistólica e diastólica igual ou superior a 140/90 mmHg. As doenças cardiovasculares são as principais responsáveis pela morbimortalidade, revelando que a hipertensão ocupa o primeiro lugar na lista da contagem global total de mortes, com 12,8% (Vazquez; Klinger, 2020). A pressão alta pode ser secundária a várias causas tanto ambientais, genéticas, anatômicas, neurais, endócrina, humorais e hemodinâmicas, mas na grande maioria dos pacientes a hipertensão primária geralmente não tem etiologia reconhecida e acomete 95% dos casos. Não sendo tratada, pode levar a hipertrofia cardíaca e eventualmente a um infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral e insuficiência cardíaca. Embora muitas terapias estejam disponíveis para o tratamento da hipertensão as principais classes de medicamentos utilizados para o tratamento de doenças cardiovasculares apresentam inúmeros efeitos colaterais e baixa biodisponibilidade oral, tornando-se necessário a busca por novos agentes terapêuticos (Ferrario *et al.*, 2016; Guyenet, 2006; Mulder *et al.*, 2022).

Os produtos naturais de origem vegetal são utilizados pela humanidade desde tempos imemoriais e são largamente avaliados para melhoria do índice terapêutico em diversas patologias. Nos últimos anos, a espécie de *Morus nigra* L., conhecida como amoreira preta, uma árvore pertencente à família Moraceae, tem sido extensivamente estudada como uma fonte de compostos bioativos naturais com impacto benéfico na saúde, demonstrando efeitos biológicos e fisiológicos incluindo efeitos antimutagênicos, hipoglicêmicos, hipotensores e diuréticos que são amplamente explorados na medicina tradicional. Estudos fitoquímicos relatados por alguns autores confirmam que a folha de *Morus nigra* L. é rica em constituintes fenólicos, principalmente o ácido cafeoilquinóico, ácido clorogênico, ácido ferúlico, isoquercitrina, rutina, kaempferol-3- *O* - (6-malonil) - glucósido e ácido sírico em espécie cultivada no Brasil, com evidências em estudos na medicina chinesa tradicional e científica, que esses compostos de múltiplos alvos podem estar associados as propriedades farmacológicas derivadas da planta no manejo de várias doenças, incluindo a hipertensão (Hao *et al.*, 2022; Zorzi *et al.*, 2020).

Devido suas importantes aplicações medicinais, uma característica importante da espécie é está incluída na Lista de Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse para o Sistema Único de Saúde Brasileiro (RENISUS). Neste relatório está incluído as

principais plantas medicinais que apresentam potencial para gerar produtos farmacêuticos de interesse para saúde pública do Brasil.

Neste contexto, em busca de otimizar e preservar as características destes compostos, surge a exploração de tecnologias inovadoras, como o uso de nanopartículas. Essa abordagem visa superar desafios associados à administração oral de medicamentos, como baixa solubilidade e permeabilidade. E nesse grupo, as nanopartículas poliméricas oferecem estabilidade em fluidos biológicos e no armazenamento, além de propriedades físico-químicas que permitem liberação prolongada e/ou controlada de medicamentos. Elas também melhoram a biodisponibilidade, absorção e acúmulo no local de ação, além de aumentar a estabilidade do ativo e facilitar a produção em larga escala. Assim, a convergência entre a riqueza natural da amoreira preta e as vantagens da nanotecnologia abre novas perspectivas para tratamentos mais eficientes (Laller *et al.*, 2020; Zhang, Weisen *et al.*, 2021).

Tendo em vista tais considerações, este trabalho se propôs a obter um sistema de liberação controlada do extrato aquoso de *Morus nigra* L. a partir da produção de NPs. O estudo também possuiu como pressuposto atribuir um maior valor agregado à planta, de forma a contribuir para a formação de um elo entre pequenos produtores rurais nordestinos e a indústria farmacêutica, que promova o desenvolvimento social e econômico. Para isso, foi realizada uma série de otimizações no planejamento inicial, tanto de formulação, como de processo, visando a obtenção de nanopartículas com melhores propriedades físico-químicas, que apresentem estabilidade e cinética de liberação prolongada.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver nanopartículas a base de extrato das folhas de *Morus nigra* L. como tratamento para hipertensão arterial.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Obter, processar e caracterizar o material vegetal a base de *Morus nigra* L;
- b) Otimizar o método extrativo aquoso da matéria-prima vegetal, a partir de um planejamento fatorial fracionado 3^{3-1} , utilizando como fatores independentes: temperatura de extração, tempo para filtração e proporção droga:solvente;
- c) Quantificar e identificar os marcadores químicos majoritários por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a arranjo de diodos (CLAE-DAD)
- d) Obter e caracterizar físico-quimicamente o extrato seco e fluido a base de *Morus nigra* L.;
- e) Desenvolver e validar a metodologia analítica de quantificação de compostos fenólicos totais por espectrofotometria de absorção na região ultravioleta-visível (UV-VIS);
- f) Realizar estudo de compatibilidade do extrato seco de *Morus nigra* L. e excipientes;
- g) Obter e caracterizar nanopartículas por diferentes métodos que proporcionem a incorporação do extrato de *Morus nigra* L. através de planejamento estatístico;
- h) Proceder as caracterizações físico-químicas e confirmação da formação das nanopartículas;
- i) Avaliar a estabilidade de armazenamento das nanopartículas em diferentes condições de temperatura;
- j) Realizar a liofilização da nanopartícula obtida;
- k) Conduzir ensaios de liberação *in vitro* e perfil cinético das nanopartículas obtidas;
- l) Conduzir ensaio de citotoxicidade *in vitro* de nanopartículas obtidas.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 HIPERTENSÃO ARTERIAL

3.1.1 Caracterização da doença

A Pressão Arterial (PA) é conceituada como o resultado da multiplicação entre o Débito Cardíaco e a Resistência Vascular Periférica. O Débito Cardíaco representa o volume de sangue ejetado pelo coração em relação ao volume que retorna ao coração. Em outras palavras, é a força com que o coração impulsiona o sangue em relação à quantidade recebida pelo coração, expressando a quantidade de sangue que o ventrículo esquerdo (o principal ventrículo cardíaco) bombeia para fora em um minuto. Este parâmetro é uma medida da eficácia com que o coração distribui o sangue para todo o corpo. O cálculo do Débito Cardíaco é realizado multiplicando-se a frequência cardíaca pelo volume sistólico, que é a quantidade de sangue ejetado a cada batimento. A unidade de medida usual é litros por minuto (L/min). Um adequado Débito Cardíaco é essencial para assegurar que todos os órgãos e tecidos do corpo recebam a quantidade apropriada de sangue e oxigênio para desempenhar suas funções de maneira eficiente. Alterações no desempenho cardíaco podem influenciar a Pressão Arterial; por exemplo, um aumento no Débito Cardíaco pode ocasionar um aumento na Pressão Arterial Sistólica (PAS), enquanto uma diminuição no Débito Cardíaco pode resultar em uma redução na PAS. (Mahajan *et al.*, 2020; Mulder *et al.*, 2022).

A resistência vascular periférica refere-se à oposição encontrada pelo sangue ao circular pelos vasos sanguíneos periféricos, como arteríolas, capilares e vênulas, localizados fora do coração. Esta resistência é determinada pelo diâmetro dos vasos sanguíneos e pelas propriedades viscosas do sangue. Quando os vasos estão dilatados, a resistência diminui e o fluxo sanguíneo aumenta; por outro lado, quando os vasos estão contraídos, a resistência aumenta e o fluxo sanguíneo diminui (Oliveira; Nadruz; Mónica, 2022a).

A resistência vascular periférica é um dos principais determinantes da PA. Quando a resistência aumenta, o coração precisa exercer mais força para bombear o sangue através dos vasos, gerado em uma subida da PA. Da mesma forma, quando a resistência diminui, a PA tende a diminuir (Oliveira; Nadruz; Mónica, 2022a).

Assim, quando se multiplica essas duas variáveis, obtém-se o valor da PA; portanto, se o débito cardíaco aumenta, a PA também aumenta, da mesma forma que a

resistência vascular periférica. Portanto, essas duas variáveis são diretamente proporcionais.

PA elevada é definida como PAS \geq 140 mmHg ou pressão arterial diastólica (PAD) \geq 90 mmHg. A medida casual da PA para fins de diagnóstico, é realizada em consultório e/ou fora dele. Além disso, tendo conhecimento de diversos fatores que podem influenciar na medida da pressão, além da medida casual, devem ser considerados para diagnóstico, a monitorização ambulatorial da pressão arterial (MAPA), que se trata de um método que permite o registro indireto e intermitente da PA durante 24 horas ou mais, enquanto o paciente realiza suas atividades habituais durante os períodos de vigília e sono. Outra opção seria a monitorização residencial da pressão arterial (MRPA), uma modalidade de medição realizada com protocolo específico, consistindo na obtenção de três medições pela manhã, antes do desjejum e da tomada dos medicamentos, e três a noite, antes do jantar, durante cinco dias (Bourque; Hiremath, 2022; Vazquez; Klinger, 2020).

Dentre os fatores de riscos para o desenvolvimento da HAS, de acordo com as Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial – 2021 (Markman *et al.*, 2021), destacam-se a genética, idade avançada, sexo, etnia, sobrepeso e/ou obesidade, ingestão elevada de sódio, sedentarismo, ingestão de álcool, além de fatores socioeconômicos, incluindo menor escolaridade, condições de habitação inadequadas e baixa renda família. A pressão alta atinge mais de 30 milhões de brasileiros e mortes aumentam 72% em 10 anos. Em dez anos, quase 300 mil pessoas perderam a vida para a doença, que tem tratamento. Os dados são do Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM) do Ministério da Saúde e levam em conta o que está escrito na declaração de óbito (Bromfield; Muntner, 2013). Especialistas afirmam, porém, que os números podem ser ainda maiores: 600 mil mortes causadas por hipertensão ao longo de uma década (Forouzanfar *et al.*, 2017).

Isso ocorre porque a hipertensão tende a ser mais letal quando afeta órgãos essenciais para o funcionamento do corpo humano, como o coração e o cérebro. Além disso, é o principal fator de risco para doenças cardiovasculares, doenças renais crônicas e morte prematura, estando diretamente associada a casos de infarto e acidente vascular cerebral (AVC). Isso se deve ao fato de o coração ser sobrecarregado, o que resulta no aumento da massa muscular cardíaca e, posteriormente, na dilatação do mesmo. Essas alterações cardíacas podem levar à insuficiência cardíaca. Nas artérias, a pressão arterial elevada danifica a parede, acelerando a formação de depósitos de gordura e causando estreitamento da luz arterial. Como resultado desse estreitamento, o paciente tem maior

probabilidade de desenvolver angina e/ou infarto agudo do miocárdio (Sheikh *et al.*, 2023; Vazquez; Klinger, 2020).

Apenas 10% dos hipertensos apresentam sinais da doença, os sintomas, quando acontecem, geralmente se manifestam quando há um pico de pressão elevada e incluem: dores no peito, fraqueza, tonturas, zumbido no ouvido, visão embaçada, dor de cabeça e sangramento nasal. No Brasil, cerca de 60% dos idosos têm hipertensão. A taxa de mortalidade da população de 60 a 69 anos é de 41,4 óbitos por mil habitantes. Já para a faixa etária de 70 a 79 anos, são 97 óbitos por mil habitantes. Esse número salta para 381,7 na população com 80 anos ou mais. Globalmente, 3,5 bilhões de adultos agora têm níveis de PA sistólica não ideais (ou seja, >110–115 mmHg) e 874 milhões de adultos têm PA sistólica ≥ 140 mmHg. Assim, aproximadamente um em cada quatro adultos tem hipertensão (Kearney *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2017).

A principal característica dos indivíduos hipertensos é a combinação entre o aumento tanto do débito cardíaco quanto da resistência vascular periférica devido sobretudo a um inadequado funcionamento do sistema nervoso simpático na regulação da PA, assim como também há uma desregulação no sistema renina angiotensina-aldosterona que tem como consequência final o aumento da vasoconstrição arterial e, com isso, elevação da PA. O desenvolvimento da hipertensão arterial pode ser influenciado por fatores anatômicos, genéticos, endócrinos, humorais, hemodinâmicos, ambientais e neurais. No entanto, as vias mecánísticas pelas quais a hipertensão essencial se desenvolve ainda não foram totalmente compreendidas. A disfunção vascular, que é caracterizada por disfunção endotelial, inflamação crônica de baixo grau e remodelação estrutural, desempenha um papel crucial nas doenças cardiovasculares, incluindo o surgimento e a perpetuação da hipertensão arterial (Oliveira; Nadruz; Mónica, 2022a).

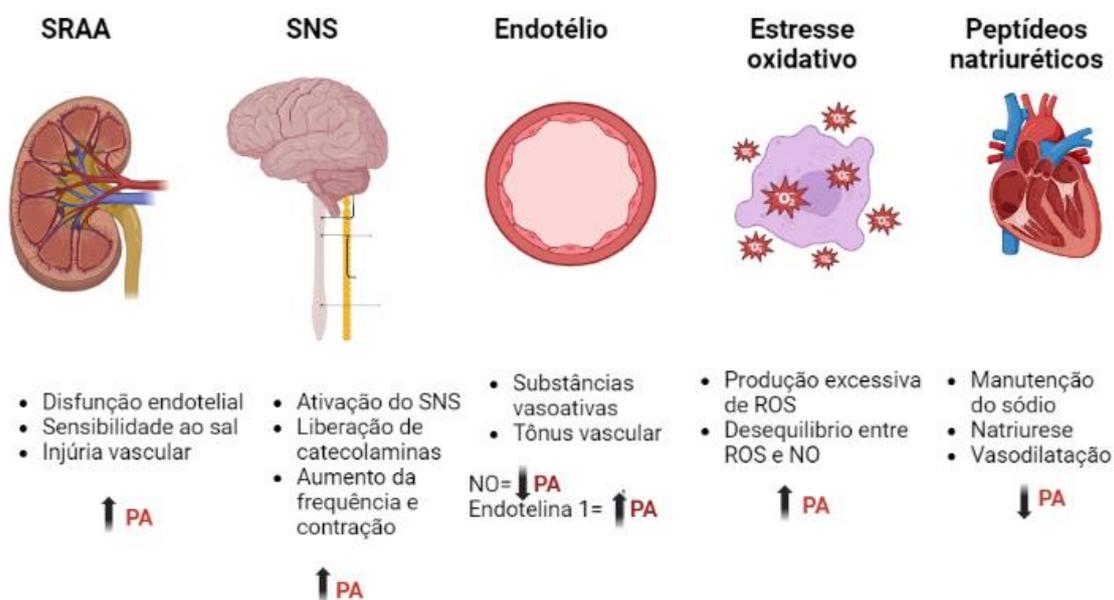
Desta forma, a hipertensão é uma condição de saúde complexa, cujos controles fisiopatológicos são responsáveis por serem multifacetados, e possuem influência do background genético. A hipertensão primária está associada a vários tipos de genes, e algumas variantes alélicas desses genes estão associadas a um maior risco de desenvolver essa condição. É importante notar que quase todos os casos de hipertensão primária têm uma história familiar positiva, o que evidencia a influência da predisposição genética (Oliveira; Nadruz; Mónica, 2022a; Sindler *et al.*, 2011).

Além disso, a manifestação da hipertensão é garantida por fatores ambientais, que também desempenham um papel significativo no desenvolvimento dessa condição. Entre esses fatores ambientais, destacam-se: alta ingestão de sódio (Na⁺), má qualidade do sono

ou apneia do sono, consumo excessivo de álcool e alto estresse mental (Gangwisch, 2014; Sindler *et al.*, 2011).

Assim, a interação complexa entre fatores genéticos e ambientais influencia a progressão da hipertensão. Compreender esses elementos é essencial para o diagnóstico precoce e a aplicação de estratégias eficazes de prevenção e tratamento. Por isso, através da figura 1 podemos observar os principais mecanismos neuroendócrinos que são responsáveis por realizar a regulação da PA e que serão discutidos nos tópicos seguintes.

Figura 1- Os principais sistemas neuroendócrinos envolvidos na regulação da pressão arterial



Legenda: PA: Pressão arterial, SRAA: Sistema renina-angiotensina-aldosterona; SNS: Sistema nervoso simpático, NO= óxido nítrico; ROS: Espécie reativas de oxigênio

Fonte: Autoria própria

3.1.1.1 Principais vias moleculares envolvidas na disfunção da pressão arterial

3.1.1.1.1 Sistema nervoso simpático

Para regulação da PA, existem vários mecanismos, dentre eles os barorreceptores desempenham um papel fundamental no controle da PA no corpo humano. São receptores sensoriais localizados em determinadas áreas do sistema cardiovascular, como a parede das artérias, especialmente nas artérias carótidas e na aorta. Esses barorreceptores são sensíveis às mudanças de PA e têm a capacidade de detectar alterações na distensão

(estiramento) das paredes arteriais. Quando a PA aumenta, as paredes arteriais se esticam mais, e os barorreceptores detectam esse aumento no estiramento. (DeLalio; Sved; Stocker, 2020a; Jan *et al.*, 2021; Lee *et al.*, 2023; Rokosh; Simpson, 2002).

Por outro lado, quando a PA diminui, as paredes arteriais ficam menos esticadas, e os barorreceptores percebem essa redução. Os barorreceptores enviam informações sensitivas ao sistema nervoso central, principalmente para o bulbo carotídeo e o núcleo do trato solitário no cérebro, essas informações são processadas pelo sistema nervoso central, que responde através do sistema nervoso autônomo e quando ativados liberam para regular a PA e manter um equilíbrio adequado (Guyenet, 2006; Rokosh; Simpson, 2002).

Quando os barorreceptores detectam um aumento significativo na PA, eles enviam sinais para diminuir a frequência cardíaca e relaxar os vasos sanguíneos, resultando em uma diminuição da PA. Da mesma forma, se os barorreceptores detectarem uma queda acentuada na PA, eles sinalizam para aumentar a frequência cardíaca e contrair os vasos sanguíneos, levando a um aumento na PA, através da liberação da noradrenalina. Esse mecanismo de feedback neural, controlado pelos barorreceptores, é uma parte essencial do sistema de regulação da PA e é responsável por manter a PA dentro de uma faixa adequada para garantir o suprimento adequado de sangue e oxigênio para os tecidos e órgãos do corpo.

Da mesma forma, a noradrenalina liga-se a receptores alfa-adrenérgicos nas arteríolas renais, que são pequenos vasos sanguíneos responsáveis pelo fluxo sanguíneo para regular nos rins. Ela se liga às células musculares lisas da vasculatura ligando-se a um receptor alfa-1 (proteína Gq); isso causa um aumento do trifosfato de guanosina (GTP) na célula, que ativa a fosfolipase C, criando o inositol trifosfato (IP3). O IP3 sinaliza para a liberação do cálcio armazenado intracelularmente como cálcio livre. Este cálcio livre estimula as proteínas quinases dependentes de cálcio em proteínas quinases ativadas que levam à contração do músculo liso (Grassi; Ram, 2016).

A ativação desses receptores induz à constrição das arteríolas renais, reduzindo o fluxo sanguíneo para os rins. Isso resulta em uma diminuição na filtração glomerular, ou seja, na quantidade de sangue filtrado nos glomérulos dos néfrons, o que contribui para a regulação da PA. Além da vasoconstrição, a noradrenalina também atua nos receptores beta-adrenérgicos presentes nas células do túbulo contornado proximal do néfron. A ativação desses receptores estimula a reabsorção de sódio e água pelos túbulos renais, aumentando a retenção desses elementos no organismo e, conseqüentemente, elevando o

volume sanguíneo. Isso pode resultar em um aumento da PA (Lalio; Sved; Stocker, 2020b).

3.1.1.1.2 Sistema renina angiotensina aldosterona

O sistema renina angiotensina aldosterona também é responsável por regular a PA sistêmica. A renina é uma enzima produzida pelas células justaglomerulares dos rins em resposta a diferentes estímulos, incluindo a diminuição do fluxo sanguíneo nos rins (como durante uma queda da PA) ou uma queda na concentração de sódio nos túbulos renais (Bolívar, 2013; Sheikh *et al.*, 2023). A renina age como uma protease, ou seja, uma enzima que quebra outras proteínas, e tem como alvo principal o angiotensinogênio. O angiotensinogênio é uma proteína produzida pelo fígado e circulante no sangue. A renina age sobre o angiotensinogênio e a cliva, produzindo uma molécula chamada angiotensina I. A angiotensina I é inativa e não tem efeito sobre a PA (Mayet; Hughes, 2003).

A angiotensina I, por si só, não exerce efeito vasorregulador nem controla a pressão arterial (PA). No entanto, é convertida em angiotensina II pela ação da enzima conversora de angiotensina (ECA). Esta enzima está predominantemente presente nos pulmões e tecidos vasculares. A conversão da angiotensina I em angiotensina II ocorre quando a primeira atravessa as células endoteliais dos pulmões ou de outros tecidos que expressam a ECA. A angiotensina II é um potente vasoconstritor e estimula a reabsorção de sódio e água pelos túbulos renais, contribuindo assim para o aumento da PA. Dessa forma, a angiotensina II induz à contração dos vasos sanguíneos, aumentando a resistência vascular periférica (RVP) e, conseqüentemente, a resistência ao fluxo sanguíneo. Esse processo contribui para o aumento da PA sistêmica. Além disso, a angiotensina II atua no hipotálamo para estimular a sede, o que resulta em maior ingestão de água e, por conseguinte, aumento do volume sanguíneo e da PA. Adicionalmente, estimula a liberação de aldosterona pelas glândulas suprarrenais (Abdel Ghafar, 2020; Li *et al.*, 2021; Sosa-Hernández *et al.*, 2018).

A aldosterona é um hormônio esteroide sintetizado e liberado pelas glândulas suprarrenais, situadas acima dos rins. Sua função primordial é regular o equilíbrio de eletrólitos, especialmente o sódio e o potássio, nos néfrons, as unidades funcionais dos rins. A ação da aldosterona é predominantemente observada no túbulo distal e no ducto coletor dos néfrons, onde estimula a reabsorção de sódio e a excreção de potássio. Esse processo resulta em uma maior retenção de sódio e água pelo organismo, promovendo

um aumento no volume sanguíneo circulante e, por conseguinte, elevando a pressão arterial (Ferrario *et al.*, 2016; Powell *et al.*, 2019; Rice *et al.*, 2004).

Em síntese, a renina atua sobre o angiotensinogênio para gerar a angiotensina I, que, por sua vez, é convertida em angiotensina II pela enzima conversora de angiotensina (ECA). A angiotensina II exerce um poderoso efeito vasoconstritor, elevando a pressão arterial e estimulando a liberação de aldosterona. Esta última hormona promove a reabsorção de sódio e água pelos rins, contribuindo para o aumento do volume sanguíneo e, conseqüentemente, da pressão arterial. Esse sistema é vital para a regulação da pressão arterial e do equilíbrio hídrico e eletrolítico no organismo. Assim, se algum desses mecanismos mencionados anteriormente estiver desregulado, a pressão arterial não será mantida e ocorrerá um aumento na mesma.

3.1.1.1.3 Regulação do óxido nítrico (NO)

O óxido nítrico (NO) é um mediador gasoso com efeitos autócrinos, parácrinos e endócrinos. É uma molécula gasosa que atua como um importante transportador químico no organismo. Seu mecanismo de ação está relacionado principalmente ao relaxamento do músculo liso vascular e outras funções celulares. O NO é sintetizado por uma família de enzimas conhecidas como óxido nítrico sintases (NOS) (Friebe; Sandner; Schmidtko, 2020; Russwurm *et al.*, 1998). Existem três isoformas principais de NOS: a NOS endotelial (eNOS) encontrada no endotélio vascular, a NOS induzível (iNOS) geralmente expressa em resposta a estímulos inflamatórios, e a NOS neuronal (nNOS) presente em células nervosas. A produção de NO é estimulada por diferentes fatores, incluindo aumento do cálcio intracelular em resposta a agonistas mediados por receptores ou estresse de cisalhamento nos vasos sanguíneos. O NO é uma molécula gasosa lipofílica que pode se difundir facilmente através das membranas celulares e alcançar as células vizinhas ou distantes de onde foi produzido (Arnold *et al.*, 1977; Marcondes *et al.*, 2006; Tain; Hsu, 2017).

O NO difundido entra nas células do músculo liso vascular e interage com a guanilato ciclase solúvel (sGC), uma enzima que contém um grupo heme. O NO se liga ao grupo heme da sGC e ativa a enzima. A ativação da sGC leva à conversão do trifosfato de guanosina (GTP) em monofosfato de guanosina cíclico (cGMP), que é um segundo envio intracelular. O cGMP desempenha um papel central na sinalização celular e em várias funções regulatórias. O cGMP ativa uma série de vias celulares que resultam no

relaxamento do músculo liso vascular (Bian; Murad, 2014; Dasgupta *et al.*, 2015; Kumar *et al.*, 2019; Wittenborn; Marletta, 2021). Esse relaxamento leva à dilatação dos vasos sanguíneos e à redução da resistência ao fluxo sanguíneo, o que resulta em uma diminuição da PA. A ação do cGMP é temporariamente limitada pela ação de enzimas conhecidas como fosfodiesterases (PDEs), que quebram o cGMP em GMP inativo. A principal PDE induzida na regulação do cGMP é a fosfodiesterase tipo 5 (PDE5).

Em resumo, o óxido nítrico desempenha um papel crucial na regulação da PA e da função cardiovascular por meio da sinalização do cGMP, mas seu desequilíbrio, causado por estresse oxidativo ou outros fatores, pode levar à disfunção vascular e contribuir para doenças cardiovasculares. A regulação do óxido nítrico é um processo complexo e é influenciada por diversos fatores, incluindo a presença de doenças como a hipertensão arterial e o estresse oxidativo. Em algumas condições, como na disfunção endotelial associada à hipertensão, pode haver uma redução na produção de NO, o que pode contribuir para o aumento da PA. Por outro lado, o aumento da produção de NO pode ser benéfico na redução da PA e na prevenção de doenças cardiovasculares. Sendo assim, o óxido nítrico regula a PA principalmente através de suas ações vasodilatadoras, relaxando os vasos sanguíneos e aguardando a resistência vascular, o que ajuda a manter a PA em níveis adequados. (Dowsett *et al.*, 2020; Schulz; Gori; Münzel, 2011)

As células endoteliais também secretam uma variedade de outras substâncias vasorreguladoras, incluindo vasodilatadores como prostaciclina e fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio, e vasoconstritores como endotelina 1 (ET-1), angiotensina II gerada localmente e os prostanóides tromboxano A₂ e prostaglandina A₂. A ET-1 é um potente vasoconstritor que ativa os receptores ET-A no músculo liso vascular. Outras substâncias vasodilatadoras, secretadas por vários tipos de células, como o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina, a adrenomedulina e a substância P, atuam principalmente por meio do aumento da liberação de NO pelas células endoteliais. O hormônio intestinal regulador da glicose peptídeo-1 semelhante ao glucagon (GLP-1) também possui propriedades vasodilatadoras. O equilíbrio entre esses fatores, juntamente com NO e ET-1, determina o efeito final do endotélio sobre o tônus vascular. (de Oliveira; Nadruz; Mónica, 2022b; Kohan; Barton, 2014) Os níveis circulantes de ET-1 não estão consistentemente aumentados na hipertensão, mas há uma tendência de aumento da sensibilidade aos efeitos vasoconstritores e hipertensivos da ET-1 em indivíduos com hipertensão. Os antagonistas do receptor ET-A atenuam ou abolem a hipertensão em uma variedade de modelos experimentais e são eficazes na redução da PA em humanos.

3.1.1.1.4 Estresse oxidativo

Um crescente corpo de evidências mostra que o estresse oxidativo desempenha um papel fundamental na patogênese da hipertensão. A superprodução de espécies reativas deletérias de oxigênio e nitrogênio (ROS e RNS) que sobrecarregam a capacidade antioxidante celular resulta em estresse oxidativo patogênico. Evidências experimentais apoiam que um desequilíbrio de ROS/NO sob estresse oxidativo favorece as reações de oxidação envolvidas nos principais órgãos controlados pela PA, como cérebro, rins, coração e vasos sanguíneos, sustentando o desenvolvimento da hipertensão (Hurr; Young, 2016).

O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO). Tanto ROS quanto RNS (espécies reativas de nitrogênio) são categorizados como radicais livres e espécies reativas não radicais. As ROS incluem radicais livres, como ânion superóxido (O_2^-) e ânion hidroxila (OH^-), bem como espécies não radicais, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2). As principais fontes enzimáticas de superóxido são nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidases, xantina oxidase, ciclooxigenases, lipoxigenases e a cadeia respiratória mitocondrial. Uma das principais fontes de ROS cardiovasculares é uma família de NADPH oxidases não fagocíticas (Nox1, Nox2 e Nox4 em roedores e Nox1, Nox2, Nox4 e Nox5 em humanos). A expressão e a ativação das isoformas Nox são aumentadas na hipertensão e são uma provável causa de estresse oxidativo em células cardiovasculares, renais e imunes em danos a órgãos-alvo associados à hipertensão. Outras fontes enzimáticas de ROS incluem oxidases mitocondriais, xantina oxidase, oxidases reticulares endoplasmáticas e óxido nítrico sintase (NOS) desacoplada. O radical ânion superóxido desencadeia uma cascata de reações que resultam na geração de outros ERO (espécies reativas de oxigênio). RNS incluem o peroxinitrito e seus produtos de reação, como o gás carbônico. O peroxinitrito, formado por altos níveis de NO e superóxido, é responsável por grande parte da citotoxicidade dependente de RNS. (Hurr; Young, 2016; Kuczeriszka; Wąsowicz, 2022; Poznyak *et al.*, 2020; Tain; Hsu, 2022) Esses eventos moleculares induzem a oxidação de proteínas e sinalização celular desregulada, levando à inflamação, proliferação, apoptose, migração e fibrose, que são processos importantes que contribuem para o comprometimento da função vascular, remodelamento

cardiovascular, disfunção renal, ativação de células imunes e excitação do sistema nervoso simpático na hipertensão.

O estresse oxidativo está associado à disfunção e remodelação cardiovascular, renal e do sistema nervoso central, confluente para o desenvolvimento da hipertensão arterial. O aumento de ROS nos vasos sanguíneos leva à vasoconstrição e remodelação vascular, enquanto a redução da biodisponibilidade de NO devido ao desacoplamento da NOS pode causar disfunção endotelial. As ROS podem danificar as células endoteliais que revestem os vasos sanguíneos, produzidas em disfunção endotelial. (Burger *et al.*, 2011; Harvey *et al.*, 2017) Isso reduz a biodisponibilidade do NO, com menos NO disponível, há uma diminuição do relaxamento dos vasos sanguíneos, o que leva a uma maior resistência ao fluxo sanguíneo e, conseqüentemente, ao aumento da PA. Nos rins, o estresse oxidativo está envolvido na patogênese da hipertensão, e no sistema nervoso central, a superexcitação do sistema nervoso simpático contribui para a hipertensão, pois a ROS também pode levar a sua estimulação, responsável por controlar a frequência cardíaca e a força de contração do coração, bem como o tônus vascular. O aumento da atividade simpática pode levar a uma maior vasoconstrição e aumento da PA. Além disso, o estresse oxidativo também pode afetar os hormônios reguladores que afetam a PA.

O corpo possui antioxidantes para neutralizar os efeitos negativos das ROS/RNS. Essa maquinaria antioxidante inclui componentes enzimáticos, como a superóxido dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase (GPx) e glutathione reductase, além de antioxidantes não enzimáticos, como a glutathione (GSH) e vitaminas. O NO funciona fisiologicamente como um neurotransmissor e um vasodilatador. É gerado a partir da conversão de L-arginina em L-citrulina por uma família de enzimas conhecidas como NOS (Geiszt *et al.*, 2000; Kuczeriszka; Wąsowicz, 2022; Schulz; Gori; Münzel, 2011). A presença de altos níveis de dimetilarginina assimétrica (ADMA) inibe a NOS, levando ao desacoplamento das isoenzimas NOS e à produção de peroxinitrito, resultando em redução da biodisponibilidade de NO e aumento do estresse oxidativo. Considerando que ROS e NO funcionam como moduladores da PA, é essencial manter o equilíbrio ROS/NO para um controle adequado da PA. O equilíbrio entre essas espécies pode contribuir para distúrbios cardiovasculares, incluindo a hipertensão arterial.

3.1.1.1.5 Regulação da homeostase do sódio

O sódio (Na^+) desempenha um papel crucial na regulação do volume sanguíneo. Quando a concentração sérica de Na^+ é elevada, ocorre uma retenção de líquidos (água), o que aumenta o volume sanguíneo e, conseqüentemente da PA. Em indivíduos normotensos, um aumento na ingestão dietética de Na^+ resulta em mudanças compensatórias na hemodinâmica para manter uma PA estável. Essas mudanças incluem redução na resistência vascular renal e periférica, além do aumento na produção de óxido nítrico, uma substância vasodilatadora, pelo endotélio (Feng; Dell'Italia; Sanders, 2017; Wilck *et al.*, 2017).

No entanto, se houver perda ou ausência do efeito do óxido nítrico, ocorre um aumento na PA. A disfunção endotelial é um fator de risco para o desenvolvimento da sensibilidade ao sal e, conseqüentemente, hipertensão. A sensibilidade ao sal é caracterizada por uma acentuada na PA, especialmente na sistólica, algumas horas após a ingestão de uma carga de Na^+ de pelo menos 5g (Feng; Dell'Italia; Sanders, 2017; Wilck *et al.*, 2017).

Indivíduos sensíveis ao sal possuem disfunção endotelial subjacente, que pode ser influenciada por fatores genéticos ou ambientais. Em resposta a uma alta carga de sal, esses indivíduos apresentaram uma superprodução do fator de transformação de crescimento β (TGF- β), aumentando o risco de fibrose e estresse oxidativo, e possuem limitação na disponibilidade de óxido nítrico. A ingestão crônica de alto teor de sal pode levar à disfunção endotelial, mesmo em indivíduos resistentes ao sal, e também afeta a microbiota intestinal. Essas alterações na microbiota intestinal deram origem ao aumento da sensibilidade ao sal e ao desenvolvimento da hipertensão (Hurr; Young, 2016).

A alta ingestão de sal também parece induzir a formação de células T helper 17 (TH17), associadas à autoimunidade. Estudos em camundongos causam que a alta ingestão de sal leva à redução de *Lactobacillus murinus* na microbiota intestinal. No entanto, o tratamento com *Lactobacillus murinus* previne a exacerbação da hipertensão sensível ao sal, por meio da modulação das células TH17. Em estudos pilotos em humanos, um desafio moderado com alto teor de sal também apresentou a sobrevivência de *Lactobacillus* spp. na microbiota intestinal, aumentando a atividade das células TH17 e, conseqüentemente, elevando a PA (Feng; Dell'Italia; Sanders, 2017).

Assim, a microbiota intestinal parece desempenhar um papel significativo na sensibilidade ao sal e na patogênese da hipertensão. Investigação adicional nesse campo pode oferecer perspectivas valiosas para a compreensão e abordagem terapêutica dessa condição.

3.1.2 Tratamentos disponíveis

Com o objetivo de reduzir a PA, proteger órgãos-alvo e prevenir doenças cardiovasculares e renais, o tratamento da hipertensão pode envolver tanto abordagens farmacológicas quanto não farmacológicas. O tratamento farmacológico é prescrito pelo médico cardiologista e inclui o uso de medicamentos anti-hipertensivos. As dez principais classes de medicamentos anti-hipertensivos (diuréticos, antagonistas beta-adrenoceptores, antagonistas do cálcio, inibidores da enzima conversora da angiotensina, bloqueadores dos receptores da angiotensina, inibidores diretos da renina, antagonistas dos adrenoceptores alfa-1, agonistas dos adrenoceptores alfa-2 de ação central, vasodilatadores de ação direta, e “outros”).

De modo geral, o tratamento farmacológico para hipertensão inicia-se com medicamentos anti-hipertensivos de primeira escolha, administrados em monoterapia ou combinados. Em pacientes com níveis mais elevados de PA antes do tratamento, a terapia combinada pode ser preferível. Os medicamentos anti-hipertensivos de primeira linha incluem inibidores da ECA, bloqueadores dos receptores da angiotensina II, bloqueadores dos canais de cálcio diidropiridínicos e diuréticos tiazídicos. Além disso, os betabloqueadores são recomendados em casos específicos, como em pacientes com insuficiência cardíaca, redução da secreção de ejeção do ventrículo esquerdo ou após um infarto do miocárdio (Garjón *et al.*, 2020; James *et al.*, 2014; Mancía *et al.*, 2013).

Algumas diretrizes também os consideram medicamentos anti-hipertensivos de primeira linha. A escolha do medicamento deve ser individualizada, levando em conta a eficácia e a tolerabilidade específica de cada paciente. Portanto, a decisão sobre qual fármaco utilizar dependerá da resposta terapêutica de cada indivíduo e de sua capacidade de tolerar o medicamento prescrito. A resposta aos medicamentos anti-hipertensivos pode ser influenciada pela etnia, e em tolerados afrodescendentes, sugeriu-se que os bloqueadores dos canais de cálcio e os diuréticos podem ser a primeira escolha de tratamento (Ettihad *et al.*, 2016).

Em casos clínicos específicos, como hipertensão em mulheres grávidas, outros medicamentos podem ser preferíveis. Por exemplo, a alfa-metildopa, um agonista de alfa-adrenorreceptores que atua no sistema nervoso central, inibindo o sistema nervoso simpático, ou o labetalol, um beta-bloqueador de adrenorreceptores, podem ser opções adequadas. Essa escolha é feita porque alguns medicamentos anti-hipertensivos de

primeira linha, como inibidores da ECA e bloqueadores dos receptores da angiotensina II, são contraindicados devido ao risco aumentado de teratogenicidade fetal (efeitos prejudiciais ao feto em desenvolvimento).

É importante considerar que a dosagem dividida de anti-hipertensivos pode levar a uma diminuição na adesão ao tratamento e, sempre que possível, deve ser evitada. A adesão adequada ao tratamento é fundamental para o controle eficaz da PA e, conseqüentemente, para o gerenciamento da hipertensão de forma segura e eficiente.

Apesar de ser fundamental e extremamente importante, estudos brasileiros mostram que as taxas de adesão ao tratamento farmacológico ainda são baixas. Foram encontradas taxas de adesão variando de 22,5% a 59,0% em diferentes cidades do país. Alguns dos principais motivos relatados pelos pacientes para a não adesão ao tratamento incluem a ausência de sintomas, falta de medicamentos, dificuldade de acesso aos serviços de saúde e efeitos adversos dos medicamentos. A não adesão também se mostrou associada a características como faixa etária mais jovem, indivíduos que trabalham e aqueles com sobrepeso e obesidade (Copur *et al.*, 2023; Gangwisch, 2014; Magnabosco *et al.*, 2015; Yaxley; Thambar, 2015).

Em relação aos efeitos adversos provocados pela terapia medicamentosa, os inibidores da ECA são geralmente bem tolerados, mas reduções na função renal, hipercalemia, tosse e – menos comumente – angioedema (inchaço causado pelo acúmulo de líquido) podem ocorrer com seu uso. O risco de angioedema, que pode ser fatal, é substancialmente aumentado em negros e aumentou modestamente em pacientes tratados com inibidores da dipeptidil peptidase-IV (usados no tratamento do diabetes, exemplos dos quais incluem sitagliptina, vildagliptina, saxagliptina e linagliptina). Já os bloqueadores dos canais de cálcio podem induzir ou piorar a constipação, especialmente em idosos institucionalizados. Todos os bloqueadores dos canais de cálcio inibem modestamente a enzima metabolizadora de drogas citocromo P450 3A4 e, portanto, podem provocar importantes interações medicamentosas.

Enquanto os diuréticos são comuns por causar efeitos adversos relacionados a distúrbios eletrolíticos, sendo a hipocalemia (nível baixo de potássio no sangue) e hiponatremia (nível baixo de sódio no sangue) especialmente importantes. A hipocalemia pode resultar em arritmias cardíacas e fraqueza muscular, enquanto a hiponatremia pode levar a confusão, convulsões e até mesmo coma. Para reduzir o risco de hipocalemia, é recomendado combinar os diuréticos tiazídicos e tiazídicos com suplementos de potássio ou com medicamentos poupadores de potássio, como inibidores da ECA, bloqueadores

dos receptores de angiotensina ou diuréticos poupadores de potássio. Essa combinação ajuda a manter os níveis adequados de aptidão no organismo. É importante destacar que a hiponatremia pode ser um efeito adverso particularmente perigoso, especialmente para pessoas idosas, podendo até mesmo levar a complicações fatais. Portanto, o cuidado com o monitoramento dos níveis de sódio no sangue é essencial para garantir a segurança e eficácia do tratamento com diuréticos, especialmente em pacientes mais idosos (Roush; Holford; Guddati, 2012).

Os beta-bloqueadores não seletivos, como o propranolol, têm sido associados à obstrução brônquica em pacientes com asma devido ao seu efeito nos receptores beta-2 nos brônquios. Além disso, quando combinados com bloqueadores dos canais de cálcio não diidropiridínicos, como o verapamil, pode ocorrer uma potencialização dos efeitos cardiovasculares adversos, como bradicardia e bloqueio cardíaco, devido à ação sinérgica no sistema cardiovascular (Chruscinski *et al.*, 1999; Grassi; Ram, 2016).

Para o tratamento não farmacológico pode ser aplicado como complemento à abordagem medicamentos medidas como controle do peso corporal, prática de exercício físico, cessação do tabagismo e do consumo de álcool, controle do estresse e mudança dos hábitos alimentares. A dieta é altamente recomendada para pessoas com hipertensão e enfatiza o consumo de frutas, hortaliças e laticínios com baixo teor de gordura, além da inclusão de cereais integrais, frango, peixe e oleaginosas, enquanto sugere a redução no consumo de carnes vermelhas e alimentos industrializados. Essa dieta tem comprovação científica na redução da PA e no controle da doença (da Cunha Nascimento *et al.*, 2018).

Além disso, é sugerido o consumo de sal dentro dos níveis recomendados (até 5 g/dia) e maior ingestão de alimentos ricos em ômega-3, fibras e vitamina D como parte do tratamento não medicamentoso da hipertensão. Apesar da importância do tratamento não farmacológico, também enfrenta níveis baixos de adesão por parte dos pacientes. A dieta e a prática de exercício físico são as ações mais difíceis de serem seguidas, reforçando a necessidade de investigar os fatores que dificultam a adesão a essas abordagens terapêuticas a fim de implementar ações para melhorar essa realidade (Batista *et al.*, 2020).

Porém, nos últimos anos, numerosos estudos visaram explorar se a ingestão de polifenóis vegetais ou alimentos ricos em polifenóis são práticas aconselháveis para aliviar a hipertensão. De acordo com a literatura existente, os principais mecanismos anti-hipertensivos dos polifenóis dietéticos estão relacionados com seus antioxidantes, anti-inflamatórios e inibições da atividade da ECA. Esses resultados fornecem uma nova

perspectiva sobre os papéis dos polifenóis na prevenção e tratamento da hipertensão (Rosario *et al.*, 2021; Tjelle *et al.*, 2015).

Sendo assim, novas formulações podem oferecer uma eficácia melhor ou adicional no controle da PA em comparação com os medicamentos existentes. Isso pode levar a um melhor controle da hipertensão, sentindo os riscos associados a complicações cardiovasculares e outras consequências da PA elevada, podem ser desenvolvidas para minimizar os efeitos colaterais que são comuns em alguns medicamentos anti-hipertensivos existentes. Isso pode melhorar a adesão ao tratamento, pois os pacientes tendem a abandonar a terapia quando enfrentam efeitos colaterais incômodos, da mesma forma, que podem ser desenvolvidas com esquemas posológicos mais convenientes, como doses únicas administradas ou menos frequentes, o que pode aumentar a adesão dos pacientes ao tratamento (Godos *et al.*, 2018; Kathuria *et al.*, 2023).

Além disso, essas terapias podem ser adaptadas para atender às necessidades específicas de grupos de pacientes que apresentam diferentes requisitos de tratamento ou que são refratários aos medicamentos existentes. Por exemplo, determinados extratos podem mostrar maior eficácia em populações étnicas específicas ou em pacientes com condições médicas subjacentes particulares. Além disso, a integração de novas descobertas pode complementar a terapia medicamentosa existente, potencializando o controle da hipertensão e proporcionando uma abordagem terapêutica sinérgica e abrangente.

3.2 A PLANTA *Morus nigra* L.

3.2.1 Informação botânica

O gênero *Morus* (Moraceae), comumente conhecida como amoreira, consiste em pelo menos 24 espécies e mais de 100 variedades, distribuídas principalmente na zona temperada norte, que podem crescer em condições climáticas de regiões temperadas a subtropicais, até altitudes de 4000 m (Koyu *et al.*, 2017; Turan *et al.*, 2017). As espécies mais populares compreendem: *Morus alba* (amoreira branca), *Morus australis* (amoreira chinesa), *Morus insignis* (amoreira americana), *Morus mesozygia* (amoreira africana), *Morus microphylla* (amoreira do texas), *Morus nigra* L. (amoreira preta) e *Morus ribra* (amoreira vermelha) (Mallhi; Qadir; Khan, 2018).

Nos países asiáticos as folhas de amoreira são uma importante fonte de nutriente na produção de bichos-de-seda (*Bombyx mori* L), entre os quais China, Índia, Vietnã,

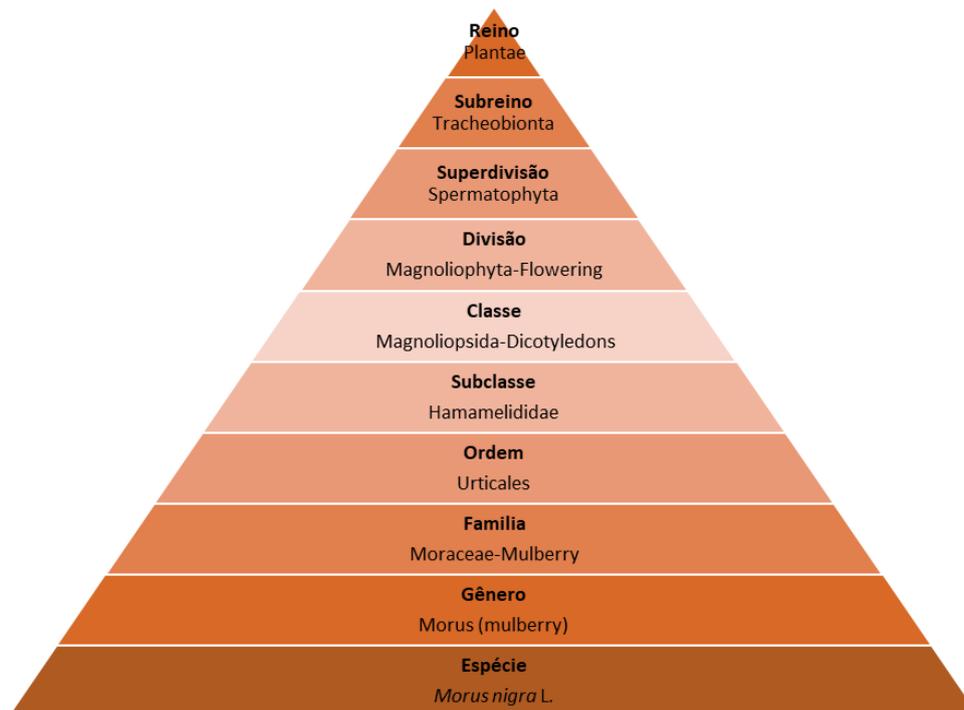
Uzbequistão, Brasil, Tailândia e Bangladesh são os principais líderes na produção. Embora, seus frutos tenham tido maior interesse devido ao seu valor nutricional, são consumidos tanto em formas frescas quanto processadas como sucos, geleia, xaropes, bebidas, corantes naturais ou frutas desidratadas e utilizadas na produção de produtos cosméticos (Sánchez-Salcedo *et al.*, 2016; Vijayan; Saratchandra; Teixeira da Silva, 2011; Xu, Liangjin *et al.*, 2019).

Entre as principais espécies pertencente a este gênero, destaca-se *Morus nigra* L. nativa do sudoeste da Ásia. A planta pode ser encontrada em regiões temperadas e subtropicais da Ásia, África e América do Norte e pode crescer em uma grande variedade de condições climáticas, topográficas e de solo (De Pádua Lúcio *et al.*, 2018). Vários usos na medicina tradicional são descritos para diferentes partes (folhas, caules, raízes) e preparações (infusão, decocção e maceração, entre outras) baseadas nesta planta, por diferentes rotas (orais ou tópicas). Estudos fitoquímicos relatam a presença de constituintes fenólicos, como os principais responsáveis por atividades hepatoprotetoras, hipolipidêmicas, anti-inflamatórias, antioxidantes, antimicrobianas, neuroprotetoras, hipoglicêmicas, hipotensoras e anticancerígena (Dalmagro; Camargo; Zeni, 2017a; Figueredo *et al.*, 2018; Mallhi *et al.*, 2014; Mazimba; Majinda; Motlhanka, 2011; Padilha *et al.*, 2010; Tag, 2015; Zeni *et al.*, 2017).

Morus nigra L., uma árvore conhecida por sua frutificação vigorosa, é nativa da Ásia, especialmente comum na Ásia Menor, mas também aclimatada com sucesso no Brasil, onde pode ser encontrada espontaneamente em praticamente todas as regiões do país (Júnior *et al.*, 2017). A taxonomia do gênero *Morus* continua a ser objeto de intenso debate entre os pesquisadores devido à elevada taxa de hibridização natural entre as espécies. Ao contrário da crença popular, a identificação das espécies de amoreira não é determinada pela cor da fruta, mas sim por características distintas das folhas e do caule (Farahani *et al.*, 2019; Figueredo *et al.*, 2018). Na figura 2, por sua vez é possível observar a taxonomia completa da espécie *Morus nigra* L., mais popularmente conhecida como “amoreira preta”.

A árvore tem casca escamosa de até 8-10 m de diâmetro, caducifólia, monoica, de cor acinzentada e geralmente é podada para uma forma menor, aberta e espalhada. As folhas são ásperas, apresentam de formas diferentes atingindo em média 16 x 18 cm, escuras com pecíolo de 1,5 a 2,5 cm amplamente ovadas, de coloração verde claro, agudas ou acuminadas nas pontas e serrilhada nas margens (Vijayan; Saratchandra; Teixeira da Silva, 2011; Xu, Liangjin *et al.*, 2019).

Figura 2- Classificação taxonômica de *Morus nigra* L.(Mulberry).



As principais características para identificação morfológica incluem estruturas na superfície (escamosa acima e pubescente abaixo), comprimento do pedúnculo (subsésil), com coloração verde escuro na face ventral e coloração verde claro na face dorsal, aparecendo frequentemente em vários lados nos mesmos ramos dos sem lobos. Na figura 3 encontra-se uma ilustração da planta referente.

Figura 3- Folhas e frutos de *Morus nigra* L.



Fonte: Autoria própria (2020)

O fruto da amoreira tem a forma de uma amora, um síncarpo ovóide composto por aquênios, cada um envolto por um cálice suculento. Geralmente, sua cor varia de preto-violeta a preto, com um comprimento de 1 a 2 cm. A polpa carnosa é comestível, com um sabor doce. As flores são pequenas, aparecendo em cachos escamosos de cerca de 1,3 cm. Elas são verdes, pendentes e indefinidas, surgindo crescimento da estação atual e em esporas em madeira mais velha, com floração no final do inverno (Koyu et al., 2017; Zoofishan; Hohmann; Hunyadi, 2018)

3.2.2 Composição química *Morus nigra* L.

Os compostos fenólicos são metabólitos vegetais secundários, que podem ser classificados em diferentes grupos como uma função do número de anéis fenol que eles contêm e com base nos elementos estruturais que ligam esses anéis uns aos outros. Distinções são, portanto, feitas entre os ácidos fenólicos (por exemplo, ácidos hidroxibenzóicos e hidroxicinâmicos), estilbenos, ligninas (neoflavonoides) e flavonoides. (Alseekh *et al.*, 2020; Kumar, 2017).

Os flavonoides são classificados em diversos grupos, tais como flavonóis, antocianinas, flavonol, flavonas e flavononas. Estes compostos consistem em quinze átomos de carbono organizados em um núcleo flavânico (ou esqueleto C6-C3-C6), também conhecido como 2-fenil-benzopirano, formado por dois anéis benzênicos A e B, ligados por um anel pirano heterocíclico C. Podem ser subdivididos com base no padrão de substituição do anel C, incluindo hidroxilação, glicosilação e metilação, sendo que tais modificações frequentemente melhoram suas atividades biológicas, solubilidade e estabilidade durante o armazenamento. Sintetizados no citosol, esses compostos são transportados para os vacúolos das células vegetais, onde sofrem várias modificações químicas. Sua principal função é proteger as plantas contra patógenos, radiação ultravioleta e lesões celulares oxidativas. Além disso, os flavonoides são ingredientes indispensáveis em uma variedade de aplicações nutracêuticas, farmacêuticas, medicinais e cosméticas, atribuídas às suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antimutagênicas, antibacterianas, antifúngicas e anticancerígenas. (Alseekh *et al.*, 2020; Tang, Hongjin *et al.*, 2020).

Já os ácidos fenólicos estão presentes na forma livre ou conjugados com resíduos de açúcar ligados através de grupos hidroxila ou às vezes como ésteres conjugados, seu

esqueleto básico consiste em um anel fenólico e uma função de ácido carboxílico. Com base na estrutura do seu carbono podem ser classificados como ácidos hidroxicinâmicos e ácidos hidroxibenzóicos. Ácidos hidroxicinâmicos com C6-C3 são localizados na parede celular da planta e estão envolvidas em mecanismos de defesa, enquanto os ácidos hidroxibenzóicos têm C6-C1 de configuração com o ácido gálico, vinílico, protocatecuico como compostos principais. Apresentam um amplo espectro de propriedades biológicas e farmacológicas, protegendo contra o estresse oxidativo e doenças associadas, como câncer, doenças inflamatórias, cardiovasculares e neurodegenerativas (Song *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2018).

A extração é um dos passos mais importantes para a purificação e pré-concentração de compostos específicos e desempenha um papel crucial no isolamento e análise qualitativa de compostos fitoquímicos. Sua eficiência depende principalmente da escolha do solvente extrator, já que afinidade molecular entre o composto fitoquímico e o solvente, pode favorecer a solubilidade e conseqüentemente a eficiência da extração. Como exemplo, para compostos como os fenólicos, misturas de metanol, etanol, acetona e água acidificadas ou não, são comumente empregadas devido seu caráter polar, que resulta em uma afinidade com compostos fenólicos em geral (Arvaniti *et al.*, 2019). Em destaque, os flavonoides e os ácidos fenólicos, são os principais grupos pertencentes a classe de metabolitos na espécie *Morus nigra* L. isolados de acordo os dados da literatura, por isso a utilização de solventes polares como etanol e metanol na extração, foram extensivamente explorados pelos autores. No entanto, deve-se ressaltar que o solvente utilizado depende fortemente da polaridade da classe dos compostos a ser extraído.

Considerando o número compostos fenólicos identificados nas folhas de *Morus nigra* a partir dos dados, os flavonoides foram o grupo de maior predominância, dentre eles as formas glicosiladas de quercetina de kaempferol são os compostos mais presentes nos extratos.

O teor total de compostos fenólicos (TPC) e flavonoides (TFC) apresentaram para Radojkovic et al. (Radojković *et al.*, 2016) em torno de 9,94 a 24,27 mg de equivalentes de ácido gálico por g de extrato seco (mg GAE/g) e 4,40 a 29 mg equivalentes de quercetina por g de extrato seco (mg QE/g) respectivamente para o extrato das folhas de amoreira. Os compostos foram isolados através de um processo extrativo de maceração utilizando o álcool etílico como o solvente extrator. Já no estudo de Zeni et al. (Zeni *et al.*, 2017) utilizaram o extrato aquoso pelo método da infusão, obtiveram cerca de $75,86 \pm 0,87$ mg GAE/g de TPC e $79,96 \pm 0,71$ μ g QE/g de TFC.

Resultados semelhantes foram observados por (Dalmagro *et al.*, 2018), no qual a maior concentração de TPC foi observado no verão em torno de 147,22 mg GAE/g, enquanto que para os níveis de TFC na primavera, apresentaram significativamente concentrações maiores 212,50 µg QE/g. Essa variabilidade nas folhas de amora entre o teor fenólico pode ser elucidada, devido diferentes procedimentos de extração e métodos analíticos, mudanças de temperatura, poluição, luz ultravioleta fornecida, estação do ano no momento da colheita, modificados em cada trabalho desenvolvido (Sánchez-Salcedo *et al.*, 2015a).

Para o extrato dos frutos da amora, apresentaram alto teor de TPC que variaram de 6 a 18,66 mg GAE/g e TFC de 16,84 mg QE/g (Sánchez-Salcedo *et al.*, 2015a; Tomas *et al.*, 2015). As antocianinas foram os principais constituintes fitoquímicos presentes nos frutos da amora no estudo de Tomas *et al.* (Tomas *et al.*, 2015), com maior predominância do composto cianidina-3-glicosídeo. Já para Sánchez-Salcedo *et al.* (Sánchez-Salcedo *et al.*, 2015a) derivados do ácido benzoico (ácido protocatecólico, p-ácido hidroxibenzóico e ácido vanílico) foi a principal classe de fenólicos encontrados nos frutos. Os dois estudos citados, utilizaram o mesmo solvente extrator (metanol contendo ácido fórmico a 0,1%) e o mesmo processo de separação e identificação de compostos (HPLC obtidos em uma coluna C18 acoplada a espectrômetro de massas, eluída com fase móvel por gradiente de ácido fórmico: água e ácido fórmico:acetonitrila), por isso as principais diferenças dos constituintes presentes nos frutos estudados dependeram não apenas do processo de extração, mas pode ter sido baseada nas modificações dos autores durante as condições cultivo, como do solo, ambientais, o grau de maturidade na colheita e as diferenças genéticas entre as espécies (Pérez-Gregorio *et al.*, 2011).

A análise preliminar dos compostos fitoquímicos das raízes e caule da amora contém metabolitos secundários suplementares aos encontrados nas folhas e no fruto, como os estilbenos e os benzofuranos. Na raiz a presença de maior constituinte químico pertence a classe do estilbeno (oxiresveratrol) com o percentual de 10%, obtidos através do extrato bruto em acetona (Mascarello *et al.*, 2018). Já no caule, a morusina é o principal prenilflavonoide presente nos extratos (Abdel Bar *et al.*, 2019).

Todos os dados fitoquímicos encontrados na literatura, foram isolados através da utilização de técnicas analíticas modernas como cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) juntamente com a detecção espectrofotométrica, como a detecção de matriz ultravioleta visível (UV-Vis) ou matriz de diodos (DAD) e detecção de massa (MS) em modo de ionização negativa ou positiva. De acordo com os dados da pesquisa a

quantificação dos compostos fenólicos em extrato de folhas, frutos, raízes e caule da amora foram realizadas em maioria, utilizando um sistema HPLC-DAD. As condições cromatográficas dos métodos incluem o uso quase exclusivamente da coluna C18 de fase reversa e um sistema binário de solventes contendo água acidificada com eluentes voláteis como ácido fórmico e um solvente orgânico polar, foram geralmente adicionados contendo metanol e/ou acetonitrila

Devido ao gênero *Morus nigra* L., conter uma variedade de metabólitos secundários, mas principalmente os compostos fenólicos, a maioria das separações são preferencialmente realizadas utilizando uma coluna de fase reversa por HPLC-DAD. Estes compostos, se caracterizam em maioria como polares, por conter pelo menos um anel aromático ligado a um ou mais grupamentos hidroxilas, embora cada classe fenólica tenha características de absorção diferentes, possuem a capacidade absorver luz na região ultravioleta, sendo adequados para serem quantificados por medidas espectrofotométricas (Korzeniowska; Łęska; Paweł, 2020).

A técnica de HPLC fase reversa é crucial e confiável para a caracterização dos compostos, devido a versatilidade, precisão, custo relativamente baixo, curto tempo de preparo da amostra, permitindo várias formas de detecção. Constituída de uma fase estacionária apolar ou fracamente polar e uma fase móvel polar, o fenômeno resulta na intensidade de interações dos compostos apolares com a fase estacionária tornando-as mais retidas, ao mesmo tempo, a fase móvel entra em competição com as moléculas polares do soluto que as mantém em solução por meio de ligações intermoleculares, facilitando sua eluição (Yabré *et al.*, 2018).

Para alcançar a separação adequada dos compostos fenólicos a partir dos extratos de amoreira, a eluição por gradiente de concentração, aumentando o teor do modificador orgânico, foi em grande parte a mais utilizada. Os autores sugeriram que a manutenção do pH entre 2 e 4 nesses processos, impedem a ionização dos compostos presentes. Por isso, a fase móvel deve conter principalmente o ácido fórmico/ácido acético/acetato de amônio e/ou tampões de citrato/ácido fosfórico para atingir as condições ideais de separação e identificação, de acordo com a polaridade dos diferentes compostos (Kumar, 2017; Kumar; Goel, 2019).

3.2.3 Análise farmacológica

Morus nigra L. e seus componentes ativos são fortes candidatos às terapias de várias doenças, visto que as cascas de raízes, galhos, frutos e folhas já são

tradicionalmente utilizados para tratar diversas enfermidades. Embora seja observada uma enorme variabilidade intra-espécie no perfil da composição química, o conteúdo majoritário em flavonoides, ácidos fenólicos, estilbenos, ácidos graxos são os principais responsáveis por pela ampla gama de atividades biológicas relatadas (Sánchez-Salcedo *et al.*, 2015b). Baseados nas propriedades desses compostos bioativos e dos estudos prévios, muitas pesquisas tem se dedicado a estudar a aplicação de *Morus nigra* L. em diversas terapias, tais como antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana, anticancerígena e antidiabética. Algumas atividades incomuns reportadas incluem atividade inibidora de tirosinase, com possível atividade contra melanoma e Parkinson (Koyu *et al.*, 2018), atenuador da discinesia induzida por levodopa em Parkinson, relaxante muscular liso e efeito antiespasmódico (Zoofishan *et al.*, 2019), atividades procinéticas, laxativas e antidiarreicas (Akhlaq *et al.*, 2016) e cosmético clareador (de Freitas *et al.*, 2016).

3.2.3.1 Antioxidante

É sabido que produtos ricos em compostos fenólicos apresentam importante atividade antioxidante. Baseado na cor dos frutos de *Morus nigra*, é de se esperar que estes sejam ricos em antocianinas e flavonóis, o que já têm sido comprovados cientificamente (Ercisli; Orhan, 2007). Suas folhas também já foram relatadas como fonte de elevadas concentrações de biomoléculas com propriedades antioxidantes. Ainda assim, muitos estudos tem se dedicado a dosear tais propriedades por diferentes métodos: poder de redução do íon ferro (FRAP), capacidade de absorção de radicais oxigenados (ORAC), ensaio do complexo de fosfomolibdênio (PMA), capacidade de captura de radicais como o 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) ou o radical 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid (ABTS), e sistema b-caroteno/ácido linoléico.

Um estudo determinou as concentrações de compostos bioativos, além da atividade antioxidante frente ao radical DPPH e a capacidade redutora total dos extratos das folhas de *Morus nigra*. Os resultados obtidos indicaram que as concentrações de flavonoides totais foram de $4,01 \pm 0,16$ mg CAE g^{-1} , sendo a quercetina o de maior concentração, enquanto a concentração de flavonóis totais foram de $2,67 \pm 0,13$ mg QE g^{-1} . Foram doseados também as concentrações de minerais, com predominância de potássio, ferro e magnésio. Já a capacidade redutora total e atividade antioxidante foram de $27,69 \pm 0,46$ mg QE g^{-1} e IC_{50} de $0,94 \pm 0,12$ mg mL^{-1} respectivamente (Schafranski *et al.*, 2022).

Quando se trata dos frutos, Abbasi e colaboradores (Mehmood Abbasi *et al.*, 2016) avaliaram diferentes extratos da fruta de *Morus nigra* quanto à sua composição, mostrando que os aquosos apresentaram teores fenólicos mais alto (85,6 mg GAE/100 g) do que no extrato de acetona (14.2 ± 1.37 mg GAE/100 g), assim como os níveis de flavonoides (95.8mg QE/100g e 21.5mg QE/100g respectivamente) e ácido ascórbico (4,12mg AAE/100g e 88mg AAE/100g respectivamente). Apenas o teor de flavonóis foi superior na acetona (99.8mg QE/100g) do que no aquoso (51,4mg QE/100g). As atividades antioxidantes foram superiores para o extrato de acetona no ensaio de DPPH (93,8%), FRAP (60,3 μ M GAE/100g) e atividade de eliminação de radicais hidroxil (38,8%), enquanto o aquoso foi superior em atividade de eliminação de peróxido de hidrogênio (45,3%), atividade quelante de íons ferroso (34,4%) e no PMA (173 μ M AAE/100g). Já em outro estudo, os pesquisadores avaliaram a composição de polissacarídeos nos frutos e sua contribuição para atividade antioxidante (Wang *et al.*, 2018). Os resultados mostraram que duas frações foram purificadas, onde uma consistia em manose, ramnose, ácido glucurônico, galactose e arabinose, e a outra em ramnose, ácido glucurônico, ácido galacturônico, galactose e arabinose. Os polissacarídeos brutos exibiram melhor poder redutor e efeito protetor de lesão oxidativa em células PC12 induzida por H₂O₂, bem como melhores atividades antioxidantes por DPPH (64,12), ABTS (56,58) e atividade sequestradora de radicais hidroxila (68,15%), do que as frações, mostrando que os polissacarídeos presentes nos frutos de *Morus nigra* L. também poderiam atuar como substâncias antioxidantes.

Sánchez-Salcedo e colaboradores avaliaram o potencial fitoquímico dos extratos das folhas de amoreira preta de diferentes clones cultivados na Espanha. Todos os extratos apresentaram-se ricos em compostos fenólicos, onde foram identificados quatro derivados do ácido cafeoilquinóico e dez flavonóis. As atividades antioxidante, avaliadas por ABTS e DPPH, foram elevadas e próximas entre os diferentes clones testados (Sánchez-Salcedo *et al.*, 2015b). Outro grupo usou diferentes amostras para avaliar o efeito da localização geográfica na composição e atividade antioxidante, porém usando os frutos de amoreira (Khattak; Rhman, 2015). Os resultados revelaram impacto considerável das diferentes localizações nos tipos e níveis dos componentes analisados nos extratos, onde os teores de vitamina C nas amostras variaram de 19,3 a 32,7mg/100g, o conteúdo fenólico entre 558,0 a 1090,7mg de equivalente de ácido gálico (GAE) por 100g, o teor de flavonoides de 63,7 a 244,0 mg/100g, antocianinas de 67,0 a 346,3 mg de equivalente de cianidina 3-glucósido/100 g, e os alcalóides entre 404,0 e 648,3 mg/100g.

A composição mineral dos extratos também foi significativamente diferente, sendo o fósforo, cálcio e potássio os elementos predominantes. A atividade antioxidante medida por DPPH variaram de EC_{50} 46,7 a 458,4 $\mu\text{g/mL}$. Essas variações revelam como as características da região de cultivo influenciam na qualidade das matérias-primas vegetais, inclusive nas atividades antioxidantes que apresentaram diferenças de até dez vezes nas concentrações.

Pesquisa semelhante avaliou a influência da sazonalidade nos fitoconstituintes e na atividade antioxidante do extrato das folhas de *Morus nigra* L. e do seu composto majoritário, o ácido siríntrico (SA) (Dalmagro *et al.*, 2018). Tendências sazonais na produção de fitocompostos foram observadas, sendo a maior concentração de fenólicos totais no verão, flavonoides e carotenóides totais na primavera, e ácido ascórbico no outono, embora a correlação de Pearson tenha revelado uma influência fraca à moderada, sendo a maior influência para o conteúdo de flavonoides. Entre os componentes mais abundantes estavam o ácido siríntrico, a rutina e a quercetina, os quais foram relacionados com a elevada capacidade antioxidante testada, em que nos ensaios de DPPH foi de ~90% em todas as estações, e no teste de co-oxidação β -caroteno/ácido linoléico variou de ~81,47% na primavera e ~84,26% outono, que se correlaciona com a maior produção de carotenóides e ácido ascórbico. Além disso, o extrato na concentração de 3 a 30 $\mu\text{g/mL}$ e o SA de 60 a 250 $\mu\text{g/mL}$ reduziram a mortalidade induzida por H_2O_2 nos ensaios de MTT e LDH, o que mostra que o extrato possui outros compostos que conferem melhor atividade antioxidante que o SA isolado.

Quando comparados os diferentes métodos de obtenção de extratos das folhas de *Morus nigra* L. para avaliação da composição e atividade biológica, o estudo de Radojković e colaboradores (Radojković *et al.*, 2018) mostraram que a extração por ultrassom foi mais eficiente que a extração por maceração e por ultrassom, produzindo extratos mais ricos em termos de concentração de fenólicos totais ($19,7 \pm 2,0\text{mg}$ de GAE.g^{-1} ; $17,7 \pm 4,3\text{mg}$ de GAE.g^{-1} ; e $12,4 \pm 0,9$ mg de GAE.g^{-1} respectivamente), e de capacidade antioxidante, seja por FRAP ($15,3 \pm 1,0\text{mg AA.g}^{-1}$; $12,4 \pm 1,4\text{mg AA.g}^{-1}$; e $7,5 \pm 0,1\text{mg AA.g}^{-1}$ respectivamente), por DPPR-RSA ($18,6 \pm 1,3\text{mg trolox.g}^{-1}$; $11,1 \pm 0,6\text{mg trolox.g}^{-1}$; e $10,9 \pm 0,7\text{mg trolox.g}^{-1}$) ou por ORAC ($186 \pm 15\text{g TE.g}^{-1}$; $106 \pm 9\text{g TE.g}^{-1}$; e $94 \pm 5\text{g TE.g}^{-1}$). Já o perfil fenólico foi semelhante entre os métodos, onde dos 13 compostos identificados, os mais abundantes foram o ácido clorogênico e a rutina.

Um grupo de pesquisa além de determinar o teor de ácidos fenólicos em extrato metanólico das folhas de *Morus nigra* L., também determinou seu potencial na proteção

contra danos ao DNA, e a melhora *in vivo* no comprometimento cognitivo e no estresse oxidativo (Turgut *et al.*, 2016). Foram encontrados majoritariamente os ácidos vanílico (632,093 µg/g) e clorogênico (555,0 µg/g) no extrato, que apresentou proteção eficaz ao DNA contra os danos por efeito de UV e H₂O₂ em concentrações de 0,02 - 0,05 mg/mL. Além disso, ocorreu uma melhora significativa nas disfunções de aprendizagem, aumento da retenção de memória, níveis reduzidos de malondialdehide (MDA) e atividades elevadas de superoxide dismutase (SOD), Glutathione Peroxidase (GSH-px) e catalase (CAT) em camundongos Balb/c tratados com o extrato no regime de 100mg/kg/dia, sugerindo o potencial papel neuroprotetor dos ácidos fenólicos presentes no extrato. Já no estudo realizado por Dalmagro e colaboradores (Dalmagro; Camargo; Zeni, 2017a), foram examinados o perfil fenólico e o efeito antioxidante, neuroprotetor e antidepressivo do extrato aquoso das folhas de *Morus nigra* L.. Os resultados mostraram que seu principal constituinte fenólico foi o ácido siríngico (SA) (80,57%). A administração aguda e subcrônica do extrato e do SA isolado exerceu propriedade comportamentais em camundongos no teste de suspensão de calda (FST) e no teste de nado forçado (TST) semelhante à antidepressivo, envolvendo a modulação do sistema nitro-oxidativo no soro e no cérebro dos ratos. Além disso, foram capazes de conter a morte celular induzida por glutamato nas fatias hipocampal e cortical, demonstrando que o *Morus nigra* L. é neuroprotetor. Isso sugere que o efeito antidepressivo de *Morus nigra* L. pode ser devido à influência do SA, pelo menos em parte, uma vez que apresentava os mesmos efeitos.

Outras atividades protetoras de *Morus nigra* L. atribuídas aos seus componentes antioxidantes, já foram avaliadas em pesquisas. Foi relatada uma genoproteção de linfócitos humanos *in vitro*, onde o extrato dos frutos diminuiu aberração cromossômica e a frequência de micronúcleos induzida pelo agente antitumoral mitomicina C (Yilmaz; Uçar; Göktaş, 2019). Além disso, já foram estudadas atividades citoprotetoras, tais como: efeito gastroprotetor dos extratos metanólicos dos frutos que foi avaliado em camundongos, com redução da área da úlcera em 64,06%, aumento da quantidade de glutathione na mucosa gástrica e pela redução de lipoperóxidos, além de atividade antioxidante evidenciado por DPPH com IC₅₀ 13,74 µg/mL, relacionado aos altos teores de flavonoides detectados, que poderiam reduzir o estresse oxidativo e proteger o sistema gástrico (Nesello *et al.*, 2017); efeito hepatoprotetor do extrato etanólico contra o efeito hepatotóxico do metotrexato (MTX), onde foi demonstrado que o extrato não causou alterações nas enzimas AST, ALT, ALP e LDH, bem como as reduziu significativamente quando estas estavam aumentadas nos ratos tratados com MTX, mostrando também uma

melhora histopatológica do fígado (Tag, 2015); nefro e hepatoprotetor, onde o extrato das folhas promoveu diminuição significativa da glicemia de jejum, creatinina, uréia e ácido úrico e maior nível sérico de albumina em ratos diabéticos, além da avaliação histopatológica do rim e do fígado com menor acúmulo de glicogênio e degeneração gordurosa, devido às propriedades antioxidantes que inibiram os danos nos órgãos (Hassanalilou *et al.*, 2017); proteção dos tecidos testiculares, hepáticos e renais de camundongos com toxicidade induzida por paracetamol, em que o extrato metanólico das folhas suprimiu a genotoxicidade, diminuiu as aberrações cromossômicas nos espermátócitos, as anormalidades morfológicas dos espermatozoides e o dano ao DNA no fígado e tecidos renais, assim como reverteu os níveis alterados de atividade da glutatona, peroxidação lipídica, e normalizou as funções hepáticas e renais, devido aos ácidos fenólicos e flavonoides encontrados que reduzem o estresse oxidativo (Diab, Kawthar A. *et al.*, 2020).

Portanto, as pesquisas mostram que os diferentes extratos de *Morus nigra* L., tanto dos frutos como das folhas, têm apresentado uma potente atividade antioxidante e citoprotetora, as quais estão diretamente relacionadas com os altos níveis de compostos fenólicos, que são a classe das biomoléculas responsáveis por esse efeito e com importante contribuição benéfica para a saúde. Baseada na atividade antioxidante, muitas outras atividades biológicas são avaliadas visando futuras aplicações terapêuticas.

3.2.3.2 Antidiabético

O Diabetes mellitus (DM) é um distúrbio metabólico crônico caracterizado por hiperglicemia e alterações no metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas, que diminui as atividades de enzimas antioxidantes, consequentemente causando danos induzidos pelo estresse oxidativo nas células beta pancreáticas, que prejudica a produção de insulina e manutenção dos níveis glicêmicos. Assim, inibir o dano oxidativo e controlar a hiperglicemia são estratégias interessantes para a prevenção e tratamento do diabetes (Asmat; Abad; Ismail, 2016; Ma *et al.*, 2018). Dessa forma, a composição dos frutos e das folhas de *Morus nigra* L., rica em compostos fenólicos com potencial antioxidante, tem fomentado testes do seu uso como importante fator na modulação do estresse oxidativo nos casos de diabetes, colaborando para melhora dos estados de hiperglicemia e danos secundários causados à outros órgãos como rins e fígado.

Um grupo de pesquisa estudou os frutos e folhas de *Morus nigra* L. quanto à sua composição e atividades antioxidante contra o diabetes (Araujo *et al.*, 2015). O extrato hidroetanólico das folhas apresentou maior conteúdo de polifenóis do que a polpa dos frutos, e maior atividade antioxidante por DPPH. O tratamento de ratos diabéticos com extratos de folhas também foi mais eficaz, causando diminuição das concentrações de AST e ALT (47% e 33% respectivamente), redução de 23% no nível de triglicerídeos e aumento no nível de insulina no soro similar aos animais não doentes. A razão superóxido dismutase (SOD)/catalase (CAT), a atividade de metaloproteinase da matriz (MMP)-2 e os níveis de proteína carbonilada também foram reduzidos, diminuindo o estresse oxidativo no fígado. Um estudo usou material semelhante para investigar as alterações bioquímicas e histopatológicas de ratos diabéticos tratados com extrato hidroalcoólico das folhas (Rahimi-Madiseh *et al.*, 2017). Foi observado grande redução da glicemia, dano glomerular mais leve e redução nos níveis de uréia no grupo tratado com 800 mg/kg do extrato comparado ao controle (metformina).

Eruygur e Dural realizaram um estudo para determinar o teor de compostos ativos e a atividade antioxidante e antidiabética *in vitro* do extrato etanólico das folhas de *Morus nigra* L. (Eruygur; Dural, 2019). Os resultados mostraram alto conteúdo de flavonóides totais (43,6 mg QE/g) e atividade antioxidante por DPPH e ABTS com IC₅₀ 114,94 e 162,44 µg/mL respectivamente. As atividades de inibição da α-glucosidase e α-amilase foi de ~50% na concentração de 2mg/mL, o que podem contribuir no atraso da metabolização de sacarídeos, reduzindo a absorção de glicose e, conseqüentemente, controlando o aumento da glicemia. Em estudo mais recente, Budiman e colaboradores também determinaram a composição e testaram a inibição da α-glucosidase, porem do extrato hidroalcoólico das folhas de *Morus nigra* L. incorporados em pastilhas como forma farmacêutica (Budiman *et al.*, 2020). A triagem fitoquímica realizada determinou a presença de flavonóides, polifenóis, taninos, esteróides. Os resultados dos testes *in vitro* mostraram uma atividade inibidora contra a enzima α-glucosidase com IC₅₀ de 357,6 µg/mL, enquanto que a pastilha contendo 43% de extrato teve IC₅₀ de 549,7 µg/mL.

3.2.3.3 Anti-hiperlipidêmico

A dislipidemia é uma condição caracterizada por status lipídico anormal no sangue, como triglicerídeos (TG), colesterol e/ou fosfolipídios, geralmente ocorrendo com concentrações sanguíneas elevadas de triglicerídeos e colesterol de lipoproteína de

baixa densidade (LDL), e concentrações diminuídas de colesterol de lipoproteína de alta densidade (HDL). Esse estado de hipercolesterolemia juntamente com hipertrigliceridemia são fatores de risco para progressão da aterosclerose e o desenvolvimento de doença cardíaca, que é a principal causa de morte no mundo (Musunuru, 2010). O estresse oxidativo é um evento precoce nessas condições hiperlipidêmicas e existe relatos que os antioxidantes podem interromper o progresso da doença. Portanto, tem crescido o interesse em procurar fitoquímicos na redução do risco de doenças crônicas, visto que a capacidade antioxidante dos compostos fenólicos presentes pode proteger as células dos danos oxidativos causados pelos radicais livres (Kim; Joung; Shin, 2019; Pereira-Roche *et al.*, 2017).

Já foi relatado em estudos *in vivo* que a amora preta possui efeito protetor na prevenção da peroxidação lipídica (LPO) no tecido hepático (Aydin; Yilmaz; Gökçe, 2015). Outro grupo de pesquisa visou explorar os efeitos do extrato etanólico dos frutos de *Morus nigra* em ratos ateroscleróticos experimentais (Jiang *et al.*, 2017). Os animais tratados com 210mg/kg/dia do extrato mostrou níveis significativamente reduzidos de colesterol total, triglicerídeos, LDL e do índice aterogênico, como também reduziu o conteúdo de malondialdeído e aumentou as atividades das enzimas antioxidantes no fígado, todos mantido em valores próximos à normalidade. Quanto ao exame histopatológico, o extrato atenuou a esteatose hepática e reduziu as lesões ateroscleróticas arteriais, suprimindo o desenvolvimento da aterosclerose e regulando o metabolismo lipídico, os quais foram atribuídos às antocianinas (23,75%), polifenóis (2,95%) e flavonóides (0,94%) encontrados.

Um estudo visou avaliar as diferenças no perfil fitoquímico do extrato das folhas de *Morus nigra* L. obtidas por diferentes extrações e seu efeito hipolipidêmico (Zeni *et al.*, 2017). A infusão das folhas apresentou maiores quantidades de fenólicos e flavonóides (83,85 mg/g e 79,96 µg/g, respectivamente), assim como maior atividade antioxidante (83,85% - DPPH) do que a decocção ou extratos hidrometanólicos. Foram encontrados os ácidos fenólicos clorogênico, gálico e cafeico, e os flavonóides quercetina, rutina e catequina nos extratos, sendo o clorogênico o de maior teor em todos os extratos. O extrato obtido por infusão foi selecionado para os ensaios *in vivo*, em que ratos hiperlipidêmicos tratados com 100mg/kg apresentaram redução de colesterol total, LDL e triglicerídeos, normalizaram os níveis de HDL e diminuíram o índice aterogênico e o fator de risco cardíaco de forma comparável ao grupo normal. Além disso, inibiu a peroxidação lipídica no fígado, rim e cérebro.

Para investigar as possíveis vias moleculares em que a *Morus nigra* L. regula o metabolismo lipídico, foram realizados ensaios em porcos que foram suplementados com extratos das folhas em sua alimentação (Fan *et al.*, 2020). A suplementação com ração contendo o extrato reduziu significativamente as concentrações séricas de triglicerídeos e colesterol livre e aumentou a proporção de HDL/LDL, mantendo os níveis normais de glicose sérica e ácidos graxos livres. Houve também redução significativa no tamanho dos adipócitos levando à uma espessura da gordura dorsal mais fina, com consequente aumento da lipase sensível ao hormônio (HSL). Os níveis de leptina e adiponectina em circulação também foram aumentados, o que favorece na perda de gordura.

Assim sendo, as propriedades antioxidantes de *Morus nigra* L. parecem proteger o organismo contra peroxidação lipídica e favorecer a redução de triglicerídeos e LDL, indicando um potencial hipolipidêmico e antiobesidade.

3.2.3.4 Atividade anti-inflamatória

A inflamação é um mecanismo de defesa imunológica que o corpo usa para combater patógenos e substâncias exógenas, que podem agredir o organismo. Nesses processos, uma variedade de mediadores químicos é liberada no tecido danificado, incluindo citocinas e radicais livres, que continuarão a danificar os tecidos se não forem removidas do corpo, causando os sinais clássicos da inflamação: vermelhidão, edema, calor e dor. Um processo inflamatório em níveis celulares e teciduais geram uma série de efeitos com dilatação das vênulas e arteríolas, aumento da permeabilidade vascular, fluxo sanguíneo e leucócitos nos tecidos (Fullerton; Gilroy, 2016; Tasneem *et al.*, 2019). Na resposta inflamatória, leucócitos e mastócitos presentes nas regiões de dano geram mediadores inflamatórios como citocinas, ácido araquidônico e quimiocinas, que liberam espécies reativas de oxigênio (EROs) na área danificada (Biswas, 2016). Em condições normais, há um equilíbrio entre a formação EROs e radicais livres e os mecanismos de defesa antioxidante endógeno. No entanto, quando o equilíbrio é perturbado, esse ambiente inflamatório desencadeia estresse oxidativo e danos celulares, resultando em inúmeras doenças como diabetes, doenças cardiovasculares, câncer, doenças degenerativas, isquemia (Arulselvan *et al.*, 2016; Hussain *et al.*, 2016). Portanto, fontes antioxidantes naturais, tais como produtos ricos em polifenóis, podem ser usadas para profilaxia ou tratamento de diversas condições e patologias.

A avaliação da composição de extratos dos frutos de *Morus nigra* L. mostrou-o como uma boa fonte de fenóis (485mg GAE/100g) e com conteúdo de antocianinas totais de 206,1 mg/100g. Apresentou atividade biológica *in vitro* relevante, sendo antioxidante igual a 32,9 μ mol de Trolox/g (DPPH), 26,1 μ mol de Trolox/g (ABTS) e 21,3 μ mol de Trolox/g (FRAP), e anti-inflamatória com inibição de ciclooxigenase de IC₅₀ 125 μ g/mL (COX₁) e 64 μ g/mL (COX₂) (Negro *et al.*, 2019). Outro estudo foi desenvolvido para investigar e comparar frutos e folhas de *Morus nigra* L. quanto sua atividade cicatrizante e anti-inflamatória *in vivo* (Akkol *et al.*, 2015). O extrato liofilizado de frutas apresentou atividade significativa de cicatrização, aumentando a resistência à tração das feridas em 31% e capacidade de contração da ferida em 59%, enquanto o extrato aquoso de folhas em 23,7% e 24,3% respectivamente. A atividade anti-inflamatória foi observada pela inibição da permeabilidade vascular, onde o extrato das frutas na dose de 200 mg/kg também foi superior, inibindo em 39,0%, enquanto o extrato das folhas de 200 mg/kg em 13,1%.

Outro grupo de pesquisa também avaliou os efeitos anti-inflamatórios dos extratos das folhas pela resistência à tração das feridas e capacidade de contração da ferida, além da medição do edema da pata na inflamação induzida por carragenina em ratos (Zhou *et al.*, 2019). A resistência à tração dos grupos tratados com extrato à 7,5% foi comparável ao grupo de referência, assim como a contração das feridas, que apresentou fechamento completo em 20 dias, e a inibição do edema da pata. Além disso, o MNL mostrou propriedades antioxidantes significativas, por sua capacidade de aumentar os níveis das enzimas SOD, CAT e GSH em 29.97, 25.17 e 31.71 mg/50 mg de tecido respectivamente. O efeito anti-inflamatório do extrato dos frutos foi avaliado em modelos de periodontite em ratos, com o objetivo de diminuir a taxa de perda óssea alveolar (Talo Yildirim *et al.*, 2019). No estudo, o tratamento com o extrato diminuiu os níveis das colagenases MMP-8 e MMP-13 nos tecidos, a reabsorção do osso alveolar e a destruição dos anexos cemento-esmalte e dos ligamentos periodontais.

Quanto às análises de atividades anti-inflamatórias e antinociceptivas, a *Morus nigra* L. foi testada em alguns estudos *in vivo*. Chen e colaboradores mostraram que os frutos apresentaram um teor de flavonoides totais (TF) de 20,9 mg/g, com predominância de antocianinas (Chen *et al.*, 2016). O poder antioxidante medido pela eliminação de radicais OH⁻ foi de ~50% na concentração de 48 μ L de TF, DPPH ~60% à 2.4 μ L de TF e ABTS 97,8% à 20 μ L de TF. Já a atividade anti-inflamatória foi mostrada pela redução do edema de orelha e de pata em camundongos em 60,1% e 8,6% respectivamente, bem

como inibiu as citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IFN- γ , sem diferença quando comparado ao tratamento com dexametasona. Por fim, a antinocicepção foi confirmada pela redução de comportamentos semelhantes à dor (lamber patas) no teste de formalina. Um estudo mais recente do mesmo grupo de pesquisa mostrou que o extrato bruto das frutas apresentou alto conteúdo de antocianinas (11,3 mg/g) e flavonóis (0,7 mg/g) (Chen *et al.*, 2018). No teste *in vitro*, diminuiu a expressão de proteínas pró-inflamatórias, como interleucina-6 (IL-6), óxido nítrico sintase indutível (iNOS), fosfo-p65 (p-p65) e fosfo-I κ B α (p-I κ B α), e aumentou a expressão de interleucina anti-inflamatória (IL-10). Em animais, a atividade antinociceptiva foi confirmada no teste formalina pela redução da duração de dor em ambas as fases (dor neurogênica e dor inflamatória), de forma semelhante à dexametasona, sendo que os flavonóis e antocianinas isolados não apresentaram atividade significativa sozinhos, apenas quando administrados associados.

Quando se trata das folhas, os extratos etanólicos foram testados para tais atividades. O estudo de Ribeiro e colaboradores avaliou o extrato isolado e incorporado em drug delivery systems (DDSs), em lesões de pata de camundongos induzidas por veneno de serpente (Ribeiro *et al.*, 2019). Tanto o extrato, como a rutina e quercetina isoladas foram mais eficientes em reduzir o edema local do que o soro polivalente e a flunixin (anti-inflamatório), com o extrato atuando em trinta minutos, enquanto os flavonoides em 2h. Além disso, o extrato diminuiu o edema de pata causados por serotonina, bradicinina e carragenina, com inibição da migração de leucócito, mostrando que seu mecanismo é anti-inflamatório e não neutralizador de veneno. Também causou diminuição da hipernocicepção mecânica local, com início rápido e duração durante todo o ensaio, enquanto a flunixin durou apenas 5 h. A foi mantida mesmo após a incorporação do extrato em micropartículas ou fibras. Já na pesquisa de Souza *et al.*, foram usados os métodos de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, teste da formalina e placa quente (Souza, GR *et al.*, 2015). No teste de contorções abdominais, o tratamento de camundongos com 400 mg/kg do extrato das folhas reduziu o número de contorções 100%, bem como produziu uma significativa inibição em ambas as fases do teste da formalina, sendo mais pronunciado na fase de dor inflamatória (84%). Porém, não revelou efeito no teste da placa quente, o que sugere que o efeito antinociceptivo pode ser mediado através de mecanismos periféricos.

3.2.3.5 Atividade antimicrobiana

O controle eficiente das doenças infecciosas na era da resistência microbiana emergente exige o desenvolvimento consistente de novos agentes antibióticos com novos modos de ação. Nesse contexto, há muitos anos a atividade das plantas contra micro-organismos tem sido estudada, existindo estudos publicados suficientes baseados nos medicamentos tradicionais à base de plantas de todo o mundo. Vários relatos das propriedades antimicrobianas de extratos, óleos essenciais, resinas e várias classes de compostos isolados de plantas foram publicados. No entanto, a diversidade dos efeitos antimicrobianos é claramente relacionada com a parte da planta usada, assim como o tipo de solvente e de patógeno (Kokoska *et al.*, 2018; Pisoschi *et al.*, 2018; V. Prusov, 2016). Baseada na sua composição, a *Morus nigra* L. tem sido estudada para diversas espécies de micro-organismos como bactérias, fungos e parasitas.

As folhas de *Morus nigra* L. foram testadas em diferentes solventes para avaliação de composição e atividades antibacterianas (Souza *et al.*, 2018). Foi demonstrado que o extrato de acetato de etila (AcOEt) foi o de maior conteúdo de fenólicos totais ($153,00 \pm 11,34$ mg GAE/g) e flavonóides totais ($292,50 \pm 70,34$ mg CE/g), bem como melhor atividade antioxidante com IC_{50} $50,40$ $\mu\text{g/mL}$ para eliminação de DPPH. Também mostrou a melhor atividade entre os extratos, contra metade das oito bactérias testadas, sendo *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Shigella flexneri* e *Staphylococcus aureus*. Um estudo, já citado anteriormente, mostrou que além de anti-inflamatório e antioxidante, o extrato das folhas de *Morus nigra* L. também possui atividade antimicrobiana contra cepas de bactérias Gram-positivas - *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis* (concentração inibitória mínima (MIC) de $31,25$ $\mu\text{g/mL}$), Gram-negativas - *Escherichia coli* (MIC $14,62$ $\mu\text{g/mL}$) e *Proteus vulgaris* (MIC $7,81$ $\mu\text{g/mL}$), e contra duas cepas de fungos - *Candida albicans* e *Candida glabrata* (MIC $31,25$ $\mu\text{g/mL}$), com halo de inibição semelhante aos controles com Anfotericina B e Ciprofloxacino (Zhou *et al.*, 2019).

Um grupo de pesquisa avaliou o efeito antibacteriano do extrato etanólico da casca do caule, fruto e folhas de *Morus nigra* L. (Budiman *et al.*, 2017). Os resultados mostraram que os extratos etanólicos da casca de caule e das frutas tiveram efeito inibitório contra *S. epidermidis* e *P. acnes*, sendo a casca do caule o mais ativo, com valor de MIC 4 mg/mL e 2 mg/mL respectivamente e halo de inibição superior ao controle positivo feito com clindamicina. Além disso, o extrato mais ativo também induziu o vazamento de proteínas e íons nas células bacterianas e causou dano à membrana celular na concentração $4x$ a MIC. Outro estudo que avaliou a atividade do extrato etanólico das

frutas contra os mesmos organismos obteve resultados semelhantes, mostrando uma MIC de 2,5% contra *S. epidermidis* e *P. acnes* e MBC de 2,5% e 5% respectivamente. Em relação à atividade antioxidante, o ensaio por DPPH mostrou IC₅₀ 146,731 mg/mL (Aulifa *et al.*, 2018). As atividades antibacterianas do extrato da fruta contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* também já foram demonstradas (Issa; Abd-Aljabar, 2017).

A *Morus nigra* L. também já foi estudada por sua possível atividade contra o parasita causador da doença de chagas, o *Trypanosoma cruzi*, e seu efeito no processo inflamatório e dano oxidativo na fase crônica da doença (Montenote *et al.*, 2017). Os resultados mostraram que a tintura à 20% das folhas de *Morus nigra* L. possuía conteúdo de polifenol e flavonoides totais de 261,66 µg GAE/mL e 361,83 µg RE/mL respectivamente, e atividade antioxidante pelo método FRAP de 32,09 µM de trolox/g e pelo DPPH com EC₅₀ 72,28 µL/mL. Nos ensaios *in vivo*, verificou-se que o tratamento causou uma redução na parasitemia dos animais quando comparados aos controles, principalmente no grupo que recebeu 25 µL da tintura, mas na fase crônica, a dosagem de 50 µL apresentou melhor atividade em algumas defesas antioxidantes e minimizou o processo inflamatório tecidual. Em relação às concentrações de GSH, o composto fitoterápico induziu a produção de GSH na fase aguda, porém na fase crônica ocorre uma redução, indicando que há uma depleção do sistema de defesa antioxidante envolvendo glutathiona. Assim, os resultados deste estudo corroboram que as folhas de *Morus nigra* L. são uma fonte promissora de compostos naturais que devem ser considerados para estudos futuros como alternativas para o tratamento da doença de Chagas.

3.2.3.6 Atividade anticancerígena

Estudos epidemiológicos revelaram que uma dieta rica em carotenóides e compostos fenólicos está intimamente relacionada com um risco diminuído de vários distúrbios degenerativos, incluindo vários tipos de câncer (Sowmya Shree *et al.*, 2017; Van Poppel; Goldbohm, 1995). Seus efeitos preventivos têm sido associados ao seu potencial antioxidante, que está relacionado à capacidade de proteger células e tecidos de danos oxidativos e atrasar o envelhecimento, desencadeando as propriedades anticancerígenas e pró-apoptóticas. Essas classes de constituintes bioativos presentes da *Morus nigra* L. compreendem moléculas quimioprotetoras com potencial para prevenção e combate ao câncer (Khan *et al.*, 2014; Martí; Roselló; Cebolla-Cornejo, 2016; Mileo; Miccadei, 2015).

Um estudo investigou as propriedades anticancerígenas *in vitro* de extratos etanólicos dos frutos de *Morus nigra* L. em adenocarcinoma da mama (MCF-7). Ambos os extratos (seco e fresco) apresentaram efeito citotóxico e efeito antiproliferativo devido ao índice mitótico diminuído de maneira dependente da dose e do tempo, além de aumento de apoptose e morte celular comprovadas pelas alterações morfológicas e fragmentação de DNA. Porém, o extrato fresco foi melhor em todos os testes (Ahmed A *et al.*, 2016). Outro estudo também investigou os efeitos antiproliferativos e antimigratórios *in vitro* do extrato das frutas de *Morus nigra*, bem como de seus ativos lectina (Morniga G) e Chalcone 4 hydrate, na linhagem celular de adenocarcinoma colorretal HT-29. No ensaio de citotoxicidade, o extrato à 10% e a lectina (50 µM) foram eficazes em reduzir a viabilidade das células em mais de 70%, inclusive com efeito antiproliferativo sinérgico com o cetuximab, mas a chalcona não apresentou efeito. O extrato foi mais eficaz em evitar migração celular (Ht- *et al.*, 2017).

Além do efeito citotóxico em células de adenocarcinoma da próstata humano (PC-3), Turan e colaboradores avaliaram a composição fenólica do extrato dos frutos de *Morus nigra*. O ácido ascórbico e o ácido clorogênico foram os principais compostos fenólicos detectados, e atividade antioxidante moderada foi detectada pelos métodos TPC e FRAP. O extrato exibiu citotoxicidade seletiva contra células PC-3 (IC₅₀ 376,1 µg/mL) em comparação com células de fibroblastos (IC₅₀ 424,9 µg/mL). Também levou à parada do ciclo celular de células PC-3 na fase G1, reduziu o potencial de membrana mitocondrial e reduziu significativamente o número de células viáveis e aumentou o número de células mortas e apoptóticas induzida pelo aumento da atividade da caspase (Turan *et al.*, 2017).

Outro trabalho que também buscou avaliar a composição e a atividade biológica dos extratos das folhas de *Morus nigra* L., obteve seus extratos por diferentes técnicas e testou suas atividades anticâncer nas linhagens celular de rabdmiossarcoma humano (RD), carcinoma do colo uterino humano (Hep2c) e fibroblasto murinho (L2OB). Foi encontrado em sua composição ácidos graxos (> ômega 3 e 6), os quais estão ligados à propriedades anti-inflamatórias e antitrombóticas, carotenóides (> β-caroteno) e compostos fenólicos (> ácido caféico), que possuem ação antioxidante. Elevados efeitos antioxidantes foram confirmados por quatro métodos (DPPH assay, reducing power assay, β-carotene bleaching method and deoxyribose assay), onde o extrato obtido por maceração apresentou-se mais potente que obtido por extração por fluido supercrítico. O macerado também foi o extrato mais citotóxico para todas as células testadas, com IC₅₀ menores que 16µg/mL (Radojković *et al.*, 2016).

Já a pesquisa de Tang e colaboradores foi planejada para avaliar a melhoria no potencial do extrato das folhas de *Morus nigra* L. ao incorporá-lo em nanopartículas de zinco (ZnONPs) e avaliando seu efeito anticâncer. Para isso, a atividade antioxidante (SOD, GSH e CAT) e geração de ROS, viabilidade celular, variações morfológicas apoptóticas, alterações do potencial da membrana mitocondrial (MMP), parada do ciclo celular e status de peroxidação lipídica (TBARS) foram avaliadas *in vitro* em células carcinoma gástrico. A MN-ZnONPs apresentaram atividade citotóxica contra célula estudada (IC₅₀ de 10µg/mL), induziram apoptose por formação melhorada de ROS, além de diminuição do MMP, aumento do estresse oxidativo e parada do ciclo celular, induzindo apoptose. Assim, as MN-ZnONPs demonstraram-se capaz de conter o crescimento de células de sarcoma gástrico (Tang, Qing *et al.*, 2020).

De acordo com esses resultados, fica demonstrado o potencial dos extratos de diferentes partes da *Morus nigra* L. como um promissor candidato para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos baseados em produtos naturais contra diversos tipos de doenças. Contudo, ainda são necessários mais ensaios *in vivo* para confirmação dos efeitos benéficos observados *in vitro*, bem como ensaios quanto à sua toxicidade devem ser realizados para comprovar sua segurança no uso. Além disso, esses dados podem servir como ponto de partida para estudos adicionais com produtos derivados da planta.

3.2.3.7 Atividade anti-hipertensiva

Vários estudos têm investigado os efeitos dos extratos de *Morus nigra* L. na redução da PA em modelos animais e em humanos. Em estudos com animais, PAS, PAD, PA média (PAM) e frequência cardíaca (FC) anormalmente elevadas foram normalizadas pela ingestão de folhas de amoreira (Nade *et al.*, 2013; Naowaboot *et al.*, 2009; Yang; Jhou; Tseng, 2012).

Uma investigação da reatividade vascular revelou que as folhas de amoreira melhoraram as respostas dos vasos sanguíneos aos estimuladores exógenos. A reatividade prejudicada dos vasos sanguíneos, incluindo dilatação diminuída e aumento da constrição, foi significativamente restaurada aos níveis normais após o tratamento prolongado com folhas de amoreira (Naowaboot *et al.*, 2009).

Além disso, as folhas de amoreira reduziram a pressão sanguínea e a frequência cardíaca ao inibir a enzima ECA. Estudos *in vitro* observaram a menor atividade da ECA após as células serem tratadas com extrato de folhas de amoreira com IC₅₀ de 29,8 mg/mL (Yang; Jhou; Tseng, 2012). Uma diminuição na contração vascular em resposta à fenilefrina indicou que as folhas de amoreira bloquearam a via de entrada de cálcio nas células, atuando desta forma, como bloqueadores dos canais de cálcio (Nade *et al.*, 2013). O outro mecanismo possível de ação anti-hipertensiva poderia ser do conteúdo de ácido γ -aminobutírico (GABA) no extrato de folhas de amoreira porque a PA média do grupo de tratamento reduziu com uma tendência semelhante ao grupo que recebeu GABA puro (Yang; Jhou; Tseng, 2012).

O mecanismo da hipertensão causada pelo sistema renina-angiotensina aldosterona (SRAA) é geralmente atribuído ao efeito vasoconstritor direto da angiotensina II (Ang-II) e ao efeito mineralocorticoide da aldosterona (Pei; Kan; Yue, 2021). No estudo de experimentação *in vitro*, a artéria renal esquerda do rato foi ligada para criar um modelo de hipertensão renal, que desencadeou secreção excessiva de renina e ativou o SRAA. Após o tratamento com a fração solúvel de acetato de etila de extratos de metanol de *Morus nigra* L. por seis semanas, melhorando assim a função do endotélio vascular, diminuindo a PA (Nade *et al.*, 2013).

Além disso, ratos diabéticos *in vivo* foram tratados com *Morus nigra* L. na dosagem de 0,25–1,0 g·kg⁻¹ por dia durante 8 semanas. Curiosamente, verificou-se que o tratamento com 0,5 e 1,0 g·kg⁻¹ *Morus nigra* L reduziu a PAS, PAD, PAM e FC para níveis quase normais (Naowaboot *et al.*, 2009). A hipertensão é uma das complicações dos pacientes diabéticos crônico, sendo assim, estudos descobriram que a *Morus nigra* L. pode aliviar a hipertensão em ratos diabéticos (Naowaboot *et al.*, 2009). No entanto, a hipertensão aliviada por *Morus nigra* L. causada por diabetes ainda não está clara.

Em resumo, há evidências científicas de que o uso de extratos de *Morus nigra* L. pode contribuir para a redução da PA em indivíduos com hipertensão. No entanto, mais pesquisas são necessárias para entender melhor os mecanismos envolvidos e a dose ideal de extrato para obter os benefícios anti-hipertensivos.

3.2.4 Aspectos toxicológicos de *Morus nigra* L.

3.2.4.1 Toxicidade aguda e subaguda

Informações estão disponíveis na literatura sobre a toxicidade das diversas partes da *Morus nigra* L. utilizadas na medicina popular. Em algumas regiões do Brasil, é amplamente difundido o uso desta planta para o tratamento de doenças crônicas como diabetes e menopausa, frequentemente havendo substituição do tratamento convencional por chás ou outras formas de preparo de *Morus nigra* L. (Oliveira *et al.*, 2013). Neste cenário, é extremamente necessário a realização de estudos que avaliem a segurança do uso popular de *Morus nigra* L. em diversas condições clínicas.

A toxicidade aguda e subaguda do extrato etanólico das folhas de *Morus nigra* L. (EEMN) foi avaliada em ratos Wistar por Figueredo *et al.* (Figueredo *et al.*, 2018). A administração via oral de uma única dose (2000 mg/kg) de EEMN em fêmeas não induziu sinais de toxicidade ou mortalidade durante o período de observação de 14 dias. Não houve alterações no consumo de alimento, peso corporal ou peso relativo dos órgãos dos animais; e a análise macroscópica do fígado e rins não demonstrou sinais de patologia. Diante desses resultados, o EEMN foi classificado na categoria 5 do OECD 423, sendo considerado de baixa toxicidade e com DL₅₀ estimada acima de 2000 mg/kg.

No estudo de toxicidade subaguda, diferentes doses de EEMN (500, 750 e 1000 mg/kg) foram administradas diariamente por 28 dias em ratos Wistar machos e fêmeas. Após o período de administração do extrato, não foram verificadas alterações significativas de parâmetros hematológicos em relação ao grupo controle, exceto na contagem total de células sanguíneas em fêmeas (1000 mg/kg) e porcentagem de neutrófilos em ambos os gêneros (500 mg/kg). Os níveis de creatinina não foram alterados e houve redução da ureia em machos (1000 mg/kg), inferindo-se que todas as dosagens de EEMN não induziram efeitos nefrotóxicos. Índícios de hepatotoxicidade também não foram verificados e, benéficamente, houve redução dos níveis da aspartato aminotransferase (AST) em machos (750 e 1000 mg/kg) e fêmeas (1000 mg/kg), sugerindo uma atividade hepatoprotetora possivelmente atribuída a quercetina e ácido caféico - compostos fitoquímicos presentes em maior quantidade no extrato (Figueredo *et al.*, 2018).

O tratamento com EEMN não alterou a atividade das enzimas delta-aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D) e superóxido dismutase e não induziu a lipoperoxidação nos tecidos hepáticos e renais. Além disso, houve um aumento da atividade da catalase renal e hepática nas fêmeas (750 mg/kg) e machos (1000 mg/kg), sugerindo que o EEMN não contribuiu para o estresse oxidativo nos tecidos avaliados. Na avaliação dos parâmetros comportamentais, o teste de observação de objetos (RO)

indicou um leve aumento não significativo da memória longa nos animais tratados com EEMN em relação ao grupo controle, sugerindo uma possível atividade neuroprotetora do extrato (Figueredo *et al.*, 2018).

A toxicidade subaguda do chá (extrato aquoso) das folhas de *Morus nigra* L. foi avaliada em ratos Wistar machos na pesquisa realizada por Oliveira et al. (Oliveira *et al.*, 2013). O chá, preparado por decocção (12 g de droga vegetal/100 mL de água), foi administrado (500 mL/dia) por 30 dias. Durante o período de estudo, não foi verificada mortalidade ou sinais de toxicidade nos animais, sendo, portanto, o extrato aquoso considerado de baixa toxicidade. Na avaliação dos parâmetros hematológicos, os animais tratados com o chá exibiram um aumento no número de monócitos e diminuição das plaquetas em relação ao grupo controle. No entanto, as causas e implicações dessas alterações hematológicas não foram discutidas pelos autores do estudo. Por outro lado, parâmetros bioquímicos como glicose, colesterol, triglicerídeos, marcadores da função renal (ácido úrico, ureia e creatinina), hepática (ALT/TGP e AST/TGO) e pancreática (amilase) não mostraram alterações significativas em relação ao grupo controle.

As informações disponíveis sobre a toxicidade de *Morus nigra* L. ainda são limitadas a estudos pré-clínicos, abrangendo apenas extratos aquosos e etanólicos das folhas. Dados sobre a segurança das outras partes desta planta (frutos, cascas e raiz) utilizadas pela medicina popular, sob diversas formas de preparo, ainda são ausentes na literatura.

3.2.4.2 Toxicidade reprodutiva

Como já mencionado, na medicina popular, é comum o uso das folhas de *Morus nigra* L. por mulheres na menopausa como substituto ao tratamento convencional de reposição de estrogênio. Além disso, as folhas são utilizadas para amenizar os sintomas característicos da menopausa, especialmente ondas de calor, e, por mulheres mais jovens, para o alívio dos sintomas de tensão pré-menstrual. Considerando o uso desta planta por mulheres na idade reprodutiva e na menopausa, a pesquisa realizada por (Queiroz *et al.*, 2012) investigou o efeito estrogênico e a toxicidade reprodutiva do extrato hidroetanólico das folhas de *Morus nigra* L. (MnHE) em ratos Wistar fêmeas. Os autores deste estudo partiram do pressuposto que os componentes fitoquímicos, responsáveis pelos diversos efeitos farmacológicos das folhas da *Morus nigra*, podem induzir efeitos colaterais no sistema reprodutivo feminino. Por exemplo, fitoestrógenos e flavonóides que têm efeito

estrogênico podem interferir na síntese dos hormônios ovarianos e no ciclo estral (vaginal ciclicity). Alguns compostos fenólicos e o β -siloesterol - modificadores da expressão gênica e anticarcinogênicos - podem alterar a proliferação celular ou a expressão gênica durante o desenvolvimento e diferenciação do embrião. Por fim, compostos fenólicos com atividade anti-inflamatória podem afetar a produção das prostaglandinas F2- α ou E, que estão envolvidas em processos reprodutivos como ovulação e implantação do blastocisto, respectivamente.

Para avaliação do efeito estrogênico, as fêmeas receberam diferentes doses do MnHE (24-700 mg/kg) por via oral durante 15 dias. Para análise da toxicidade reprodutiva, o tratamento com MnHE foi continuado durante o período de copulação e até o 15º dia de gestação. A função reprodutiva foi avaliada em três estágios: análise citológica vaginal, análise histológica dos ovários e histomorfometria do útero. As doses mais altas do MnHE (350 e 700 mg/kg) não induziram alterações da ciclicidade vaginal e a ovulação foi constatada nos animais tratados na dosagem de 350 mg/kg. Não foram verificadas alterações expressivas da morfologia geral dos ovários e do útero dos animais tratados em relação ao grupo controle, observando-se endométrios espessos – características que sugerem que o MnHE não foi capaz de exercer efeito estrogênico. O índice de implantação, que mede o sucesso de implantação do blastocisto no endométrio, não teve alteração entre os animais tratados e o grupo controle, sugerindo que as condições hormonais necessárias para o desenvolvimento embrionário não foram modificadas. Além disso, não foram verificadas alterações no número, peso corporal ou morfologia externa (patas, face e fechamento do tubo neural) dos fetos, indicando que o MnHE não induziu efeitos embriotóxicos (Queiroz *et al.*, 2012).

3.2.4.3 Interações entre *Morus nigra* L. e medicamentos

Interações medicamento-nutriente são definidas como as alterações da farmacocinética e farmacodinâmica de um fármaco que são induzidas por um ou mais componentes de um alimento, ou, de modo contrário, são as alterações de nutrientes causadas por medicamentos. Essas interações podem melhorar ou inibir a absorção, distribuição, metabolismo e excreção de um medicamento ou alterar o seu efeito terapêutico no organismo. Desta forma, interações medicamento-nutriente podem causar riscos severos à segurança e eficácia da farmacoterapia oral (Koziolek *et al.*, 2019; Zawiah *et al.*, 2020).

Além do uso na medicina popular, os frutos de *Morus nigra* (conhecidos como black mulberry) são comestíveis e têm recebido ampla atenção da indústria de alimentos devido aos seus fitoconstituintes e sabor único (Dincer; Tontul; Topuz, 2016). Na maioria dos países europeus, os frutos de *Morus nigra* L. são utilizados para preparar sucos, geleias, marmeladas, vinhos, vinagres e outros produtos alimentícios (Lim; Choi, 2019). Considerando as diferentes formas de uso da black mulberry, seja como planta medicinal ou como alimento, é importante investigar as interações medicamento-nutriente que podem ser induzidas por este fruto.

O efeito inibitório do suco de black mulberry na atividade da CYP3A – uma importante enzima da família CYP450 envolvida no metabolismo hepático de vários medicamentos – foi investigado por Hyunmi et al. (2006). O potencial de inibição *in vitro* foi medido através da avaliação da reação de 1'-hidroxilação do midazolam (um fármaco substrato da CYP3A) em microsossomos hepáticos humanos. O suco de black mulberry apresentou potente inibição da CYP3A com IC₅₀ de $2,96 \pm 0,33\%$ (v/v, com 20 min de pré-incubação) e $6,22 \pm 0,47\%$ (sem pré-incubação), valores próximos aos obtidos com o suco da toranja (IC₅₀ $0,09 \pm 0,03\%$ e $0,32 \pm 0,11\%$ com e sem pré-incubação, respectivamente) – um conhecido inibidor da CYP3A. Considerando que aproximadamente 30% dos medicamentos utilizados na clínica são metabolizados pela CYP3A, o uso concomitante com os frutos de *Morus nigra* pode induzir alterações na farmacocinética desses medicamentos (Hyunmi *et al.*, 2006; Lim; Choi, 2019). Entretanto, a inibição da atividade enzimática da CYP3A *in vitro* não é confirmativo que o mesmo processo ocorre *in vivo*. Portanto, estudos pré-clínicos e clínicos ainda são necessários para avaliar a relevância clínica da inibição desta via metabólica pelos frutos de *Morus nigra* L.

3.2.4.4. Citotoxicidade em linhagem de células *in vitro*

Ensaio de proliferação e citotoxicidade em linhagens de células *in vitro* são aplicados para avaliar a resposta celular frente a um fármaco ou qualquer outro agente terapêutico. Atualmente, esses testes são muito utilizados pela indústria farmacêutica como uma ferramenta de screening de fármacos antitumorais, através da determinação do potencial citotóxico de uma molécula contra linhagens tumorais específicas (Adan; Kiraz; Baran, 2016). Esses ensaios também são muito úteis nos estudos de toxicologia *in vitro*,

permitindo a avaliação da citotoxicidade de um agente terapêutico frente as linhagens de células fisiologicamente relevantes. Por exemplo, linhagens de hepatócitos humanos (e.g., primary human hepatocytes cell lines) são utilizadas para investigar o potencial hepatotóxico de fármacos durante o estágio inicial do desenvolvimento de medicamentos (Donato; Tolosa, 2019).

Pesquisas baseadas no uso popular constataram que a *Morus nigra* L. atua na inibição da produção de melanina, podendo ter aplicações dermocosméticas como agente despigmentante. Considerando este potencial, a pesquisa de Freitas et al. (de Freitas et al., 2016) investigou a citotoxicidade do extrato etanólico das folhas de *Morus nigra* em três linhagens de células constituintes da pele: queratinócitos humanos (HaCat), fibroblastos de ratos (L-929) e melanoma de roedores/murine (B16F10). Após tratamento com o extrato (0,98 – 2000 µg/mL), a morte celular foi avaliada através do ensaio de biorredução do sal de tetrazólio WST-8. O extrato, na concentração de 7,81 µg/mL (IC50 de inibição da tirosinase - enzima chave da melanogênese), não resultou em morte celular nas linhagens testadas. Os valores de IC50 de citotoxicidade foram calculados em 107,2 µg/mL para os melanomas, 324,2 µg/mL para os queratinócitos e 116,3 µg/mL para os fibroblastos – concentrações que exibiram inibição da tirosinase superior a 90%. Esses resultados são indicativos que o extrato das folhas de *Morus nigra* L. pode ser incorporado em formulações de uso tópico para tratar condições de hiperpigmentação da pele.

3.2.4.5 Efeito protetor contra substâncias toxigênicas

Dentre as diversas formas de uso de *Morus nigra* L. pela medicina popular, a utilização como agente protetor contra substâncias tóxicas tem recebido grande atenção dos cientistas. Por exemplo, uma pesquisa baseada no uso popular constatou o efeito protetor das folhas desta planta contra a inflamação e dor induzida pelo veneno da cobra *Bothrops jararacuçu* (Ribeiro et al., 2019). Além disso, na nossa pesquisa de literatura, encontramos estudos pré-clínicos que avaliaram o efeito protetor de *Morus nigra* L. contra a toxicidade induzida por medicamentos, pesticidas e radiação ionizante, os quais serão discutidos neste tópico.

O extrato aquoso das folhas de *Morus nigra* L. foi testado para reverter o quadro de intoxicação induzida por clorpirifós (CPF) – um pesticida organofosforado potencialmente neurotóxico – em ratos albino machos (SEUFI et al., 2019). A administração oral de CPF-etil (13,50 mg/kg – concentração de LD50) causou alterações

significativas em vários parâmetros hematológicos, incluindo redução da hemoglobina, hematócrito, contagem total de eritrócitos (RBC) e leucócitos (WBC), e aumento das plaquetas. Alterações metabólicas como redução dos níveis séricos de glicose, colesterol total e triglicerídeos também foram verificadas. Índícios de lipoperoxidação, estresse oxidativo, dano celular e neurotoxicidade foram detectados através do aumento nos níveis de malondialdeído (MDA), redução da capacidade antioxidante total, aumento da atividade da lactase desidrogenase (LDH) e redução da atividade da acetilcolinesterase (AChE), respectivamente. Entretanto, a administração oral do extrato de *Morus nigra* (0,15-0,40 g/kg) em conjunto com o CPF-etil (13,50 mg/kg) foi capaz de antagonizar as alterações hematológicas, bioquímicas e enzimáticas supracitadas. Os autores sugeriram que as folhas da *Morus nigra* L. têm atividade protetora em quadros de intoxicação por compostos organofosforados devido ao excelente potencial antioxidante dos seus fitoconstituíntes, especialmente seus compostos fenólicos (Seufi *et al.*, 2019).

Em outra pesquisa, os frutos de *Morus nigra* L. foram investigados quanto ao potencial protetor contra os efeitos deletérios da radioterapia clínica (Ghasemnezhad Targhi *et al.*, 2017). A radiação ionizante provoca danos teciduais severos devido a ação de espécies reativas de oxigênio, que são geradas pela radiólise da água celular. Neste contexto, é crescente a procura por compostos potencialmente antioxidantes, de origem sintética ou natural, que sejam eficientes na redução do estresse oxidativo induzido pela radiação. Considerando a abundância em antocianinas e outros compostos fenólicos antioxidantes, o extrato aquoso dos frutos da *Morus nigra* L. (200 mg/kg) foi administrado em ratos Wistar machos 3 dias antes e 3 dias após exposição à radiação 3 Gy e 6 Gy. Foi constatado que o extrato conseguiu reduzir a genotoxicidade e citotoxicidade em células da medula óssea, conforme verificado pela redução do número de micronúcleos (eritrócitos micronucleados policromáticos e normocromáticos) em relação ao controle positivo. Além disso, o extrato foi capaz de inibir a lipoperoxidação e estresse oxidativo no fígado dos animais. Diante dos resultados, os fitoconstituíntes dos frutos da *Morus nigra* L. podem ter efeito protetor contra os danos teciduais induzidos pela radiação ionizante.

Diab *et al.* (Diab, Kawthar A *et al.*, 2020) avaliou o efeito protetor do extrato metanólico das folhas de *Morus nigra* L. contra os danos induzidos pelo paracetamol (N-acetil-p-aminofenol) no fígado, medula óssea e testículos de ratos Swiss machos. Este medicamento é muito utilizado como analgésico e antipirético no mundo inteiro, no entanto a overdose (> 4000 mg/dia) induz a necrose hepática e falência renal em humanos

e animais. Neste estudo, os animais receberam paracetamol (500 mg/kg) em combinação ou não com o extrato de *Morus nigra* L. (150, 300 e 500 mg/kg) por 4 dias. O tratamento com o extrato reduziu os danos ao DNA nos tecidos hepático e renal, além de diminuir o número de espermatozóides com anormalidades cromossômicas e morfológicas – inferindo-se um papel protetor da *Morus nigra* L. contra a genotoxicidade induzida pelo paracetamol nos tecidos avaliados. Também foi verificado que o extrato conseguiu suprimir o estresse oxidativo, através da redução dos níveis de MDA e aumento da glutathione S transferase, e também melhorou a função hepática e renal dos animais. A administração do extrato também ajudou na restauração da histoarquitetura dos tecidos lesados (fígado e rins) e diminuiu a expressão da proteína p53 (marcador da carcinogênese) no fígado, rins e testículos. Os autores sugeriram que os efeitos nefro- e hepatoprotetores promovidos pela *Morus nigra* L. provavelmente deve-se a supressão da inflamação e do estresse oxidativo verificados na intoxicação pelo paracetamol.

3.3 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS BASEADO EM NANOMATERIAIS

“Nano” faixa de tamanho ideal oferecida pela nanotecnologia refere-se a um milionésimo de uma unidade específica, portanto, são sistemas que variam entre 1 e 1000 nm. (Hami, 2021; Hossen *et al.*, 2019-) Invenção mais recente da nanotecnologia em ciência biomédica e farmacêutica resulta em melhoria vantajosa bem sucedida por meio de sistemas de liberação de fármacos, para várias doenças. Esta tecnologia permite a entrega de fármacos que são pouco solúveis em água, aumenta biodisponibilidade oral, aumento da permanência no sangue, aumento penetração tecidual e efeitos colaterais minimizados com ação dos tecidos alvo. O objetivo geral desse tipo de formulação é permitir a introdução de princípios ativos no corpo, a fim de melhorar não apenas sua eficácia, mas também sua segurança, controlando a quantidade, o tempo e a liberação do medicamento no local de ação, atravessando as membranas biológicas para chegar ao alvo terapêutico. (Laller *et al.*, 2020; Saleh *et al.*, 2021; Vyas; Rathod; Patel, 2023)

A potencial toxicidade inerente aos princípios ativos ou à alta dosagem necessária para alcançar o efeito farmacológico, é uma desvantagem comum apresentada pelas vias de administração sistêmica. A via oral de administração, por exemplo, limita o uso de fármacos com pH resistente ou altamente hidrofílicos para garantir a absorção necessária pelas células do epitélio intestinal. Da mesma forma, a natureza invasiva das injeções foi

associada a um alto risco de infecção, para minimizar os riscos e desvantagens associados às vias tradicionais de administração, os sistemas de liberação de fármacos estão se tornando cada vez mais sofisticados (Nile *et al.*, 2020a; Vyas; Rathod; Patel, 2023).

O pequeno tamanho e alta área de superfície dos nanomateriais permitem que eles entrem nas células e interajam com biomoléculas facilmente, da mesma forma que podem proteger fármacos encapsulados da degradação *in vivo*. Por outro lado, o efeito de primeira passagem pode ser prevenido pelo uso de sistemas de entrega de fármacos em nanoescala, especialmente no caso de fármacos insolúveis em água (Jeevahan; Chandrasekaran, 2019).

A formulação da nanocarreadora a ser escolhida para incorporação de fármacos depende de vários fatores, incluindo as propriedades físico-químicas do fármaco (solubilidade, permeabilidade, estabilidade) a ser encapsulada, o tipo de nanocarreador que melhor se adapta às características dos fármacos e às necessidades terapêuticas, a rota de administração, o tamanho e a estabilidade do nanocarreador, além da facilidade de produção em escala comercial. Isso se deve, pois nanocarreadores podem ser formulados com diferentes materiais, tais como lipídios, proteínas e metais, que influenciam nas propriedades físico-químicas, como a solubilidade, estabilidade, biodisponibilidade e capacidade de direcionamento para o alvo. A escolha do tipo de material a ser utilizado na formulação depende das características do fármaco, da rota de administração e da injeção terapêutica (Nile *et al.*, 2020b; Rad *et al.*, 2019).

Nanopartículas, como as partículas na faixa nanométrica, têm mostrado grandes promessas em uma ampla gama de aplicações cardiovasculares. As nanopartículas são móveis em sistemas intra e extravasculares, tornando-as ideais para o alvo entrega de agentes terapêuticos. Eles têm mostrado um potencial significativo para fornecer uma plataforma para entrega direcionada de fármacos, devido a várias vantagens que apresentam, como excelentes propriedades de direcionamento, biodegradabilidade, biocompatibilidade e alta capacidade de encapsulação de fármacos (Banik; Fattahi; Brown, 2016; Belwal *et al.*, 2018; Laller *et al.*, 2020; Nile *et al.*, 2020c).

O objetivo central da nanoterapia para o tratamento da hipertensão é aumentar a eficácia e minimizar os efeitos colaterais causados por medicamentos administrados livremente, pois podem ser direcionadas para os tecidos específicos onde a hipertensão é mais prevalente, aumentando a eficácia e diminuindo os efeitos adversos, sendo assim, são projetadas para liberar o medicamento de forma controlada e gradual, o que pode ajudar a manter níveis terapêuticos constantes no corpo do paciente.

Desta forma, sistemas nanoparticulados poliméricos a partir de polímeros biodegradáveis e biocompatíveis são opções atraentes para administração controlada de fármacos e direcionamento de fármacos e vem sendo extensivamente estudadas. O fármaco é dissolvido, aprisionado, encapsulado ou ligado a uma matriz de nanopartículas e vários polímeros têm sido usados na pesquisa de entrega de anti-hipertensivos orais incluindo polilactídeo-coglicólido (PLGA), policaprolactona (PCL), Eudragit RL/RS, hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) e quitosana, pois podem efetivamente entregar o fármaco a um local alvo e, assim, aumentar o benefício terapêutico, minimizando os efeitos colaterais. (Alam *et al.*, 2017; Nesello *et al.*, 2017).

Entre estes polímeros, resinas de polimetacrilato, como Eudragit RL100, têm sido utilizadas como revestimentos de película ou transportadores inertes para formular sistemas orais de liberação controlada.

Eudragit RL, também conhecido como Eudragit Retard L (Evonik Degussa India Pvt. Ltd., Mumbai, Índia), é um copolímero de poli (acrilato de etila, metilmetacrilato e metacrilato de cloro trimetil-amônio etílico) contendo uma quantidade de quaternário grupos de amônio entre 8,8% e 12% (Pignatello *et al.*, 2001). A proporção molar destes grupos de amônio para os restantes ésteres neutros do ácido (met)acrílico é de 1:20 com Eudragit RL. O peso molecular médio é de aproximadamente 15 000. A letra RL refere-se à letra inicial da palavra alemã leichtdurchlassing (livremente permeável). Sua gravidade específica, ponto de fusão e temperatura de transição vítrea são: 1,17–1,20, 225°C e 105°C, respectivamente (Parashar; Ramrakhiani; Datt, 1999; Rongthong *et al.*, 2020).

É insolúvel em valores fisiológicos de pH e capaz de intumescer limitado, representando assim um bom material para dispersão de fármacos. Sua carga positiva pode permitir um maior tempo de residência das NPs no local administrado, pois sua carga confere ao polímero interação com drogas aniônicas e mucina. A presença do grupo carboxila permite que interações químicas e/ou físicas (adutos zwitteriônicos, pares de íons) ocorram com o grupo amônio dos polímeros RL em dispersões sólidas (Rongthong *et al.*, 2020). Desta forma, sua utilização para incorporação de compostos fenólicos totais pode ser útil, visto que compostos fenólicos que possuem grupos carboxila (-COOH) podem formar adutos zwitteriônicos com o Eudragit RL 100, que contém grupos amônio quaternário. Adutos zwitteriônicos resultam da interação entre um íon positivo (amônio quaternário) e um íon negativo (carboxila). Além das interações iônicas, as interações hidrofóbicas também podem desempenhar um papel. As partes não polares dos

compostos fenólicos e do polímero podem interagir de maneira favorável, promovendo a miscibilidade e a formação de sistemas estáveis (Patra *et al.*, 2017).

Apesar de serem insolúveis em água, mas devido à presença de grupos amina quaternários, as nanoformulações com esse polímero apresentam certo inchaço e permeabilidade, permitindo que a água penetre lentamente. É importante ressaltar que o intumescimento do Eudragit® RL é independente do pH, mas pode ser fortemente afetado pelos tipos e concentrações de íons no ambiente circundante (Das; Suresh; Desmukh, 2010; Katara; Majumdar, 2013b)

Eudragit RL 100 é utilizado para revestir cristais, grânulos arredondados, microcomprimidos e pellets. Também é usado para granulação como primeiro estágio na construção de estruturas de matriz, particularmente com medicamentos livremente solúveis. Atua como formador de filme ou agente de ligação para peletização de medicamentos. O Eudragit, como material polimérico seguro e não tóxico, é fácil de ser absorvido por administração oral. Uma ampla revisão da literatura sobre o Eudragit RL 100 revelou que ele é usado para abordagens de liberação controlada e melhoria da biodisponibilidade em várias formas farmacêuticas, como nanopartículas, comprimidos, filmes bucais, adesivos transdérmicos, inserções oftálmicas, etc. Singh; Pai, (2016). prepararam nanopartículas de atazanavir carregadas com Eudragit RL 100 para melhorar a biodisponibilidade oral. Estas nanopartículas foram preparadas pelo método de nanoprecipitação. As nanopartículas baseadas em Eudragit L100 mostraram potencial de biodisponibilidade melhorado. Ofokansi; Kenekwukwu, (2013) prepararam comprimidos de ibuprofeno a partir de complexos interpolieletrólitos (IPECs), formados entre Eudragit RL100 e quitosana, por método não estequiométrico, e comprimidos baseados no complexo acima, por método de granulação úmida. O complexo foi capaz de impedir a liberação do medicamento no estômago e no intestino delgado e ajudou na administração específica do medicamento ao cólon. Palem *et al.*, (2013) prepararam filmes bucais extrudados por fusão a quente (HME) de domperidona (DOM) usando a combinação de HPMC E5 LV ou Eudragit RL100 como transportadores poliméricos, juntamente com alguns outros transportadores, exibindo biodisponibilidade 1,5 vezes melhorada. Thakur *et al.* (2016) formularam a inserção bioerodível de azitromicina para prolongar o tempo de liberação e melhorar a disponibilidade ocular. A inserção de azitromicina foi preparada utilizando hidroxilpropilmetilcelulose (HPMC) e Eudragit RL100. A formulação (compreendendo 1,5% de HPMC e 3% de Eudragit RL100) mostrou liberação do fármaco durante 12 horas de maneira constante e controlada.

3.3.1 Nanopartículas poliméricas

Os polímeros são materiais leves e versáteis que possuem diversas propriedades úteis para várias aplicações práticas. Eles são amplamente utilizados em nosso estilo de vida atual e o mercado comercial de polímeros é bastante significativo e em constante crescimento. As NPs têm se destacado devido às suas propriedades únicas e capacidade de serem moldadas em várias estruturas. No entanto, muitos polímeros puros possuem baixas propriedades mecânicas e elétricas em comparação com metais e cerâmicas, o que levou ao desenvolvimento de várias formas de polímeros para atender às demandas de diferentes aplicações (Alamgir, 2018; Ramachandran *et al.*, 2019).

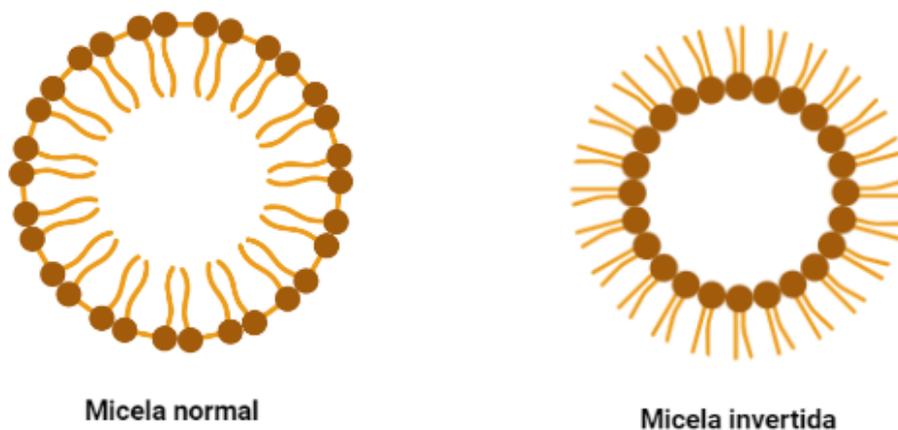
Embora grande parte do trabalho pioneiro em sistemas de liberação controlada tenha sido conduzido usando polímeros não degradáveis, os polímeros degradáveis e biodegradáveis são a escolha preferida para o desenvolvimento de sistemas poliméricos de administração de fármacos (Potulski *et al.*, 2014).

As NPs são coloidais e têm sido amplamente utilizadas em diversas áreas das ciências e tecnologia. Essas nanopartículas são compostas de polímeros e, devido ao seu tamanho nano, conferem muitas propriedades novas e únicas que não são encontradas no polímero a granel (Fagundes *et al.*, 2021; Nalawade; Gajjar, 2016a). As NPs apresentam impactos quânticos e uma área de superfície aumentada em relação ao volume, o que resulta em propriedades físico-químicas alteradas e introduz o valor da nanociência e da nanotecnologia. As NPs são frequentemente empregadas nas pesquisas, quando comparadas com outros sistemas coloidais apresentam maior estabilidade em fluidos biológicos e ao armazenamento, além da matéria-prima ser de fácil obtenção.

A automontagem ocorre por meio da formação de micelas, que são estruturas em forma de esfera ou cilindro, compostas por um núcleo hidrofóbico/óleo e uma casca hidrofílica/água, ou um núcleo hidrofílico/água e uma casca hidrofóbica/óleo. (Figueredo *et al.*, 2018). A formação das micelas ocorre acima da concentração micelar crítica (CMC), que é a concentração em que a automontagem de polímeros é induzida como demonstrado na figura 4. CMC é a concentração mínima de um surfactante (também conhecido como agente tensoativo) em uma solução aquosa, na qual as micelas começam a se formar (Banik; Fattahi; Brown, 2016; Su *et al.*, 2020). As micelas são agregadas moleculares de surfactantes que se organizam em uma estrutura esférica ou cilíndrica em soluções aquosas acima da CMC. Abaixo da CMC, as moléculas de surfactante

permanecem dispersas na solução. A CMC é uma importante propriedade físico-química para a formação de NPs, pois a automontagem de polímeros em NPs é geralmente induzida pela adição de um surfactante acima da CMC do polímero em solução. A automontagem de NPs pode ser direcionada por surfactantes ou outros aditivos para controlar a forma e o tamanho das nanoestruturas formadas (Banik; Fattahi; Brown, 2016; Robles-García *et al.*, 2018).

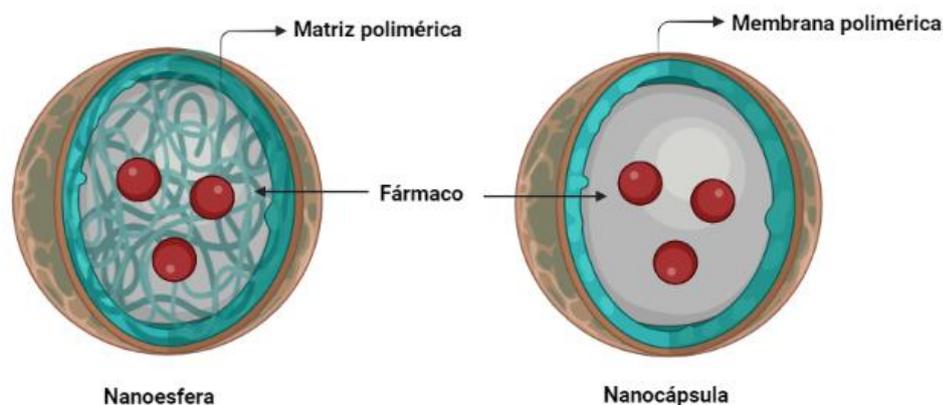
Figura 4- Representação esquemática das micelas normais e inversas



Fonte: Autoria própria

O termo “nanopartícula” compreende tanto as nanocápsulas quanto as nanoesferas, que diferem em relação à sua morfologia. As nanocápsulas são compostas por um núcleo oleoso no qual o fármaco geralmente está dissolvido, envolto por uma membrana polimérica que controla o perfil de liberação do fármaco a partir do núcleo. As nanoesferas são baseadas em uma rede polimérica contínua na qual não contêm o núcleo oleoso em sua composição e são formadas por uma matriz polimérica, em que a substância é dispersa por todo o polímero, na sua superfície, no seu interior ou dissolvido na matriz, como mostrado na Figura 5 (Crucho; Barros, 2017; Guterres; Alves; Pohlmann, 2007).

Figura 5- Representação de nanopartículas poliméricas



Fonte: Autoria própria

3.3.1.1 Métodos de preparação das nanopartículas

Dependendo do tipo de fármaco a ser carregado nas NPs e seus requisitos para uma determinada via de administração, diferentes métodos podem ser utilizados para a produção das partículas. (Jawahar; Meyyanathan, 2012; Rubio et al., 2016a). A escolha do método de produção depende da natureza do polímero e da aplicação desejada. Por exemplo, alguns polímeros podem ser difíceis de dissolver ou emulsionar em certos solventes, o que pode limitar o uso de certos métodos de produção. Além disso, o tamanho e a distribuição de tamanho das nanopartículas produzidas podem variar com o método de produção escolhido, o que pode afetar a eficácia do sistema de entrega de fármacos. Independentemente do método de preparação empregado, os produtos são geralmente obtidos na forma de suspensões aquosas coloidais (Hernández-Giottonini *et al.*, 2020; Jawahar; Meyyanathan, 2012).

3.1.1.1.1 Evaporação do solvente

A evaporação do solvente foi o primeiro método desenvolvido para preparar NPs poliméricas a partir de um polímero pré-formado. Nesse método, inicialmente é necessária a preparação de uma emulsão óleo-em-água (o/a), levando à produção de nanoesferas. (Szczech; Szczepanowicz, 2020). Primeiramente, é preparada uma fase orgânica, constituída por um solvente orgânico polar no qual o polímero é dissolvido, e o ingrediente ativo (por exemplo, fármaco) é incluído por dissolução ou dispersão. O

diclorometano e o clorofórmio têm sido amplamente utilizados. Uma fase aquosa, que contém um surfactante (por exemplo, acetato de polivinila; PVA), também tem sido preparada frequentemente. A solução orgânica é emulsificada na fase aquosa com um surfactante e, em seguida, é normalmente processada usando homogeneização de alta velocidade ou ultrassom, produzindo uma dispersão de nanogotículas. Uma suspensão de NPs é formada pela evaporação do solvente do polímero, que se difunde através da fase contínua da emulsão. O solvente é evaporado por agitação magnética contínua à temperatura ambiente (no caso de solventes mais polares) ou em um processo lento de pressão reduzida (como acontece ao usar, por exemplo, diclorometano e clorofórmio). Após a evaporação do solvente, as nanopartículas solidificadas podem ser lavadas e coletadas por centrifugação, seguida de liofilização para armazenamento a longo prazo. (Bohrey; Chourasiya; Pandey, 2016; Sharangi; Datta, 2015).

Para fármacos hidrofílicos é preferível a produção de emulsões múltiplas (A/O/A). Nesse método, a fase interna é composta por uma solução aquosa contendo o fármaco hidrofílico, que é emulsionada em uma fase orgânica constituída por um polímero dissolvido em um solvente orgânico. Essa emulsão é então dispersa em uma solução aquosa externa contendo um emulsificante, formando uma emulsão do tipo A/O/A (Sharangi; Datta, 2015).

Durante a evaporação do solvente, o solvente orgânico é evaporado através da fase orgânica e a fase interna (que contém o fármaco hidrofílico) é encapsulada em partículas poliméricas sólidas dispersas na fase externa aquosa. Esse método permite a produção de nanopartículas com tamanho, morfologia e carga superficial controlados, além de promover a proteção e a liberação controlada do fármaco encapsulado (Anghel *et al.*, 2012; Bohrey; Chourasiya; Pandey, 2016; Singh; Srivastava, 2019).

3.1.1.1.2 Nanoprecipitação

Dentre os diversos métodos que vêm sendo utilizados para a produção de nanopartículas biopoliméricas, o método de precipitação antisolvente ou nanoprecipitação é um método direto e rápido, no qual, ao contrário de outros métodos de estabilização de partículas, não é necessário um agente emulsificante. (Caicedo Chacon *et al.*, 2023).

Na prática, o soluto hidrofóbico (moléculas de biopolímeros ou lipídios) é primeiro dissolvido em um solvente orgânico polar, como etanol, metanol ou acetona normalmente

são usados, produzindo soluções binárias. Devido à imiscibilidade em água, eles podem ser facilmente removidos por evaporação. Essa solução é então adicionada gradualmente sob agitação (gota a gota) ou por taxa de adição controlada a uma quantidade especificada de um antissolvente (essa insolubilidade deve ser relativa ao soluto), geralmente água, que deve ser miscível com o solvente polar em todas as proporções. Nesta fase, a solução binária começa a se tornar insolúvel para o soluto à medida que a concentração do antissolvente aumenta e o sistema evolui para a separação de fases. Devido à rápida difusão espontânea da solução polimérica na fase aquosa, as nanopartículas se formam instantaneamente na tentativa de evitar as moléculas de água. À medida que o solvente se difunde das nanopartículas, o polímero precipita na forma de nanocápsulas ou nanoesferas (Caicedo Chacon *et al.*, 2023; Sánchez-López *et al.*, 2016).

Quando o soluto é hidrofílico, geralmente é solubilizado em água, tornando o composto orgânico polar o antissolvente. Essa metodologia é fácil, mas a principal limitação prática está na possível floculação de partículas e formação de grandes agregados. Nesse método, é possível adicionar a fase orgânica à fase aquosa, mas também é viável realizar o processo reverso sem comprometer a formação das nanopartículas. É comum incluir surfactantes no processo para garantir a estabilidade da suspensão coloidal, embora não sejam necessários para a formação das nanopartículas (Bernal-Chávez *et al.*, 2021; Chidambaram; Krishnasamy, 2014).

A nanoprecipitação é um método frequentemente utilizado para a preparação de NPs com dimensões em torno de 170 nm, mas também permite a aquisição de nanoesferas ou nanocápsulas. As nanoesferas são obtidas quando o princípio ativo é dissolvido ou disperso na solução polimérica. As nanocápsulas são obtidas quando o fármaco é previamente dissolvido em um óleo, que é então emulsionado na solução orgânica polimérica antes que a fase interna seja dispersa na fase externa da emulsão. (Salatin *et al.*, 2017).

3.1.1.1.3 Emulsificação/Difusão de Solvente

Este método consiste na formação de uma emulsão o/a entre um solvente parcialmente miscível em água contendo polímero e fármaco, e uma solução aquosa com um surfactante. A fase interna dessa emulsão é constituída por um solvente orgânico parcialmente hidromiscível, como álcool benzílico ou acetato de etila, que é previamente

saturado com água para garantir um equilíbrio termodinâmico inicial de ambas as fases à temperatura ambiente (Souto *et al.*, 2019).

A subsequente diluição com grande quantidade de água induz a difusão do solvente das gotículas dispersas para a fase externa, resultando na formação de partículas coloidais. Geralmente, este é o método usado para produzir nanoesferas, mas nanocápsulas também podem ser obtidas se uma pequena quantidade de óleo (como triglicerídeos: C6, C8, C10, C12) for adicionada à fase orgânica. Finalmente, dependendo do ponto de ebulição do solvente orgânico, esta última etapa pode ser eliminada por evaporação ou por filtração. Ao final, é possível obter NPs com dimensões variando de 80 a 900 nm. Este método é frequentemente aplicado para a produção de NPs poliméricas, apesar da exigência de um grande volume da fase aquosa, que deve ser eliminada da dispersão coloidal, e apesar do risco de difusão do fármaco hidrofílico para a fase aquosa (Guterres; Alves; Pohlmann, 2007; Kumar *et al.*, 2012).

3.1.1.1.4 Emulsificação/salting-out reverso

O método de emulsificação/difusão de solvente descrito acima pode ser considerado como uma modificação do método de emulsificação/salting-out reverso. O método salting-out baseia-se na separação de um solvente hidromiscível de uma solução aquosa, através de um efeito salting-out que pode resultar na formação de nanoesferas. A principal diferença é a composição da emulsão o/a, que é formulada a partir de um solvente polimérico miscível em água, como acetona ou etanol, e a fase aquosa contém um gel, o agente salting-out e um estabilizador coloidal (Lim; Hamid, 2018; Mahalingam; Krishnamoorthy, 2015a; Wang *et al.*, 2016). Exemplos de agentes salinizantes adequados incluem eletrólitos, como cloreto de magnésio, cloreto de cálcio ou acetato de magnésio, bem como não eletrólitos, por exemplo, sacarose. A miscibilidade de acetona e água é reduzida pela saturação da fase aquosa, o que permite a formação de uma emulsão o/a a partir das outras fases miscíveis.

A emulsão o/a é preparada, sob intensa agitação, à temperatura ambiente. Em seguida, a emulsão é diluída utilizando um volume adequado de água deionizada ou de uma solução aquosa para permitir a difusão do solvente orgânico para a fase externa, a precipitação do polímero e, conseqüentemente, a formação de nanoesferas. O solvente restante e o agente de salinização são eliminados por filtração de fluxo cruzado. A condição de completa miscibilidade entre o solvente orgânico e a água não é essencial,

mas simplifica o processo de execução. As dimensões das nanoesferas obtidas por este método variam entre 170 e 900 nm. O tamanho médio pode ser ajustado para valores entre 200 e 500 nm, variando a concentração de polímero da fase interna/volume da fase externa (Lim; Hamid, 2018; Mahalingam; Krishnamoorthy, 2015a).

3.3.1.2 Caracterização

As propriedades físicas das NPs poliméricas podem apresentar variações, tais como diferenças na composição e concentração, além de variações no tamanho, forma, propriedades de superfície, cristalinidade e estado de dispersão. Essas características são frequentemente avaliadas através de diversos métodos, com o objetivo de se obter uma caracterização completa das NPs. Além disso, a caracterização das NPs poliméricas é importante para avaliar seus riscos à saúde e ao meio ambiente, especialmente em termos de nanotoxicologia e avaliação da exposição nos locais de trabalho (Andreani *et al.*, 2015; Bohrey; Chourasiya; Pandey, 2016).

Ao avaliar a composição, o tamanho, a forma, as propriedades de superfície, a cristalinidade e o estado de dispersão das NPs poliméricas, é possível entender melhor seu comportamento em diferentes ambientes, como em sistemas biológicos ou em processos industriais. Isso pode ajudar a identificar possíveis efeitos adversos à saúde e ao meio ambiente, bem como a otimizar o desempenho das NPs em suas aplicações (Carbone *et al.*, 2018).

3.3.1.2.1 Morfologia

A microscopia eletrônica, tanto de varredura (MEV) quanto de transmissão (MET), é amplamente utilizada para obter informações sobre a forma e o tamanho de NPs. O MEV é uma técnica utilizada para obter imagens de superfície em alta resolução, na qual um feixe de elétrons é direcionado para a amostra, gerando sinais que refletem a composição atômica e a morfologia da superfície (Bohrey; Chourasiya; Pandey, 2016). No entanto, muitas NPs são essencialmente invisíveis à microscopia eletrônica devido à sua natureza orgânica, que não desvia suficientemente o feixe de elétrons. Por isso, é necessário revestir a amostra com uma fina camada de metal para criar uma camada condutora na amostra, inibir o carregamento da superfície, reduzir os danos térmicos e melhorar o sinal do elétron secundário, necessário no MEV.

O MEV de baixa voltagem pode ser conduzido em um FEG-MEV, no qual um campo elétrico faz com que elétrons de alta energia sejam emitidos de um emissor de filamento de tungstênio com uma ponta tão pequena quanto 10 nm. Como resultado, esta técnica tem uma maior resolução espacial e melhor relação sinal-ruído. O tamanho, distribuição de tamanho e morfologia dos NPs podem ser adquiridos diretamente do MEV com alta resolução. A pureza da amostra NPs e seu grau de agregação também podem ser inferidos a partir de imagens MEV. Porém, a preparação da amostra é destrutiva e nunca se pode ter certeza de que a imagem observada é verdadeiramente representativa da amostra em massa, o que pode levar a estatísticas tendenciosas de distribuição de tamanho em amostras heterogêneas (Andreani *et al.*, 2015; Crucho; Barros, 2017)

O MET é capaz de distinguir entre nanocápsulas e nanoesferas, além de determinar a espessura da parede da nanocápsula. As nanoesferas são esféricas e possuem estrutura polimérica sólida, enquanto as nanocápsulas são formadas por um envelope polimérico fino (cerca de 5 nm) ao redor do núcleo oleoso. A microscopia de força atômica (AFM) também é uma técnica usada para caracterizar a morfologia da superfície das NPs poliméricas. Ela fornece informações em alta resolução em três dimensões e em escala nanométrica, além de ser capaz de resolver detalhes de superfície em nível atômico (Andreani *et al.*, 2015; Lorca-Ponce *et al.*, 2023).

3.3.1.2.2 Distribuição de tamanho de partícula

Em geral, as NPs obtidas por diferentes métodos apresentam diâmetros médios que variam entre 100 e 300 nm. É desejável que a polidispersão seja minimizada, idealmente próxima de zero, e que a distribuição de tamanho seja unimodal. Em alguns casos, é possível obter partículas com diâmetros em torno de 60 a 70 nm, e até mesmo inferiores a 50 nm. Existem diversas técnicas para medir o tamanho das nanopartículas, sendo as mais comumente utilizadas no espalhamento de luz dinâmica (DLS) e estática (SLS), além das técnicas complementares de MET, MEV e AFM (Brar; Verma, 2011; Carvalho *et al.*, 2018).

É importante ressaltar que as medidas de tamanho podem variar dependendo do método utilizado. Por exemplo, a microscopia eletrônica fornece uma imagem da partícula isolada do ambiente, enquanto o DLS permite determinar o raio hidrodinâmico de partículas suspensas. Além disso, o DLS é um complemento importante para o TEM, pois pode medir tamanhos maiores e fornecer informações sobre o estado de agregação

das nanopartículas em solução, bem como mudanças na distribuição de tamanho das partículas. Vários fatores podem influenciar o tamanho das nanopartículas poliméricas, como a composição quali-quantitativa. Por exemplo, no caso das nanocápsulas, a natureza do óleo utilizado como núcleo pode influenciar o diâmetro da partícula devido a diferenças de viscosidade, hidrofobicidade ou tensão interfacial entre as diferentes fases líquidas. Além disso, a quantidade de fármaco incorporado também pode afetar o diâmetro médio das nanopartículas, podendo levar a partículas maiores com uma distribuição de tamanho mais ampla (Bernal-Chávez *et al.*, 2021; Liebel *et al.*, 2023).

Desta forma, uma formulação eficaz, segura e estável de NPs requer uma distribuição de tamanho homogênea, ou seja, um sistema monodisperso. Para avaliar a homogeneidade da distribuição de tamanhos das partículas em uma amostra, o índice de polidispersão (PDI) é frequentemente utilizado. O PDI fornece uma representação numérica da distribuição de tamanhos, variando de 0,0 a 1,0 (Carvalho *et al.*, 2018; Danaei *et al.*, 2018).

Valores de PDI inferiores a 0,1 são considerados monodispersos, o que indica uma população mais homogênea de partículas, com uma distribuição de tamanho estreita. Valores entre 0,2 e 0,3 indicam uma distribuição de tamanhos relativamente estreita, com uma pequena variação entre os tamanhos das partículas. Por outro lado, valores acima de 0,4 refletem um sistema polidisperso, com uma distribuição de tamanhos mais ampla, indicando uma maior variação nos tamanhos das partículas (Danaei *et al.*, 2018; Gordillo-Galeano; Mora-Huertas, 2021).

Portanto, é desejável que o PDI seja o mais baixo possível, indicando uma distribuição de tamanho mais homogênea e uma população de partículas mais uniforme. Isso é importante para garantir a eficácia da formulação, a segurança do sistema e sua estabilidade ao longo do tempo.

3.3.1.2.3 Propriedades e estabilidade da superfície

No desenvolvimento de novas nanoformulações, é essencial avaliar as propriedades de superfície das nanopartículas para obter informações sobre a estabilidade coloidal da formulação e a química da superfície das nanopartículas em condições específicas. Essas propriedades determinam as interações do nanossistema com o ambiente biológico durante a aplicação, conhecida como "interface nano-bio" (Honary; Zahir, 2013).

A repulsão ou atração eletrostática entre nanomateriais é um dos parâmetros fundamentais que afetam a estabilidade coloidal das nanoformulações e suas interações com o ambiente. Quando as nanopartículas são dispersas em uma solução iônica, como a água, elas adquirem uma carga superficial, que é protegida por uma camada de contraíons fracamente ligados, chamada de camada difusa. Isso permite a medição de um parâmetro electrocinético importante, conhecido como potencial zeta, na região de deslizamento que discrimina a camada difusa dos íons livres presentes na solução. A distância que se estende entre a camada de íons fortemente ligados à superfície da nanopartícula (ou camada de Stern) e a camada difusa é chamada de dupla camada elétrica (EDL), conforme definido pelo parâmetro de Debye, que é altamente influenciado pela composição iônica da solução (Bohrey; Chourasiya; Pandey, 2016; Honary; Zahir, 2013; Zielinska *et al.*, 2019).

O potencial zeta (ζ) NPs reflete a carga superficial das partículas, que pode ser influenciada por alterações na interface com o meio dispersante. Essas mudanças podem ocorrer devido à dissociação de grupos funcionais presentes na superfície das partículas ou à adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso, bem como devido ao efeito de solvatação (Gordillo-Galeano; Mora-Huertas, 2021).

A determinação do potencial zeta é realizada utilizando técnicas de Doppler para medir a velocidade da partícula em resposta a uma voltagem aplicada. A partir da mobilidade eletroforética das partículas em um solvente específico, o potencial zeta é calculado. Os principais componentes das nanopartículas poliméricas, como fosfolipídios, poloxâmeros e polímeros, podem influenciar o potencial zeta quando estão presentes nas formulações. Um valor de potencial zeta relativamente alto, geralmente considerado na faixa de $|\pm 30 \text{ mV}|$, é importante para garantir uma boa estabilidade físico-química da suspensão coloidal. Isso ocorre porque forças repulsivas mais intensas tendem a evitar a agregação das partículas, mesmo em colisões ocasionais com nanopartículas adjacentes (Bohrey; Chourasiya; Pandey, 2016; Chiu *et al.*, 2021).

A determinação do potencial zeta é útil para elucidar o mecanismo de associação de fármacos às nanopartículas. Portanto, o potencial zeta das NPs pode ser ajustado de acordo com a aplicação específica, através da introdução de surfactantes ou outros revestimentos na superfície das partículas.

3.4 ENCAPSULAMENTO DE COMPOSTOS BIOATIVOS

A administração prolongada de fármacos químicos para o controle da hipertensão pode acarretar em sérios problemas de saúde. Por exemplo, medicamentos como os inibidores da enzima conversora de angiotensina (IECA), os bloqueadores dos receptores de angiotensina (BRA), os bloqueadores dos canais de cálcio e os diuréticos, frequentemente prescritos para o controle da pressão arterial elevada, podem causar uma variedade de efeitos colaterais indesejados. Estes podem incluir tonturas, fadiga, tosse, reações alérgicas, desequilíbrio eletrolítico, e em casos raros, insuficiência renal. Por outro lado, os medicamentos fitoterápicos geralmente apresentam menos efeitos colaterais. Muitas fontes de plantas (extratos) têm sido relatadas como possuidoras de potencial medicinal, e estima-se que aproximadamente 80% da população mundial usa plantas como fonte primária de agentes medicinais. Diferentes componentes ativos, como polifenóis (especialmente flavonoides) e alcalóides, foram isolados dos extratos e estudados por suas atividades benéficas. Como resultado, tem havido um crescente interesse no uso de fitofármacos como medicina complementar ou alternativa para a prevenção ou tratamento de muitas doenças, incluindo diabete, hipertensão e câncer. Os fitopolifenóis, especialmente os flavonoides, têm demonstrado potencial terapêutico e devem ser cuidadosamente explorados para esse fim (Ekor, 2014; Maity; Acharyya; Sankar Chakraborti, 2022).

Porém, a solubilidade aquosa e estabilidade limitada nas condições do trato gastrointestinal, metabolismo acelerado, meia-vida curta e biodisponibilidade reduzida são alguns dos desafios que os agentes bioativos naturais enfrentam. A estrutura química desses agentes governa a absorção e as concentrações plasmáticas após a administração oral. No entanto, a medição das concentrações plasmáticas é fundamental para avaliar a biodisponibilidade dos agentes bioativos naturais e seus metabólitos. Por exemplo, cerca de 10% dos polifenóis administrados por via oral, ou seus metabólitos, podem ser encontrados na urina e no plasma. A administração oral também pode ser afetada por problemas como o tempo de trânsito gástrico insuficiente, baixa permeabilidade intestinal e sensibilidade às condições do canal alimentar (pH, enzimas, etc.), todos os quais afetam a eficácia terapêutica desses agentes. Se houver metabolismo extenso dos agentes bioativos naturais, a administração oral resultará em um efeito terapêutico fraco devido à baixa disponibilidade da forma ativa no plasma ou à presença de frações farmacologicamente inativas (Makadia; Siegel, 2011; Scalbert; Williamson, 2000; Siddiqui *et al.*, 2023).

Desenvolver um sistema de liberação de fármacos adequado para carregar agentes bioativos naturais é um desafio significativo. A composição em nanocarreadores é uma estratégia promissora para a entrega desses compostos, já que o objetivo dos sistemas de entrega nanométricos é melhorar a eficácia e superar as desvantagens associadas à sua administração. As NPs, em particular, possuem várias propriedades que permitem superar a maioria dos desafios enfrentados pela entrega de agentes bioativos naturais por diferentes rotas. Por exemplo, para administração oral, as NPs podem proteger os ativos da degradação e transportá-los para as regiões ideais dentro do trato gastrointestinal. Além disso, seu pequeno tamanho de partícula resulta em uma grande área de superfície efetiva, melhorando a taxa de dissolução de drogas carregadas e interação efetiva com superfícies epiteliais. É possível ajustar as condições de automontagem durante a preparação de NPs e selecionar categorias de polímeros particulares para controlar suas características, como diâmetro de partícula, potencial zeta e hidrofobicidade, além de parâmetros de liberação de drogas (rápida, controlada, sustentada). (Banik; Fattahi; Brown, 2016; Watkinson *et al.*, 2013).

No caso do uso parenteral, a modificação da superfície das NPs é viável e não complicada, o que leva à superação de alguns obstáculos associados à administração parenteral. A encapsulação de superfície com frações de direcionamento e PEGuilação pode efetivamente levar a um comportamento de direcionamento e maior tempo de residência na circulação geral, respectivamente. Isso pode ser alcançado usando diversos polímeros adaptados com grupos desejados ou acoplando polímeros específicos às NPs projetadas. Especificamente, tem sido relatado que as nanopartículas poliméricas entregam efetivamente ativos ao cérebro por meio da suscetibilidade à transcitose facilitada por adsorção e transcitose mediada por receptor através da barreira hematoencefálica, o que pode ser alcançado ao direcionar peptídeos e/ou frações de penetração celular ancoradas a superfícies de nanopartículas poliméricas. Diferentes mecanismos também foram relatados, como a transcitose de células endoteliais, endocitose de células endoteliais, gradientes de alta concentração criados por NPs e fluidização de membrana por surfactantes incluídos (Kreuter, 2014; Pinheiro *et al.*, 2021).

Já na aplicação tópica, as NPs melhoram a permeação da pele, pois sua montagem na superfície da pele ou do folículo piloso pode oferecer um reservatório para liberar o fármaco incessantemente, criando um gradiente de concentração.

3.5 ENSAIO DE PRÉ-FORMULAÇÃO E OTIMIZAÇÃO

O planejamento experimental, também conhecido como Design of experiments (DoE) é uma abordagem sistemática e científica para otimizar processos e desenvolver produtos. Ele pode ser aplicado para melhorar a produção de extratos naturais e a síntese de nanopartículas, permitindo a obtenção de resultados mais eficientes e controlados. No contexto da produção de extratos naturais, o planejamento experimental pode ser utilizado para determinar as melhores condições de extração, maximizando o rendimento e a qualidade dos compostos desejados. Através do planejamento, é possível investigar e controlar diferentes variáveis-chave do processo, como o tipo de solvente, temperatura, tempo de extração, relação sólido-líquido, pressão, entre outros. O uso de técnicas estatísticas, com o DoE, permite que sejam avaliados vários fatores simultaneamente, otimizando o processo de extração e reduzindo o número de ensaios experimentais necessários.

Na produção de nanopartículas, o planejamento experimental pode ser empregado para otimizar a síntese, controlando a morfologia, tamanho, dispersão e estabilidade das nanopartículas produzidas, ou seja, pequenas modificações no processo de fabricação afetam as nanopartículas em termos de características físico-químicas como tamanho de partícula, índice de polidispersão e forma da partícula. Isso ajuda a encontrar as condições ideais para obter as nanopartículas desejadas com maior eficiência e consistência, parâmetros biológicos (ou seja, liberação, permeação, absorção) e atividade farmacológica. Dessa forma, é possível entender melhor o processo de produção e desenvolver estratégias para otimização contínua e melhorias a longo prazo (Bastogne, 2017; Li; Qiao; Wu, 2017; Politis *et al.*, 2017).

As ferramentas DoE são métodos estatísticos que ajudam a entender como os fatores de entrada (sozinhos e combinados) afetam o produto (respostas). Os métodos DoE que são comumente usados para desenvolver nanocarreadores incluem design de triagem (Plackett-Burman, fatorial fracionado e fatorial completo) e Metodologia de Superfície de Resposta (RSM). Métodos RSM como o Design Composto Central (CCD) e o Design Box-Behnken (BBD) são os principais métodos no campo farmacêutico, mas o Design Doehlert também é aplicado. O último projeto pode ser tão eficaz quanto o CCD e o BBD, mas tem sido menos estudado para fins de nanotecnologia. (Badawy *et al.*, 2017; Dawoud *et al.*, 2019; Zagalo; Sousa; Simões, 2022).

Primeiramente, o design de triagem é uma estratégia valiosa para identificar as variáveis significativas potenciais com um número reduzido de experimentos. Essa abordagem preliminar permite selecionar os fatores mais relevantes que afetam o processo ou produto em estudo. Em seguida, o método de Superfície de Resposta (RSM) é aplicado para aprofundar a investigação, identificando o nível crítico do fator mais importante, previamente determinado pelo design de triagem. (Politis *et al.*, 2017; Tavares Luiz *et al.*, 2021). A seleção das variáveis a serem estudadas depende dos critérios e conhecimentos do pesquisador sobre o sistema avaliado. Nesse sentido, várias características do processo de produção de nanocarreadores podem ser investigadas e otimizadas. Alguns dos fatores que podem ser considerados incluem a quantidade de fármaco e outros constituintes (tais como surfactante, polímero, lipídio e co-surfactante) e suas razões molares (Dar; Din; Khan, 2018; Rajput; Butani, 2019).

Além disso, outros parâmetros relevantes, como tempo de pressão e homogeneização, número de ciclos de extrusão, tempo e temperatura de sonicação, amplitude de sonicação, entre outros, também podem ser estudados para influenciar as características dos nanocarreadores. Uma observação importante ao escolher esses fatores é considerar as características quantitativas obrigatórias de suas variáveis de entrada, ou seja, selecionar aqueles parâmetros que possam ser facilmente controlados e ajustados no processo de produção.

Ao combinar o design de triagem e o RSM, os pesquisadores podem obter uma visão mais abrangente do processo de produção de nanocarreadores, identificando os fatores críticos e as melhores condições operacionais para alcançar o desempenho e a qualidade desejados. Essa abordagem sistemática e científica de planejamento experimental é essencial para otimizar e aperfeiçoar a produção de nanocarreadores, garantindo eficiência e consistência no desenvolvimento de sistemas de liberação de fármaco.

Dessa forma, um planejamento fatorial fracionado é uma técnica de design de experimentos de triagem que permite estudar simultaneamente o efeito de vários fatores independentes em um processo ou produto, reduzindo significativamente o número de experimentos necessários em comparação com um planejamento fatorial completo. Essa abordagem é especialmente útil quando o número de fatores a serem investigados é grande, e realizar todos os experimentos em um planejamento completo seria inviável em termos de tempo, recursos e custos (Carabajal *et al.*, 2020).

Nesse tipo de planejamento, apenas uma fração dos experimentos é conduzida, enquanto os demais são omitidos. Essa fração é cuidadosamente selecionada para representar adequadamente os efeitos principais e algumas interações importantes entre os fatores estudados. O objetivo é obter informações suficientes para identificar os fatores mais relevantes e suas influências no processo ou produto, mesmo com um número reduzido de experimentos (Draper, 1997; Javed *et al.*, 2022).

Já os métodos de superfície de resposta têm níveis adicionais ao estabelecido, onde é possível avaliar os fatores em uma região definida entre os níveis, e estimar quais os níveis ótimos dos fatores para uma determinada resposta. O número de experimentos necessários para a obtenção do modelo BBD é definido como $N = 2k(k - 1) + C_0$, onde k é o número de fatores e C_0 é o número de pontos centrais. A matriz BBD para três fatores é um projeto esférico e rotativo. Quando esta matriz é vista em uma perspectiva de cubo de dois pontos, é possível ver os pontos centrais e os pontos médios das arestas. O BBD é vantajoso sobre o CCD, pois requer apenas três níveis para cada fator, enquanto o CCD requer cinco níveis. Dessa forma, é possível obter as melhores formulações e designar a eleita para ser reproduzida e seguir demais ensaios ao longo da pesquisa (Dawoud *et al.*, 2019; Ferreira; Nunes, 2019a; Shimojo; Fernandes; Ferreira, [s. d.]).

4. MÉTODOS

Todas as técnicas e métodos estão detalhadamente descritos em cada artigo.

O artigo I diz respeito a otimização de condições extrativas a partir de folhas coletadas em duas localidades diferentes do Brasil. É abordado a influência de fatores como temperatura, proporção droga:solvente e tempo de contato com o líquido extrator, podem impactar na composição e na obtenção na maximização de compostos majoritários. Nesse capítulo também é abordado atividade antioxidante, com intuito de promover a padronização e otimização do método.

O artigo II diz respeito a produção de nanopartículas incorporando extrato aquoso de *Morus nigra* L por dois métodos de obtenção (nanoprecipitação e dupla emulsificação). Foram utilizadas técnicas de planejamento de triagem e de superfície (Box-Behken) que garantiram condições físico-química adequadas na sua produção, além disso foi avaliado as propriedades biológicas das nanopartículas *in vitro* frente a sua liberação e citotoxicidade em células endoteliais de cordão umbilical.

5. RESULTADOS

Os resultados dessa tese estão apresentados na forma de artigo(s).

5.1 ARTIGO 1- OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE FOLHAS DE *Morus nigra* L. UTILIZANDO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

5.1.1 Introdução

A amora-preta (*Morus nigra* L.) é uma planta oriunda da Ásia, da família Moraceae, com maior abundância de produção frutífera na Ásia menor. Na medicina popular, o chá das folhas de *Morus nigra* L. é utilizado por mulheres no combate aos sintomas pré-menstruais ou da menopausa, como também há relatos do uso contra diabetes, hipercolesterolemia e gota (Lemos *et al.*, 2020; Miranda *et al.*, 2010).

Graças à medicina popular, foi possível observar o potencial terapêutico da *Morus nigra* L. suas folhas possuem quantidades consideráveis de compostos fenólicos, apesar desses, em sua maioria, serem rapidamente degradados no trato gastrointestinal (Schafranski *et al.*, 2019). As folhas ainda possuem metabólitos secundários como alcalóides, depsídeos e depsidonas, taninos e saponinas, que podem apresentar uma série de benefícios, dentre eles: regulação da PA, bem como capacidade antioxidante, anti-inflamatória, antiviral, antibiótica e antitumoral (Rosa *et al.*, 2016).

No entanto, caso seja utilizado como matéria-prima pela indústria farmacêutica, métodos de controle de qualidade precisam ser desenvolvidos e validados para atender requisitos regulamentares, ausência desses estudos dificultam a reprodutibilidade das qualidades dos extrativos, o que pode afetar a eficiência e a segurança. Portanto, a padronização de soluções extrativas vegetais, deve ser o primeiro passo durante o desenvolvimento tecnológico de fitofármacos. Considerando a influência de vários fatores, tais como: o método de extração, propriedade de diversos solventes, condições extrativas, variação na produção de princípios ativos pelo vegetal, bem como o clima, solo e condições de cultivo da planta influenciam tanto no teor, quanto na diferença entre compostos fenólicos presentes nas soluções extrativas (Souza; Vieira; Putti, 2018). A padronização e controle desses fatores na produção das drogas e derivados vegetais é imprescindível para a qualidade do produto fitoterápico.

O DOE é uma ferramenta estatística utilizada para otimização e/ou triagem, para o estudar os efeitos de diferentes variáveis do processo e ou para determinar os melhores

níveis das variáveis estudados que forcem a maximização da resposta, ou seja, dos produtos finais. Sendo também capazes de apresentar quais variáveis exercem maior ou menor influência sobre o resultado final. Assim, é possível reduzir o tempo de experimentação do estudo, diminuir custos e aproximar a relação entre o resultado esperado e o resultado obtido (Lima *et al.*, 2015; Nalawade; Gajjar, 2016b).

Em virtude da existência de poucos estudos na literatura correlacionando o local de coleta e o teor de compostos fenólicos torna-se clara a necessidade de realização um estudo de comparação entre extratos de *Morus nigra* L., buscando a maximização do teor de compostos fenólicos. Similarmente, é essencial o surgimento de mais estudos que avaliem a capacidade e quantificação de compostos antioxidantes no extrato de amoreira, dada a sua presença marcante em plantas medicinais. Diante das atividades farmacológicas demonstradas e o uso popular da espécie *Morus nigra* L., assim como a importância da padronização da droga vegetal, o objetivo da pesquisa foi de obter uma padronização dos extratos das folhas de *Morus nigra* L. a partir de localidades diferentes fazendo o uso de um planejamento fatorial e diversas técnicas analíticas.

5.1.2 Material e métodos

5.1.2.1 Material

Ácido trifluoracético UV/HPLC (Dinâmica®), acetonitrila grau HPLC (Loba Chemie), carbonato de sódio (Química moderna®, Brazil), filtros 0,22 µm (Chromafil® Xtra PVDF-20/25), Folin-Ciocateu, 2,2-difenil-picrilhidrazil (DPPH) e (±)-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid (Trolox) foram adquiridos da Sigma-Aldrich® Sdn Bhd, Selangor. Rutina, isoquercetina e ácido clorogênico (Sigma®, EUA). Água ultrapura foi obtido da Milli-Q Gradient® (Smart, Healforce, EUA) tendo condutividade inferior a 0,6 µS/cm em todas as análises.

5.1.2.2 Métodos

5.1.2.2.1 Obtenção e caracterização do material vegetal

5.1.2.2.1.1 Matéria-prima vegetal

As folhas de *Morus nigra* L. foram coletadas no município de Campina Grande-PB e Petrolina-PE, sob as coordenadas geográficas 07° 13 '37 ''S; 35° 55' 50'' W e 9° 19'10''S; 40°33'39''W respectivamente. Sua exsicata foi previamente identificada no

Instituto Agronômico de Pernambuco (IPA), na qual gerou o número de registro #95326. Todos os procedimentos de acesso ao patrimônio genético e conhecimento tradicionais associados foram realizados e o projeto foi registrado no SisGen (Cadastro #A08E24C).

Após a coleta, o material foi seco em estufa de ar circulante à temperatura de $45^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por aproximadamente 5 dias. Em seguida, o material vegetal seco foi pulverizado em moinho de facas (SL-31, Solab®) com tamis de 20 mesh (0,84 mm), para obtenção do pó vegetal.

5.1.2.2.2 Caracterização da matéria prima vegetal

5.1.2.2.2.1 Determinação por perda de dessecação

Para a realização do experimento foi usado o método gravimétrico, em que se transferiu 2 g da amostra, para um pesa filtro previamente pesado e dessecado, a droga vegetal foi dessecada na estufa (Ethicktechnology®) durante 2 horas sob temperatura média entre 100 a 105°C , até peso constante. A porcentagem de perda por dessecação foi calculada e realizada em triplicata. Os resultados foram expressos em perda de massa percentual segundo a equação (1):

$$PD = \frac{P_1 - P_2}{P_a} \times 100 \quad (1)$$

Onde: PD = Perda por Dessecação; P_1 = Peso do pesa-filtro contendo a amostra antes da dessecação; P_2 = Peso do pesa-filtro contendo a amostra após a dessecação; P_a = peso da amostra antes da dessecação.

5.1.2.2.2.2 Determinação da granulometria dos pós

A repartição granulométrica foi realizada utilizando 10 g do pó obtido da *Morus nigra L.* que passou por um conjunto de cinco tamises, previamente pesadas, com diâmetros das malhas respectivamente de 850 μm , 600 μm , 425 μm , 250 μm , 150 μm e 90 μm . O conjunto foi tampado e acionado o agitador de peneiras (Bertel®) por cerca de 15 minutos, com vibração adequada de acordo com o método descrito na Farmacopeia Brasileira, 6ª edição. Após o termino desse tempo, a amostra retida na parte superior de cada malha foi removida com o auxílio de um pincel adequado e transferida para um papel impermeável para pesagem do pó, inclusive do pó retido no coletor. A massa de pó retida foi calculada pela diferença de massa do tamis com o pó retido e o mesmo vazio.

A análise foi realizada em triplicata e o percentual retido em cada tamis foi obtido, utilizando a equação 2:

$$\% \text{ Retida no tamis} = \frac{P_1}{P_2} \times 100 \quad (2)$$

Onde: P₁= Peso da amostra retida em cada tamis (em gramas); P₂= Soma dos pesos retidos em cada tamis e no coletor (em gramas).

Em seguida, obteve-se o diâmetro médio (D_m) das amostras a partir da equação 3 (Allen Jr et al., 2007).

$$D_m = \frac{\sum[\% \text{ Retida} \times \text{abertura do tamis (mm)}]}{100} \quad (3)$$

5.1.2.2.2.3 Determinação de cinzas totais

A determinação do teor de cinzas totais da droga vegetal foi realizada de acordo com o descrito na Farmacopeia Brasileira, 6ª edição. Em um cadinho previamente tarado, pesou-se cerca de 3 g da amostra vegetal em pó, distribuída uniformemente, incinerou-se de forma gradativa a amostra até a temperatura de 600 ± 25 °C, até que todo o carvão fosse eliminado. Um gradiente de temperatura (30 minutos a 200°C, 60 minutos a 400°C e 90 minutos a 600°C) foi utilizado (Brasil, 2019). A amostra foi resfriada em um dessecador e pesada. A porcentagem de cinzas totais foi calculada em relação ao peso da droga vegetal em triplicata, de acordo com a equação 4 abaixo:

$$CT = \frac{C_2 - C_1}{C_a} \times 100 \quad (4)$$

Onde: CT = Teor de Cinzas; C₂ = Peso do cadinho com a amostra após incineração; C₁ = Peso do cadinho vazio; C_a = Peso da amostra antes da incineração.

5.1.2.2.2.4 Análise térmica do material vegetal

A matéria-prima vegetal de *Morus nigra* L. foi analisada utilizando a técnica de termogravimetria (TG). A análise foi realizada numa faixa de temperatura entre 25 e 600°C, com o equipamento Shimadzu® modelo DTG-60H sob atmosfera dinâmica de nitrogênio ultrapuro (50 mL/min) e razão de aquecimento de 10°C/min, utilizando cadinhos de alumina abertos, contendo aproximadamente 5 mg de amostra.

5.1.2.2.2.5 Análise fitoquímica preliminar

A prospecção fitoquímica através do extrato aquoso das folhas de *Morus nigra* L. (EA Mn), foi executada por meio de uma comparação das folhas coletadas de dois estados (Paraíba e Pernambuco) com a comercializada. A técnica de cromatografia em camada delgada (CCD) determinou o extrato que deveria ser utilizado para posteriores análises, através da maximização dos compostos fenólicos com os resultados alcançados.

O EA Mn, foi obtido a partir de 8 g do pó das folhas pulverizadas de *Morus nigra* L. e 500 mL de água destilada, sob a forma de infusão. O procedimento consistiu em adicionar água purificada sobre uma chapa aquecedora, após atingir a temperatura de 100°C, retirou-se o béquer da chapa em seguida, adicionou-se o material vegetal, em contato com a água por 90 min em repouso. O EA Mn foi congelado ($-90^{\circ} \pm 5^{\circ} \text{C}$) e liofilizado no equipamento Alpha 1,2 plus, CHRIST – USA por 96 horas, em parceria com o Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas na Universidade Estadual da Paraíba.

Para análise do CCD as amostras do extrato aquoso (comercial, Paraíba e de Pernambuco) foram pesados 1 mg e solubilizados em 2 mL de metanol P.A, enquanto que para os padrões foram preparados na concentração de 0,5 mg/mL em metanol P.A em eppendorf.

Avaliação de polifenóis: as amostras e os padrões foram aplicados de forma manual em placas cromatográficas de sílica gel 60 - F254 (Macherey-Nagel®, Alemanha). As placas foram desenvolvidas em cubas após saturação com a fase móvel (Quadro 1). A cuba foi saturada durante 15 minutos à temperatura ambiente. As bandas foram aplicadas com largura de 0,5 cm e com uma distância entre elas e das bordas das placas de 0,5 cm. O tamanho da largura e do comprimento das placas cromatográficas foi de 5 cm. As amostras foram aplicadas a 0,5 cm da origem e com término 0,5 cm do final da placa. Após a eluição das placas, as mesmas foram secas à temperatura ambiente, e observadas sob luz ultravioleta de 254 e 365 nm e luz visível em seguida foram digitalizadas. Na sequência foram reveladas com reagentes específicos para cada metabólito. As bandas obtidas foram comparadas às bandas dos padrões correspondentes.

Quadro 1- Condições cromatográficas para identificação do perfil químico por CC.

Classe de metabólito	Sistema	Padrão	Revelador
Derivados cinâmicos	Acetato de etila:ácido fórmico:água (90:5:5)	Ácido cafeico	AlCl ₃
Flavonoides		Rutina	
Taninos hidrolisáveis	Acetato de etila:ácido fórmico:água (90:5:5)	Ácido gálico	FeCl ₃
Taninos condensados		Catequina	Vanina Clorídrica + Δ

Legenda: AlCl₃: Cloreto de alumínio a 5% em metanol; FeCl₃: Cloreto férrico a 2% em metanol; Δ: Aquecimento.

Fonte: dados da pesquisa

5.1.2.2.3 Obtenção e caracterização do extrato fluido

5.1.2.2.3.1 Planejamento experimental para otimização do extrato de folhas de amoreira

Para otimização do processo extrativo, através do planejamento fatorial, foi escolhido o extrato aquoso (EA) obtido por infusão, visando simular a preparação tradicional. Por isso, o primeiro objetivo deste estudo foi encontrar o método de extração que leva aos extratos mais ricos em compostos polifenólicos, obtidos a partir das folhas de *Morus nigra* L do estado da Paraíba (PB) e Pernambuco (PE).

Foi realizado um planejamento fatorial fracionado, em que envolve três fatores estudados em três níveis (3^{3-1}). O desenho experimental incluiu três fontes de variação: temperatura de infusão (X_1), tempo de extração (X_2) e proporção droga:solvente (X_3) (Tabela 1). Foram gerados 9 diferentes experimentos para cada amostra coletada individuais, utilizando como variável dependente ou resposta no desenho experimental o teor de isoquercetina (Y_1), rutina (Y_2) e ácido clorogênico (Y_3).

Tabela 1- Níveis de desenho experimental para o método de extração do EA Mn.

Nível de variação			
Variáveis independentes	-1	0	+1
X₁: Temperatura de infusão (°C)	70	85	100
X₂: Tempo de extração (min)	30	60	90
X₃: Proporção droga: solvente (mg/mL)	4:250	10:250	25:250
Variáveis dependentes			
Y₁: Teor de isoquercetina			
Y₂: Teor de rutina			
Y₃: Teor de ácido clorogênico			

Fonte: Dados da pesquisa

5.1.2.2.3.2 Preparação do extrato fluido

O extrato foi realizado de acordo com (Dalmagro *et al.*, 2019) usando 250 mL de água destilada fervida com temperatura ajustados conforme o planejamento experimental, adicionou-se o material vegetal em contato com água de acordo com o tempo proposto. E após o resfriamento os extratos obtidos, foram submetidos ao processo de filtração com papel de filtro quantitativo (UNIFIL® 125 mm) para análises posteriores.

5.1.2.2.3.3 Determinação dos compostos fenólicos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Como estratégia para obter as condições ótimas de extração das folhas pulverizadas de *Morus nigra* L., foi realizada análises para determinação qualitativa dos marcadores químicos. Para tanto, o método de análise CLAE, foi anteriormente desenvolvido e validado de acordo com os parâmetros estabelecidos pela RDC nº 166/17 da ANVISA (Brasil, 2017; Souza *et. al*, 2015).

As análises foram realizadas utilizando um cromatógrafo líquido Shimadzu® (LC-20 AT) equipado com um amostrador automático (SIL-20 A) e um detector de arranjo de diodos (SPD-M20A) controlado por software LC-Solution® 1.0. As infusões foram filtradas e injetadas no CLAE-DAD com volume de injeção de 100 µL. Os líofilos foram preparados na concentração de 5 mg/mL e solubilizados em água ultrapurificada com auxílio de banho ultrassom.

As soluções extrativas de estudo foram submetidas individualmente à análise (triplicata) nas seguintes condições cromatográficas: como fase estacionária foi utilizada uma coluna C18 com dimensões de 250 x 4,6 mm e tamanho de partícula de 5 µm (Agilent® Eclipse), como fase móvel: solução A - água + 0,01% (v/v) de ácido trifluoracético (TFA) e solução B: acetonitrila (ACN), obedecendo ao gradiente descrito na tabela 2, com fluxo de 0,8 mL/min e volume de injeção de 100 µL. A temperatura da coluna foi mantida constante em 30 °C durante toda a análise.

Tabela 2- Sistema gradiente utilizado nas análises por CLAE-DAD

	Tempo	Solução A (%)	Solução B (%)
Gradiente linear	0-40 min	100-60	0-40
Isocrático	40-50 min	60	40
Gradiente linear	50-60 min	60-100	40-0
Isocrático	60-70 min	100	0

Fonte: A autoria própria.

5.1.2.2.3.4 Determinação do potencial hidrogeniônico (pH)

Foi realizada através da utilização de cerca de 25,0 mL da solução extrativa em pHmetro Micronal® modelo B474 previamente calibrado. O resultado foi expresso pela média de seis determinações (Brasil, 2019).

5.1.2.2.3.5 Determinação da Densidade Relativa

Foi utilizado um picnômetro de 25 mL previamente calibrado. A calibração consiste na determinação da massa do picnômetro vazio e da massa de seu conteúdo com água destilada. Foi transferida a amostra para o picnômetro, removendo excesso da substância e pesado. O peso da amostra foi obtido através da diferença de massa do picnômetro cheio e vazio. A densidade relativa foi determinada por meio da razão entre a massa da amostra líquida e a massa da água, ambas a 20°C (Brasil, 2019).

5.1.2.2.3.6 Determinação do Resíduo Seco em Extratos Fluidos

Foram transferidos 2 mL da solução extrativa para pesa-filtros. Evaporou-se até secura em banho-maria e dessecou-se em estufa a 100-105°C, por 3 horas. Deixou-se

esfriar em dessecador, sobre sílica e pesou-se. Calculou-se o resíduo seco em porcentagem sobre o volume (Brasil, 2019). A análise foi realizada em triplicata.

5.1.2.2.4 Obtenção e caracterização do extrato seco

5.1.2.2.4.1 *Preparação do extrato seco*

A solução extrativa das folhas de *Morus nigra L.* foi filtrada, o solvente extraído foi evaporado com o uso de um liofilizador e calculado a porcentagem de extrato seco obtida a partir do volume de solução extrativa que foi colocado para secar no liofilizador. Foi utilizado o equipamento LIOTOP® (modelo L101), através de otimizações do processo de secagem, as condições finais utilizadas foram: pressão de cerca de 30 mmHg, temperatura de aproximadamente -55° C por um tempo de secagem em torno de 96 horas.

5.1.2.2.4.2 *Determinação da Umidade Residual*

Foi realizada através do método gravimétrico, em triplicata, onde foram pesados cerca de 2 g do extrato seco e transferidos para pesa-filtros chatos previamente dessecados durante 30 minutos nas mesmas condições a serem empregadas na determinação. Após resfriamento em dessecador, os mesmos foram pesados tampados, contendo as amostras. Posteriormente, foram colocados em estufa (aproximadamente 105° C) por cerca de 2 horas (Brasil, 2019). Os pesafiltros foram armazenados em dessecador para estabilização de temperatura e então pesados. A operação foi repetida até peso constante.

5.1.2.2.4.3 *Caracterização térmica do extrato seco*

O extrato seco de *Morus nigra L.* foi caracterizada utilizando a técnica de DTG/TG. Conforme metodologia descrita no subitem 5.1.2.2.2.4

5.1.2.2.5 Desenvolvimento e validação do método de análise de quantificação de compostos fenólicos totais por espectrometria de absorção na região UV-vis.

5.1.2.2.5.1 *Desenvolvimento do método e validação*

Os métodos descritos para o doseamento de fenólicos totais (UV-Vis) das folhas de *Morus nigra L.* do estado de Paraíba e Pernambuco, foram desenvolvidos e validados

no Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos da UFPE. Os extratos escolhidos para serem submetidos à validação de metodologia analítica, foram aqueles que apresentaram melhores resultados para os componentes majoritários no planejamento fatorial estatístico realizado, pois é necessário que se obtenha um extrato com boa quantidade em massa, polifenóis totais, já que são esses compostos que estão fortemente correlacionados com as atividades biológicas de *Morus nigra* L., inclusive, antioxidante (Dalmagro *et al.*, 2019).

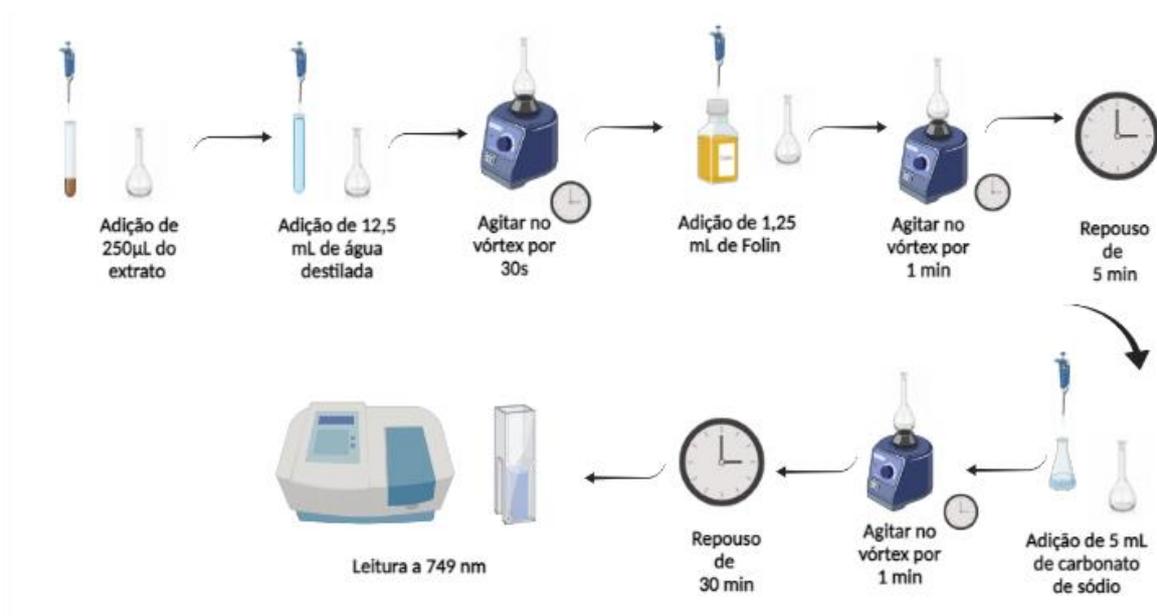
5.1.2.2.5.2 Desenvolvimento da metodologia de doseamento dos compostos fenólicos totais

O método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu (FC), descrito por (Vázquez *et al.*, 2015) com algumas modificações, foi usado para determinar os compostos fenólicos totais na amoreira.

Devido algumas variações que a reação pode promover, antes do processo de validação, foi realizada uma padronização do método, variando três parâmetros principais: 1) tempo de reação, 2) comprimento de onda de absorção máxima, 3) concentração do reagente carbonato de sódio anidro.

Para a reação uma solução estoque do padrão ácido gálico (1,12 mg/mL) e extrato aquoso de *Morus nigra* L. (100 mg/mL) foram preparadas com água destilada. Duzentos e cinquenta microlitros de cada solução foram transferidos para um balão volumétrico de 25 mL, contendo 12,5 mL de água destilada, em seguida foi adicionado 1,25 mL de Folin-Ciocalteu, com homogeneização de 1 min em vórtex, posteriormente 5 mL de carbonato de sódio foram adicionados a 10%, 15% e 20% (p/v). Após completar o menisco com água destilada, essa mistura foi agitada com vórtex e deixada em repouso no tempo de 15, 30 e 60 minutos. As amostras foram analisadas em espectrofotômetro UV/VIS, com amplitude da varredura de 400 a 900 nm e a água destilada foi usada como líquido de compensação, de acordo como na figura 6.

Figura 6-Fluxograma do método de Folin- Ciocalteu-



Fonte: Autoria própria

5.1.2.2.5.3 Desenvolvimento do método analítico

Para a validação do método de análise do teor de fenólicos totais, utilizou-se as normas estabelecidas pela ANVISA, de acordo com a RDC nº166 de 24 de julho de 2017, que dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. Para a validação desse método analítico foram avaliados os seguintes parâmetros: especificidade, linearidade, precisão (repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade), limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), exatidão e robustez, tendo como finalidade atestar a eficiência do método. Todas as análises foram realizadas em triplicata e a confiabilidade dos parâmetros foi verificada pelo desvio padrão relativo (DPR%).

5.1.2.2.5.3.1 CURVA DE CALIBRAÇÃO DA SUBSTÂNCIA DE REFERÊNCIA

Para a determinação das absorbâncias teóricas do teste de exatidão e absorbância específica da substância, foi construída a curva de calibração com 6 pontos pela análise de concentração 3,1; 4,5; 5,9; 7,3; 8,7; 10,1 e 11,5 µg/mL da substância de referência ácido gálico, utilizando como solução mãe padrão de concentração 1,12 mg/mL. Considerou-se o critério mínimo aceitável do coeficiente de determinação (R^2) igual ou

maior que 0,99 e os testes de correlação linear e análise residual foram realizados pela análise de regressão linear simples.

5.1.2.2.5.3.2 LINEARIDADE

Para esta análise foram utilizadas amostras de concentrações crescentes, em triplicata, do extrato de *Morus nigra* L. do estado de Pernambuco e Paraíba 280; 400; 520; 640; 760; 880 e 1000 µg/mL, foram escolhidas para que tivesse garantida a segurança da análise pelo aparelho espectrofotômetro. Foi realizada a análise da equação da reta e considerou-se o critério mínimo aceitável do coeficiente de determinação (R^2) igual ou maior que 0,99, para que o método apresente linearidade. Os testes de correlação linear e análise residual foram realizados pela análise de regressão linear simples.

5.1.2.2.5.3.3 ESPECIFICIDADE

A especificidade do método foi testada pelo acréscimo de 100 µL de uma solução 1,12 mg/mL do padrão ácido gálico às sete diferentes concentrações da linearidade, em triplicata a cada solução da curva de linearidade. Em seguida, procedeu-se com a realização do procedimento usualmente utilizado para realização da leitura de polifenóis totais. Por fim, a especificidade foi avaliada através da comparação entre as inclinações das curvas (coeficiente angular) obtidas no ensaio de especificidade e as curvas obtidas no ensaio de linearidade

5.1.2.2.5.3.4 LIMITE DE DETECÇÃO

Este estudo foi realizado, em triplicata, por sucessivas diluições da menor concentração da faixa da linearidade (280 µg/mL) até a menor concentração detectável do analito. O resultado foi comparado ao limite de quantificação determinada pela curva de linearidade do extrato de *Morus nigra* L. pela equação 5:

$$LD = \frac{D_{pa} \cdot 3}{IC} \quad (5)$$

Em que: DPa = desvio padrão do intercepto com o eixo y; IC = inclinação da curva

5.1.2.2.5.3.5 LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO

Este estudo foi realizado, em triplicata, por sucessivas diluições da amostra menos e mais concentrada da curva de linearidade do extrato de *Morus nigra* L. Foi determinada a menor e a maior amostra que manteve a linearidade da curva dentro do critério de aceitação de linearidade, coeficiente de determinação (R^2) igual ou superior a 0,99. O limite de quantificação inferior foi comparado ao resultado determinado pela curva de linearidade do extrato de *Morus nigra* L. pela equação 6:

$$LQ = \frac{DPa \cdot 10}{IC} \quad (6)$$

Em que:

DPa = desvio padrão do intercepto com o eixo y; IC = inclinação da curva

5.1.2.2.5.3.6 PRECISÃO

Foram avaliadas a precisão intra-corrída (repetibilidade) e a precisão inter-corrída (intermediária). A repetibilidade foi analisada por 6 determinações da concentração teórica do teste (640 µg/mL) do extrato de *Morus nigra* L. Para a precisão intermediária foi analisada, em triplicata, em dias diferentes (pelo menos 2 dias de intervalo), não sendo admitido coeficiente de variação superior a 5%.

5.1.2.2.5.3.7 EXATIDÃO

A exatidão do método foi realizada pela porcentagem de recuperação, considerando a adição de 70, 100 e 130 µL da solução de ácido gálico (1,12 mg/mL) em triplicata, à 174 e 155 µg/mL do extrato de *Morus nigra* L da Paraíba e Pernambuco respectivamente. A porcentagem de recuperação foi calculada pela equação 7:

$$R(\%) = \frac{A \cdot 100}{At} \quad (7)$$

Em que:

R(%) = porcentagem de recuperação;

A = absorbância obtida nas amostras;

At = absorbância teórica das amostras

5.1.2.2.5.3.8 ROBUSTEZ

Para se determinar a robustez do método, foi avaliada a estabilidade da solução mãe do extrato de *Morus nigra* L., assim como toda a preparação para a realização do teste foi mantida sem a proteção da luz. As amostras foram preparadas, em triplicata, e os resultados comparados com a absorbância obtida, por essa amostra, no teste de linearidade.

5.1.2.2.6 Determinação dos compostos fenólicos totais

Foram pesados 100 g da droga pulverizada, transferidas para um bécker e adicionado 100 mL de água quente a 70°C e 85°C, respectivamente para amostras de Pernambuco e Paraíba, deixando por 60 e 30 minutos tampados, para completa infusão e posteriormente filtrados que foi denominado a solução mãe (SM). Para determinação dos compostos fenólicos totais, 250 µL da SM dos extratos foram adicionados em balão volumétrico de 25 mL, 12,5 mL de água foi adicionada, com 1,2 mL do reagente Folin-Ciocalteu e 5 mL da solução de carbonato de sódio a 20% definido na pré-validação. O tempo de leitura e o comprimento de onda foram definidos na pré-validação, empregando-se a água como branco. A curva de calibração do ácido gálico foi utilizada para a quantificação de fenóis totais. Os resultados foram expressos em equivalente de ácido gálico (mg EAG/g)

5.1.2.2.7 Avaliação da atividade antioxidante frente ao radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila)

Para avaliação da atividade antirradical dos extratos pela desativação do radical livre DPPH de extratos de *Morus nigra* L. foram utilizados extratos das suas folhas e comparadas com amostras obtidas no estado de Paraíba e Pernambuco, os quais foram avaliados quanto a sua capacidade em doar hidrogênio para DPPH de acordo com (Riley; Chapman, 1958). Para tanto, 1 mg dos extratos foi diluído em 1 mL de metanol, dos quais foi realizada uma diluição seriada nas concentrações de 15,625 µg/mL - 1000 µg/mL. 40 µL destas concentrações foram adicionadas a 250 µL do reagente DPPH em uma placa de 96 poços. Após 30 min de incubação no escuro à temperatura ambiente, as absorbâncias foram lidas a 517 nm. A medida da absorbância do branco corresponde à concentração de DPPH da solução. Calculou-se a porcentagem de atividade de eliminação de radical DPPH pela seguinte fórmula 8:

$$\text{Eliminação DPPH (\%)} = \frac{Ac - Aa}{Ac} \times 100 \quad (8)$$

Onde,

Ac= Absorbância do controle

Aa= Absorbância da amostra

Com os resultados da aplicação da fórmula, foi traçado um gráfico da atividade de eliminação do DPPH contra as diferentes concentrações dos dois extratos e obteve-se o IC₅₀, que denota a concentração da amostra necessária para diminuir a concentração inicial de radicais DPPH em 50%.

5.1.2.2.8 Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicata, exceto quando mencionado contrário, e os valores foram expressos como média ± desvio padrão (n=3). As avaliações estatísticas foram realizadas por comparação entre vários grupos de estudo usando ANOVA oneway com pós teste t-stundet no software Graphpad Prism® 5 (EUA). Valor de p < 0,05 foi considerado significativo. O DoE foi realizado no software Statistica® 12. Os gráficos foram construídos e avaliados pelos softwares Origin® 8.5.

5.1.3 Resultados e discussão

5.1.3.1 Caracterização físico-química da droga vegetal

5.1.3.1.1 Perda por dessecação

O processo de secagem de matérias-primas vegetais é um processo crucial, a qual visa levá-las a baixos teores de umidade, o que permite a conservação adequada das mesmas, mantendo sua qualidade física e química por mais tempo. Nesse sentido, a determinação do teor de água em drogas vegetais está relacionada acerca do teor de água residual presente na droga vegetal e caso esse teor esteja acima de 10%, pode favorecer o desenvolvimento de fungos e bactérias, bem como possibilitar a atividade hidrolítica de diversas enzimas presentes nas células vegetais, levando a reações de oxidação e degradação dos princípios ativos. Sendo assim, é essencial metodologias de secagem apropriadas no processo de produção e tecnológico de matérias primas vegetais, a fim de assegurar padrões de qualidade, garantia e conservação da amostra (Borgo *et al.*, 2010).

De acordo com os dados obtidos para as amostras das folhas de *Morus nigra* L. do estado de Pernambuco e Paraíba pode-se observar que as amostras apresentaram teores de 8,23 % \pm 0,16 e 6,59 % \pm 1,11 respectivamente. A média do teor de umidade de todas as amostras ficou em 7,41%, estando dentro das especificidades exigidas pela legislação, pois de acordo com (Neves; Carvalho, 2012) o teor de umidade geral para drogas vegetais é de no máximo 8-14%, quando a espécie não se encontra na Farmacopeia.

Da mesma forma que, o resultado observado corrobora com o encontrado (Guizzo *et al.*, 2015) que analisou folhas de *Morus nigra* L. coletadas em Araras, São Paulo, e apresentou um valor de perda por dessecação de 7%, indicando desta forma que houve eficiência durante o processo de secagem.

5.1.3.1.2 Granulometria dos pós

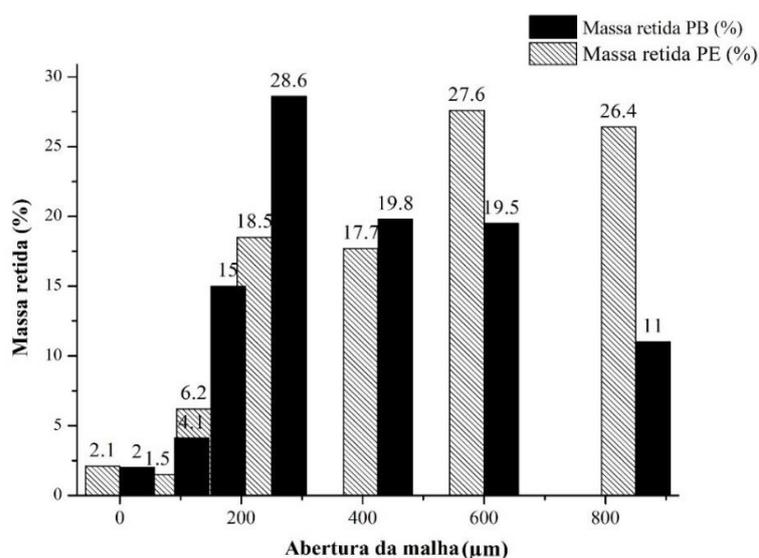
O pó resultante da moagem das folhas de *Morus nigra* L. foi submetido à análise granulométrica a fim de obter dados quantitativos sobre o tamanho médio e a distribuição de tamanho do material vegetal utilizado. Essa determinação é extremamente importante na indústria farmacêutica, pois condiciona um melhor direcionamento sobre a qualidade da droga vegetal, possibilitando a incorporação da matéria-prima em formulações, principalmente quando se trata de vários lotes ou épocas de coletas diferentes, conservação química e microbiológica assim como na obtenção de soluções extrativas, principalmente na velocidade de dissolução dos ativos presentes na droga vegetal, representando uma influência direta com a extração. (Baccarin *et al.*, 2009; Miganeh Waiss *et al.*, 2021; Rodríguez De Luna; Ramírez-Garza; Serna Saldívar, 2020).

Sendo assim, tamanho de partículas pequenas aumentam o teor de extração de fenóis total, pois aumentam a superfície de contato com o solvente, porém quando esse tamanho é bastante diminuído (<0,2 mm), além de comprometer a filtração, haverá maior disponibilidade de compostos ativos serem degradados durante a ruptura da parede celular. Enquanto que diâmetros maiores (>0,8 mm) diminuem a superfície do contato entre o vegetal e o líquido extrator, conseqüentemente impedem a absorção do líquido e diminuem a eficiência da extração (Abi-Khattar *et al.*, 2020; Chaves *et al.*, 2020; Makanjuola, 2017).

É possível inferir através da figura 7 que a distribuição granulométrica das amostras de *Morus nigra* L. demonstrou que as partículas se distribuíram predominantemente no tamis de 250 μ m e 600 μ m apresentando média de retenção de

28,6 % \pm 0,2 e 27,6% \pm 0,08 para Paraíba e Pernambuco respectivamente. O diâmetro médio (d_{50}) das partículas foi determinado pelo ponto de intersecção das curvas de retenção e passagem, como apresentado nas figuras 8 e 9, o valor obtido para o estado da Paraíba e Pernambuco respectivamente foi de 0,42 e 0,63 mm, enquanto o valor determinado pela equação proposta por Allen (2007) foi de 0,5 e 0,64 mm. Por não serem métodos exatos, como os microscópicos, esses valores apresentam diferença considerável, entretanto os valores aproximados dos diâmetros dos pós proporcionam uma elucidação da matéria prima vegetal obtida e conseqüentemente estão dentro do diâmetro de padrão aceitável para a extração ($0,2 < d_{50} < 0,8$).

Figura 7- Histograma de distribuição granulométrica das folhas moídas de *Morus nigra* L.



Fonte: Dados da pesquisa

Figura 8- Curvas acumulativas de retenção e passagem referente as amostras de *Morus nigra* L. Paraíba

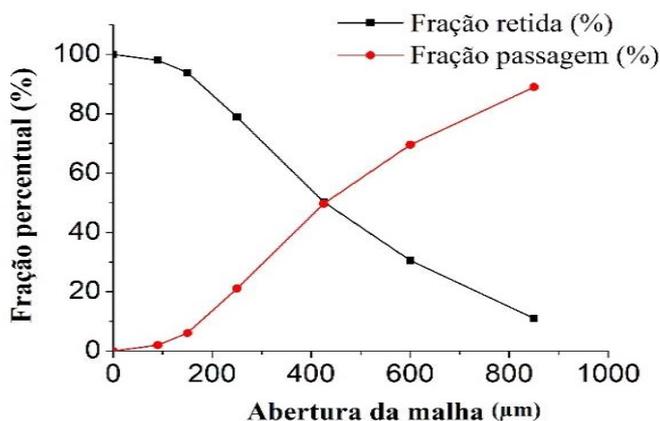
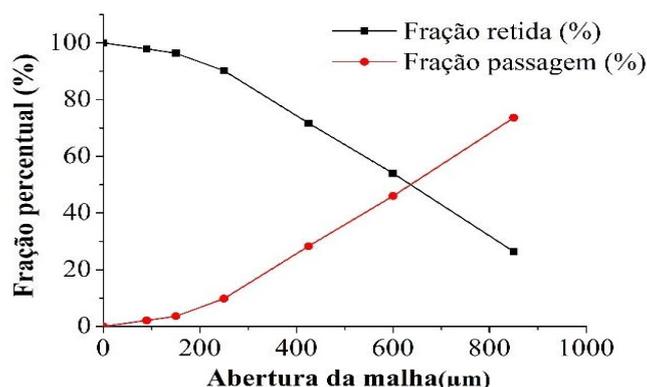


Figura 9- Curvas acumulativas de retenção e passagem referente as amostras de *Morus nigra* L. Pernambuco



Fonte: Dados da pesquisa

Já de acordo com as normas de especificações da Farmacopeia Brasileira 6ª edição (Brasil, 2019) observa-se que o pó da Paraíba é considerado como pó moderadamente grosso tendo em vista que o maior percentual de retenção foi na malha de 250 μm, enquanto que o de Pernambuco é considerado pó grosso, pois observa-se que a maior quantidade de partículas do pó fica entre 350 e 1000 μm.

5.1.3.1.3 Determinação de cinzas totais

A determinação de cinzas totais visa estabelecer o percentual de componentes de natureza inorgânica, representados por carbonatos, cloretos e óxidos de: silício, magnésio, alumínio, cálcio, ferro, potássio e sódio. Esses componentes podem ser intrínsecos ao material vegetal, ou seja, podem estar localizados dentro dos tecidos da planta e são substâncias não voláteis ou podem incluir substâncias não fisiológicas, ou seja, cinzas extrínsecas, introduzidas a partir do solo nas condições de campo durante o crescimento, colheita e armazenamento, como areia, pedra, gesso e terra aderente à superfície do material vegetal. (Leal *et al.*, 2020; Momin; Kadam, 2011). Desta forma, determinar o teor de cinzas totais dos materiais vegetais é importante, pois estabelece o limite máximo aceitável dos componentes inorgânicos, que de forma excedida, podem ser prejudiciais para à saúde.

As folhas de *Morus nigra* L. obtida das amostras de Paraíba e Pernambuco apresentaram uma média de cinzas totais de $6,39 \pm 0,008$ % e $7,05 \pm 0,018$ % respectivamente. As diferenças do teor de cinzas encontradas entre os estados, podem ser justificadas devido a diferenças sazonais, distribuição de água, bem como a localização da coleta e a forma de preparo do material. O resultado ficou abaixo de 14% conforme os

limites estabelecidos nas monografias de diversas drogas vegetais descrita na Farmacopeia Brasileira, o que representa quantidade adequada de material inorgânico nas matérias-primas analisadas, indicando que as mesmas não possuem excesso de terra e/ou areia. De acordo com os valores de cinzas totais obtidos, não houve a necessidade de realizar a determinação de cinzas insolúveis em ácido, uma vez que os teores não ultrapassaram o limite preconizado de 8%.

5.1.3.1.4 Análise fitoquímica preliminar por CCD

A determinação de um perfil fitoquímico por CCD é um método moderno de separação e apresenta diversas vantagens, pois possibilita isolar, localizar e avaliar os constituintes ativos através de uma técnica metodológica simples, com baixo custo, altos níveis de sensibilidade e especificidade, bem como, possibilita o armazenamento a longo prazo de informações analíticas (Borisov; Kanateva; Zhilyaev, 2021; Morlock *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2021). Essa técnica é eficaz para o controle de qualidade de extratos vegetais, justamente por apresentar complexidade em sua composição diferente e até superiores às dos compostos isolados, tornando-se útil para avaliação dos constituintes químicos da espécie e informações de seus grupos metabólicos presentes.

De acordo com as informações fornecidas, foram realizadas CCDs a fim de verificar a presença de polifenóis (flavonoides, derivados cinâmicos e taninos hidrolisáveis e condensados), nos extratos aquosos de *Morus nigra* L. A ordem de aplicação de amostra foi comercial, amostra da Paraíba, amostra Pernambuco e padrão. Os resultados indicaram a presença de flavonoides e derivados cinâmicos; e, ausência de taninos hidrolisáveis e condensados nas amostras, como demonstrado no quadro 2. Pode-se evidenciar os cromatogramas para as amostras que apresentaram ausência para taninos hidrolisados e condensados.

Quadro 2- Análise fitoquímica das folhas de *Morus nigra* L.

Metabólitos	Extratos secos	
	<i>Morus nigra</i> L. PB	<i>Morus nigra</i> L. PE
Derivado cinâmico	+	+
Flavonoides	+	+
Taninos hidrolisáveis	-	-
Taninos condensados	-	-

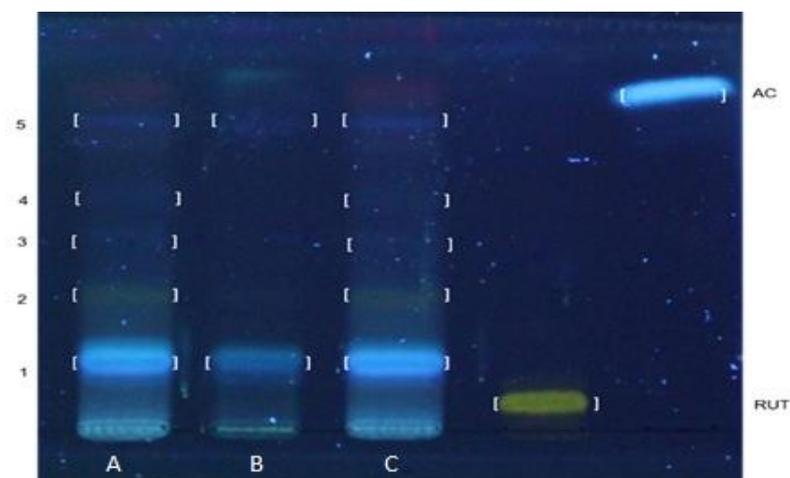
(-): Ausência; (+): Presença

A separação desses compostos se dá pela diferença de afinidade dos componentes de uma mistura pela fase estacionária. Desta forma, devido a utilização da placa de sílica ser utilizada como fase estacionária fixada (adsorvente) e uma fase móvel (eluente) ter características polar e apolar respectivamente, após as amostras serem aplicadas, a fase móvel arrastará mais os compostos menos adsorvidos na fase estacionária, separando-os dos compostos mais adsorvidos, ou seja, compostos mais polares são facilmente retidos e compostos apolares são eluídos mais rapidamente.

Sendo assim, baseado nos resultados anteriores, há ausência de manchas na mesma razão entre a distância percorrida pela mancha do padrão e a distância percorrida pelo eluente, bem como ausência de coloração semelhantes, quando comparado padrões de taninos condensados e hidrolisáveis com os extratos em estudo, é admitido desta forma ausência de taninos.

Enquanto que, na figura 10 é possível observar nas amostras a presença de bandas com colorações amareladas e azuladas, indicam a presença de flavonoides e derivados cinâmicos respectivamente, visto que os padrões de rutina e ácido cafeico apresentaram coloração semelhante e são classificados de acordo com a caracterização farmacogóstica de flavonoides e ácidos fenólicos, cujas fluorescências nesses tons de colorações são típicas para estes compostos derivatizados com cloreto de alumínio (Al_2Cl_3), revelador utilizado durante a análise. Esse fenômeno é desencadeado através da complexação das hidroxilas com o cátion Al^{3+} , que produz fluorescência quando observado na luz UV (Marques *et al.*, 2013)

Figura 10- Cromatoplaça referente a análise dos flavonoides e derivados cinâmicos



Legenda: A= amostra comercial); B=Extrato Paraíba; C=Extrato Pernambuco; RUT=rutina e AC=ácido cafeico.

Entretanto, supostamente há ausência de rutina e ácido cafeico nas amostras, pois apesar das colorações semelhantes, a mancha observada do extrato não eluiu na mesma razão que os padrões analisados, sendo necessário outras técnicas que apresentem alta resolução, eficiência e sensibilidade, como a cromatografia líquida de alta eficiência e/ou espectrometria de massas, para uma confirmação legitimada.

5.1.3.2 *Obtenção e caracterização da solução extrativa*

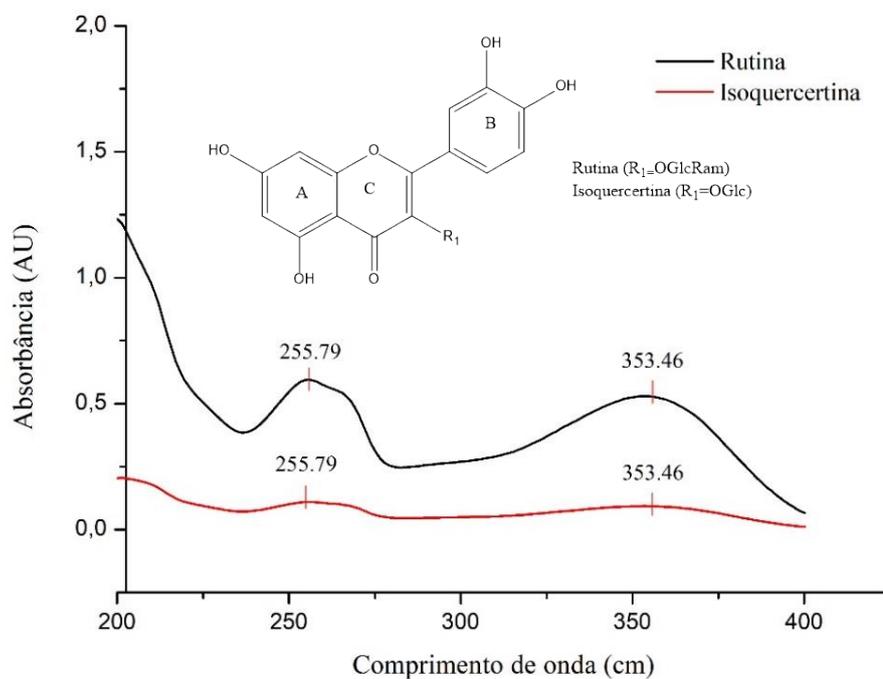
5.1.3.2.1 *Análise por CLAE-DAD para identificação dos compostos fenólicos e otimização do processo extrativo*

A análise de CLAE-DAD dos extratos de Pernambuco e Paraíba permitiram determinar o perfil cromatográfico, quantificar e identificar os compostos fitoquímicos majoritários de ambos os extratos. Para isso, foi considerado o tempo de retenção e espectro do UV de cada padrão analítico (isoquercetina, rutina e ácido clorogênico) em comparação com os picos dos cromatogramas de cada amostra analisada.

De forma preliminar, as condições de análises foram realizadas a partir do método desenvolvido por (Sampaio *et al.*, 2018), com adaptações. Sampaio *et al.* (2018) realizou a identificação e quantificação de rutina e isoquercetina de folhas de *Morus nigra* L. usando 0,01% de ácido trifluoroacético (TFA) como fase móvel A e acetonitrila como fase móvel B. Além disso, (Melo *et al.*, 2022a), identificou flavonoides, rutina e isoquercetina utilizando a mesma fase móvel estudada, portanto, a metodologia foi escolhida, para separação dos compostos das soluções extrativas. Os cromatogramas foram obtidos em uma detecção de comprimento de onda de 340 nm, por alcançar uma melhor resolução e absorção máxima dos compostos analisados (Silva *et al.*, 2021).

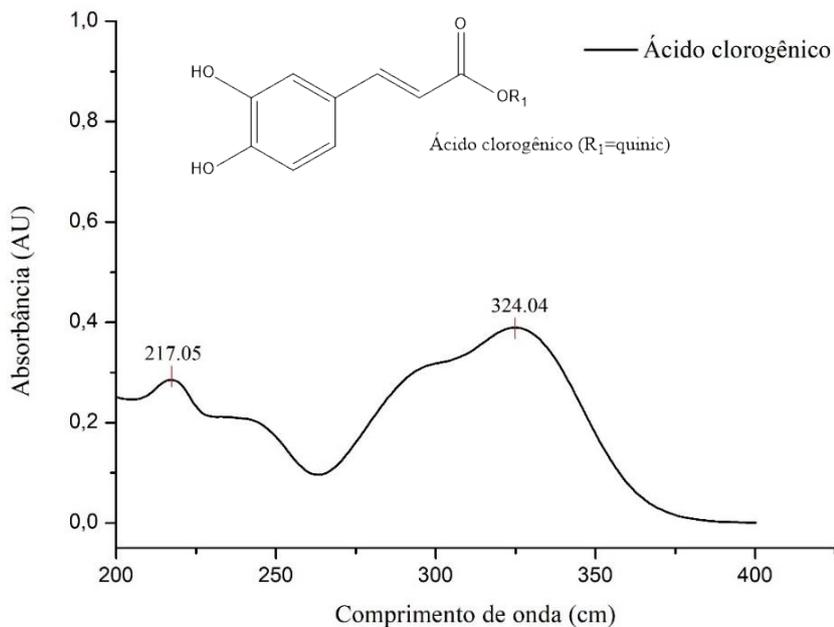
Para identificar a presença dos compostos fenólicos nas amostras, analisou-se o tempo de retenção e espectro UV do ácido clorogênico, isoquercetina e rutina. Desse modo, o ácido clorogênico apresentou um tempo de retenção de 21,45 min e picos de absorbância máxima (λ máx) em 217 e 352 nm, por sua vez, a isoquercetina em 29,63 min e λ máx em 255,3 e 353,4 nm e a rutina em 28,67 min em 255,28 e 355,29 nm. (Figura 11 e 12)

Figura 11- Sobreposição dos espectros UV-VIS dos flavonoides



Fonte: Dados da pesquisa

Figura 12- Espectro de absorção UV-VIS do ácido clorogênico

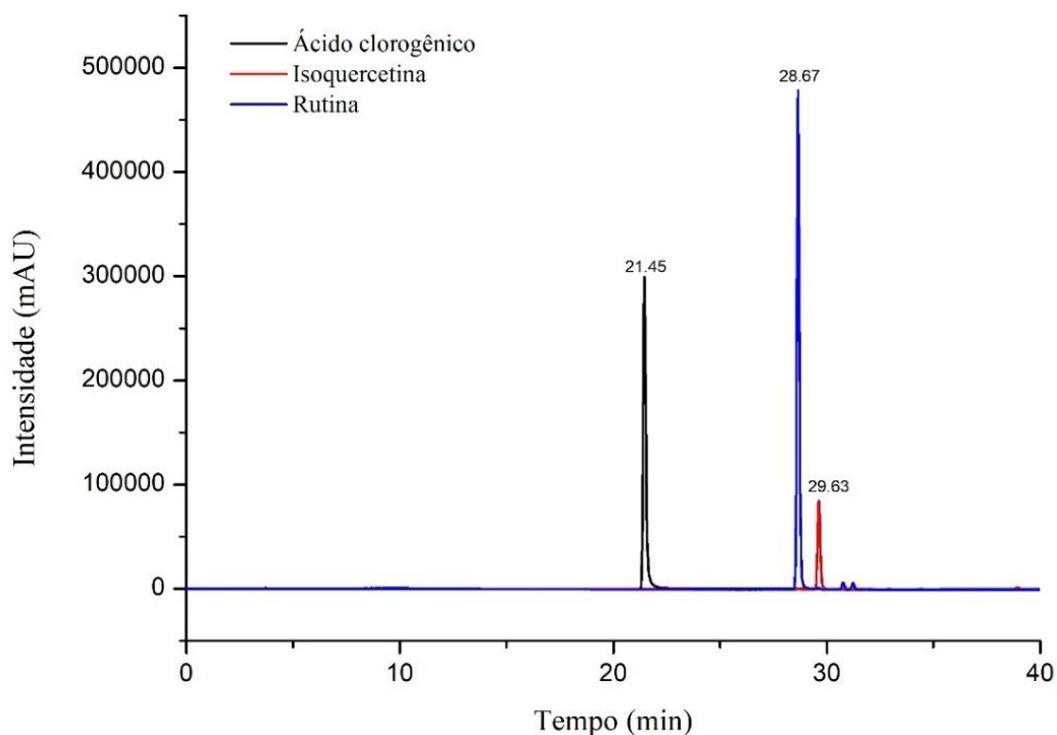


Através da figura 13, é possível observar os tempos de retenções dos padrões, que serviram como base para comparação e identificação dos compostos dos extratos, a partir da utilização do mesmo método cromatográfico. Considerando estes princípios, a análise

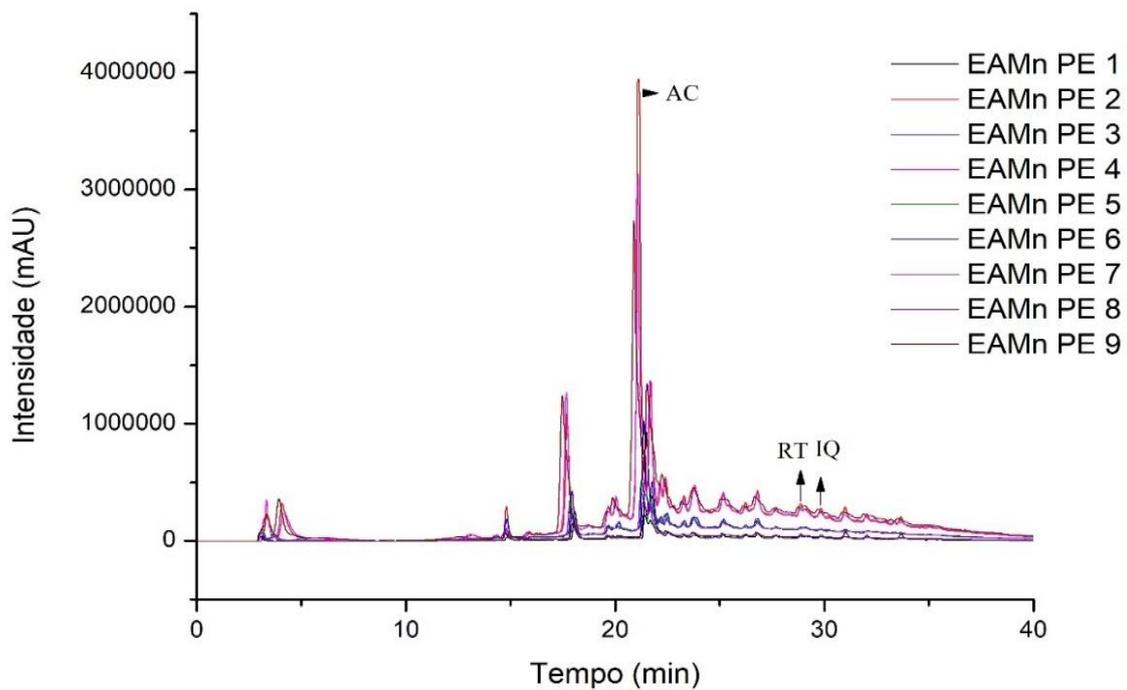
por CLAE-DAD dos extratos vegetais de *Morus nigra* L., permitiu a quantificação do ácido clorogênico ($y= 15000,85x - 127832,58$; $R^2=0,99$), isoquercetina ($15718,21x - 14451,08$; $R^2= 0,99$) e rutina ($y=20815,11x - 99591,26$; $R^2=0,99$), marcadores analíticos já relatados anteriormente e com fatores de retenção próximos ao encontrado por outros autores. Apenas 3 picos foram identificados: AC (pico 1), RUT (pico 2) e ISO (pico 3) com tempo de retenção de 21,45, 28,67 e 29,63 minutos respectivamente (de Melo *et al.*, 2022b; Pedrita *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2020).

Já nas figuras 14 e 15 são demonstrados os perfis cromatográficos dos extratos aquosos de *Morus nigra* L. do estado de Pernambuco e Paraíba respectivamente, obtidos a partir do planejamento experimental. A partir da análise de CLAE-DAD foram observados picos da isoquercetina, rutina e ácido clorogênico nos extratos estudados, sendo detectados a partir do tempo de retenção e espectros UV idênticos ao dos padrões estudado nas mesmas condições cromatográficas, sendo assim, esses marcadores foram utilizados como padrões majoritários, a fim de obter através do planejamento experimental a sua maximização.

Figura 13- Perfil cromatográfico dos padrões analíticos em 340 nm.

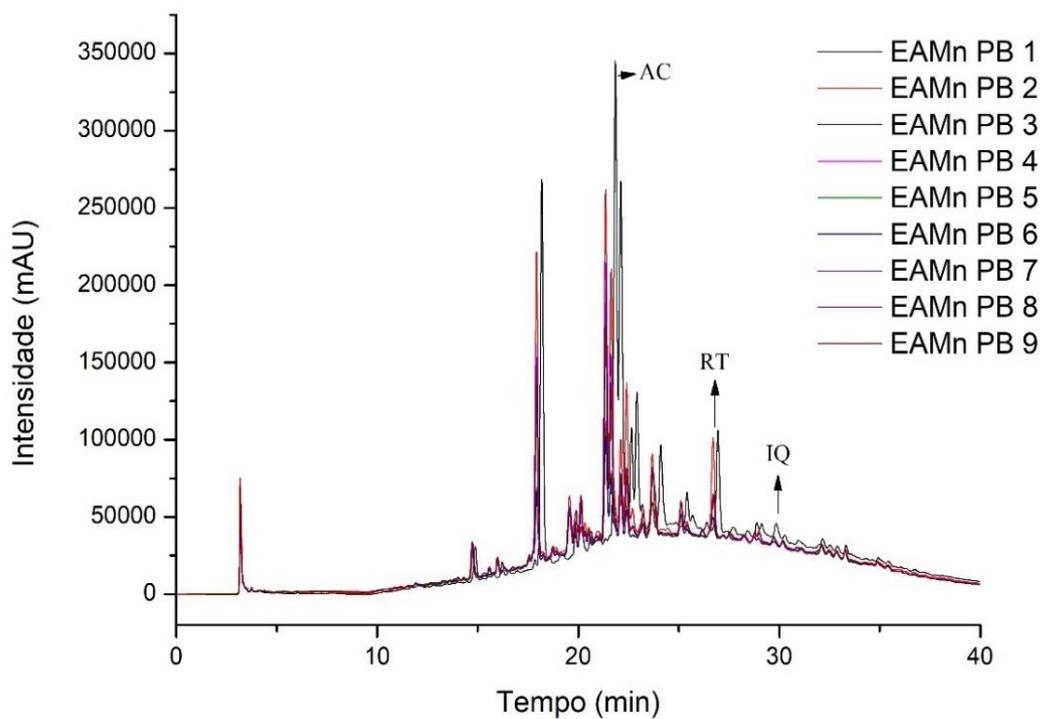


Fonte: Dados da pesquisa

Figura 14- Perfil dos extratos de *Morus nigra* L. de Pernambuco

Legenda: AC= ácido clorogênico; RT= rutina; IQ= isoquercetina

Fonte: dados da pesquisa

Figura 15- Perfil cromatográfico do extrato de *Morus nigra* L. de Paraíba

Legenda: AC= ácido clorogênico; RT= rutina; IQ= isoquercetina

Fonte: Dados da pesquisa

A comprovação além do tempo de retenção, é observada através da sobreposição dos espectros de absorção ultravioleta, característico de flavonoides com absorção (240-280 e 300-500 nm). A primeira banda (255,79nm) relacionado ao anel A do anel do flavonoide e a segunda (353,46nm) relacionada com a absorção do anel B (Rasul *et al.*, 2019).

Enquanto que para o AC exibe uma intensa banda de absorção em 324 nm devido a transição eletrônica no anel benzênico e da cadeia carbônica, da mesma forma que a banda em 217 nm é caracterizada por essa mesma transição (Belay; Gholap, 2009; Thomas; Sukumaran; Sudarsanakumar, 2019-; Zhang, Yuanyuan *et al.*, 2021).

5.1.3.3 Planejamento experimental para aprimoramento da eficiência de extração

O objetivo da primeira fase do estudo foi o processo de extração e o aumento da eficiência do método extrativo, a partir da determinação de compostos por meio de design of experiments (DoE). A metodologia DoE foi preferida à abordagem empírica para fornecer uma compreensão mais profunda do processo de extração, das interações entre as variáveis e pela capacidade de propor formulações ótimas dentro do domínio experimental. Na figura 16 é demonstrada o fluxograma de obtenção dos extratos aquosos das folhas de *Morus nigra* L. a partir do método de infusão, baseado nas variáveis do planejamento experimental.

Figura 16- Fluxograma de obtenção do extrato aquoso de *Morus nigra* L.



Os coeficientes de determinação (R^2) alcançados para a extração obtidas de Pernambuco e Paraíba foram: $R^2=100\%$; $R^2=99,92\%$ e $R^2=94,34\%$; $R^2=98,89\%$, $R^2=94,66\%$ e $R^2=96,27\%$ para isoquercetina, rutina e ácido clorogênico respectivamente, indicando desta forma, a porcentagem da resposta explicada pelo modelo. Portanto, os valores estão muito próximo de 100, demonstrando um ajuste de alta qualidade capaz de explicar grande parte da variabilidade apresentada pelas respostas estudadas.

A fim de comprovar estatisticamente se os dados apresentam a suposta relação entre os níveis de uma ou mais resposta do teste, foi utilizada a análise de variância (ANOVA) da regressão para o teste da significância do modelo, utilizando a estatística t-student para o teste de hipóteses. A ANOVA é uma técnica estatística usada para comparar a distribuição de uma ou mais variáveis de teste em amostras independentes. Para isso, as hipóteses testadas pela análise de variância na regressão são: hipótese nula (H_0) onde não há uma associação significativa entre o termo e resposta, ou seja, as médias amostrais estão centradas no mesmo valor, sugerindo que os níveis utilizados apresentaram a mesma variabilidade; enquanto que a hipótese alternativa (H_1) pronuncia que há correlação entre as variáveis, ou seja, pelo menos um nível da variável tem significativamente valores maiores para a minha resposta.

Ao analisar os dados, utilizando o modelo de distribuição de Fisher-Snedecor (F) descartam a falta de ajuste do modelo em um nível de confiança de 95% (Tabela 4). Os valores esperados sugerem, que para o extrato de *Morus nigra* L. de Pernambuco, utilizando como variável dependente a isoquercetina, o valor de $F_{\text{calculado}(1,1)}$ foi maior que o $F_{\text{crítico}(1,1)}$, que assume um valor no modelo de distribuição tabelado de $F_{c(1,1)}=161,4$.

Portanto, aceita-se H_1 e recusa-se H_0 e conclui que para as variáveis de temperatura, droga:solvente, e para as interações entre temperatura e tempo de extração, temperatura e droga:solvente e tempo de extração e droga:solvente estão correlacionadas com a resposta. Da mesma forma, é possível advertir, que o nível descritivo (p-valor) é menor ou igual ao nível de significância de 5%, concluindo que há associação estatisticamente significativa entre a variável de resposta e o termo para as variáveis e interações apresentadas. Enquanto que para as variáveis dependentes rutina e ácido clorogênico, apenas a relação entre droga:solvente foi significativo, ou seja, o fator droga:solvente influenciou o método extrativo, considerando-se o valor de $p=0,05$.

Os coeficientes de determinação (R^2) alcançados para a extração obtidas de Pernambuco e Paraíba foram: $R^2=100\%$; $R^2=99,92\%$ e $R^2=94,34\%$; $R^2=98,89\%$, $R^2=94,66\%$ e $R^2=96,27\%$ para isoquercetina, rutina e ácido clorogênico respectivamente,

indicando desta forma, a porcentagem da resposta explicada pelo modelo. Portanto, os valores estão muito próximo de 100, demonstrando um ajuste de alta qualidade capaz de explicar grande parte da variabilidade apresentada pelas respostas estudadas.

Enquanto que para os extratos obtidos das folhas de *Morus nigra* L. da Paraíba, foi avaliado o melhor modelo estatístico a fim de obter uma maximização da resposta a partir dos fatores estudados. Desta forma, o modelo polinomial de segunda ordem foi capaz de descrever satisfatoriamente os dados obtidos para as respostas dos compostos fenólicos isoquercetina, rutina e ácido clorogênico, no qual, demonstrou comportamentos distintos na região experimental delineada para o estudo comparada com o extrato de Pernambuco para o teor de isoquercetina. Assim, foi observado que a variável droga:solvente e a interação da temperatura com a proporção droga:solvente de forma linear, juntamente com a variável quadrática do tempo de extração para a resposta Y_1 apresentaram-se significativas. Enquanto que para rutina e ácido clorogênico, mantiveram-se nas condições apresentadas pelo extrato de Pernambuco, com apenas a variável linear droga:solvente significativa considerando-se o valor de $p=0,05$.

5.1.3.3.1 Efeito das variáveis de entrada (X 1-3) para o teor dos polifenóis (Y1-3)

O doseamento dos compostos isoquercetina, rutina e ácido clorogênico dos extratos desenvolvidos foram avaliados pela técnica de CLAE-DAD nas 9 formulações. A Tabela 3 exibe as variáveis independentes e dependentes incluídas no desenho experimental através do planejamento fatorial fracionado.

O gráfico de pareto demonstra a conexão entre as variáveis de entrada e a resposta, através dos efeitos estimados padronizado (razão entre os efeitos estimados e o desvio padrão correspondente) que cada variável exerce na resposta avaliada. Por isso, neste gráfico é possível obter uma melhor compreensão do teor dos compostos polifenóis em relação as variáveis independentes e suas interações.

Os valores positivos (sinal +) indicam uma influência positiva na resposta, enquanto os valores negativos mostram uma influência negativa (sinal -) na resposta, ou seja, os sinais referem-se aos níveis mais altos ou baixos da variável independente. A linha vertical é indicativa do limite de rejeição da hipótese nula ($p=0,05$) devendo assim ser considerados, para a avaliação da resposta, apenas os efeitos localizados a direita desta reta.

No gráfico, figura 17A, 17B e 17C é possível observar os fatores apresentados por meio do modelo linear. Os parâmetros de temperatura (X_1) e proporção de droga:solvente (X_3),

frente ao teor de isoquercetina, rutina e ácido clorogênico demonstraram de acordo com as barras horizontais, a influência significativa ao método extrativo, pois apresentam-se à direita da reta vertical, indicativa do limite de rejeição da hipótese nula.

Desse modo, a proporção droga:solvente influenciou positivamente a extração, parecendo ser a variável mais importante sobre o teor de isoquercetina (17A), rendendo o teor do composto fenólico mais alto.

O uso da temperatura, influenciou positivamente a extração, enquanto que o tempo de extração teve efeito insignificante ($p > 0,05$), mas com o termo quadrático influenciando negativamente na variável resposta. Para ambas variáveis respectivamente, significa que o maior nível (+1) e o menor nível (-1) são responsáveis por maximizarem a resposta, ou seja, aumentar o teor de isoquercetina.

Enquanto que para resposta rutina e ácido clorogênico, figura 17B e 17C respectivamente, demonstraram que para os efeitos lineares, apenas a proporção droga:solvente exerceu influência positiva no processo extrativo, isto é, o aumento da grandeza desta variável reflete em um aumento na eficiência de extração desses compostos fenólicos.

Já para o extrato obtidos das folhas da Paraíba (Figura 18), observou uma forte influência linear positiva da proporção droga:solvente e negativa da interação X_1X_3 e uma influência quadrática negativa do tempo de extração, enquanto que para a rutina e ácido clorogênico mantiveram-se nas mesmas condições que o extrato de Pernambuco, ou seja, uma forte influência linear positiva da proporção droga:solvente sobre a resposta.

Considerando que dentre os compostos fenólicos e variáveis avaliadas, apenas as interações da isoquercetina foram consideradas estaticamente significativas. A fim, de obter uma melhor visualização de operação para obtenção dos extratos obtidos a partir das folhas de *Morus nigra* L. as apresentações gráficas (figura 19) a seguir, referem-se a superfície de resposta em função das variáveis codificadas para resposta. A modelagem de superfície de resposta é um método estatístico comumente usados para otimizar as variáveis do processo e construir modelos quadráticos que ilustram a relação estatística entre os parâmetros considerados.

Tabela 3- Matriz de design experimental e resultados obtidos para o teor dos polifenóis.

Experimento	Temperatura de infusão (°C) (X ₁)	Tempo de extração (min) (X ₂)	Proporção droga: Solvente (p/v) (X ₃)	Y ₁		Y ₂		Y ₃	
				PB	PE	PB	PE	PB	PE
EaMn1	70	30	4:250	0,95 ± 0,00	4,17 ± 0,09	5,06 ± 0,01	6,94 ± 0,02	9,26 ± 0,15	50,95 ± 1,10
EaMn2	70	60	1:10	24,97 ± 0,30	24,66 ± 0,45	22,31 ± 1,83	18,02 ± 0,49	25,82 ± 5,84	218,57 ± 1,26
EaMn3	70	90	1:25	11,27 ± 0,09	9,18 ± 0,05	16,34 ± 0,03	9,37 ± 0,01	16,41 ± 1,44	58,57 ± 2,31
EaMn4	85	30	1:10	27,70 ± 0,25	22,24 ± 0,03	27,30 ± 1,82	15,62 ± 0,44	32,81 ± 1,41	153,17 ± 1,76
EaMn5	85	60	1:25	1,07 ± 0,01	9,85 ± 0,02	6,23 ± 0,05	8,45 ± 0,43	9,62 ± 0,10	43,48 ± 1,01
EaMn6	85	90	4:250	0,97 ± 1,38	4,09 ± 0,97	6,71 ± 1,19	6,11 ± 0,34	9,93 ± 3,13	20,94 ± 0,49
EaMn7	100	30	1:25	9,11 ± 3,59	9,90 ± 0,11	9,34 ± 2,86	8,13 ± 0,00	21,03 ± 1,69	40,28 ± 1,12
EaMn8	100	60	4:250	4,01 ± 0,07	7,05 ± 0,09	7,28 ± 0,04	6,37 ± 0,03	17,18 ± 0,07	25,82 ± 0,30
EaMn9	100	90	1:10	23,88 ± 0,91	23,16 ± 0,39	16,38 ± 7,34	15,40 ± 0,58	29,78 ± 5,51	199,08 ± 2,71

Y₁= isoquercetina, Y₂= rutina e Y₃=ácido clorogênico

Fonte: Dados da pesquisa

Tabela 4- ANOVA para o teste de falta de ajuste para a isoquercetina, rutina e ácido clorogênico obtidos de *Morus nigra* L. Pernambuco

Fator	Isoquercetina					Rutina					Ácido clorogênico				
	SS	DF	MS	F	P	SS	D F	MS	F	P	SS	D F	MS	F	p
Temperatura (L)	0,77	1	0,77	3216	0,0112	3,28	1	3,28	25,0	0,1257	659,35	1,00	659,35	0,48104	0,559675
Tempo de extração (L)	0,00	1	0,00	0	0,8456	0,01	1	0,01	0,0	0,8734	194,76	1,00	194,76	0,14209	0,742449
Tempo de extração (Q)	9,70	1	9,70	40598	0,0032	4,70	1	4,70	35,8	0,1054	37305,02	1,00	37305,02	27,21642	0,034834
Droga:solvente (L)	532,80	1	532,80	2229081	0,0004	146,20	1	146,20	1115,0	0,0191	5764,63	1,00	5764,63	4,20567	0,0176766
Temperatura x Tempo de extração (L)	45,48	1	45,48	190281	0,0015	15,27	1	15,27	116,4	0,0588	1840,70	1,00	1840,70	1,34291	0,366187
Temperatura x Droga:solvente (L)	27,54	1	27,54	115233	0,0019	9,37	1	9,37	71,4	0,0750	209,69	1,00	209,69	0,15298	0,733436
Tempo de extração: droga solvente	3,83	1	3,83	16039	0,0050	0,83	1	0,83	6,3	0,2406	2741,36	2,00	1370,68		
Error	0,00	1	0,00			0,13	1	0,13			48454,12	8,00			
Total SS	591,22	8				166,88	8								

SS = soma dos quadrados, DF= graus de liberdade, MS= quadrado médio, F= estatística F, p= valor p

Tabela 5- ANOVA para o teste de falta de ajuste para a isoquercetina, rutina e ácido clorogênico obtidos de *Morus nigra* L. Paraíba

Fator	Isoquercetina					Rutina					Ácido clorogênico				
	SS	DF	MS	F	P	SS	D F	MS	F	P	SS	D F	MS	F	p
Temperatura (L)	0,0 1	1	0,01	0,00	0,9766	19,16	1	19,16	1,413	0,3566	45,39	1	45,39	3,851	0,1887
Tempo de extração (Q)	123 ,58	1	123,5 8	22,64	0,0415	51,46	1	51,46	3,795	0,1908	101,00	1	101,00	8,570	0,0996
Droga:solvente (L)	831 ,10	1	831,1 0	152,23	0,0065	367,20	1	367,20	27,079	0,0350	451,38	1	451,38	38,301	0,0251
Temperatura x Tempo de extração (L)	86, 94	1	86,94	15,92	0,0574	25,02	1	25,02	1,845	0,3073	52,29	1	52,29	4,437	0,1698
Temperatura x Droga:solvente (L)	120 ,06	1	120,0 6	21,99	0,0426	48,88	1	48,88	3,605	0,1980	94,11	1	94,11	7,985	0,1057
Tempo de extração: droga solvente	12, 04	1	12,04	2,20	0,2759	0,79	1	0,79	0,058	0,8316	12,11	1	12,11	1,027	0,4174
Error	10, 92	2	5,46			27,12	2	13,56			23,57	2	11,79		
Total SS	989 ,85	8				508,25	8				632,71	8			

SS = soma dos quadrados, DF= graus de liberdade, MS= quadrado médio, F= estatística F, p= valor p

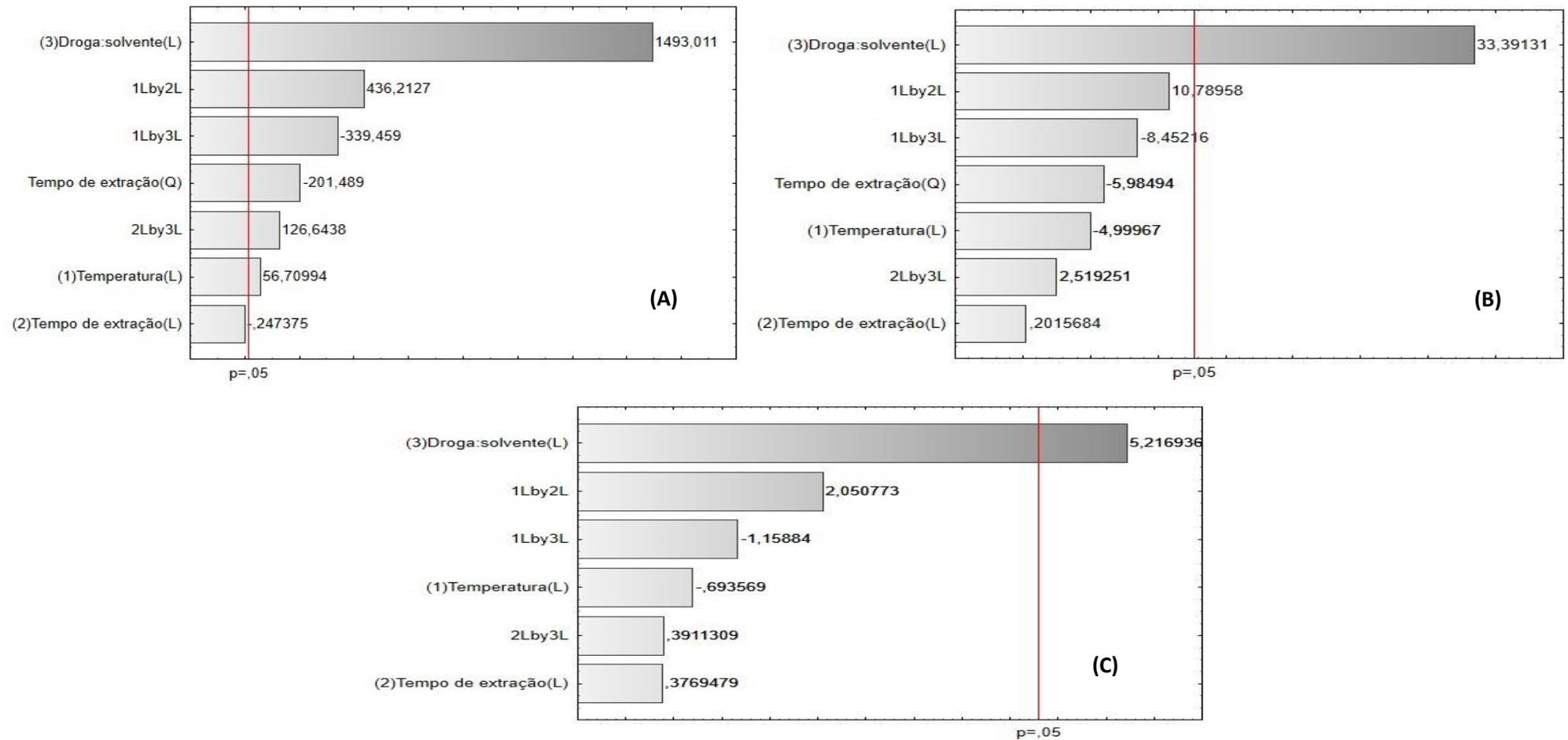
Fonte: Dados da pesquisa

Como ilustrado na figura 19 (A e B), a variável tempo de extração apresentou uma forte influência quadrática negativa sobre a resposta de isoquercetina, o que pode ser observado pela pronunciada curvatura nas superfícies de resposta para esta variável, tanto em relação à variável temperatura quanto em relação à variável droga:solvente, significando que as o tempo de extração mediano proporcionaram maior eficiência na extração de isoquercetina e que esta eficiência diminui drasticamente quando se afastam em direção aos valores menores ou maiores. Enquanto as variáveis de temperatura e droga:solvente (Figura 19) apresentaram influência linear positiva sobre o processo extrativo, podendo ser observada pela sutil inclinação apresentada por estas duas variáveis em relação à variável dependente nos respectivos gráficos de superfície.

Ao observar as interações, foi apresentado melhores resultados na concentração de isoquercetina ($> 25\mu\text{g/mL}$), através da diminuição da temperatura e com o tempo de extração de forma intermediária, porém uma menor concentração foi alcançada com a diminuição do tempo de extração ou se o tempo de extração fosse maximizado e a temperatura se mantivesse no nível intermediário. Enquanto que, o aumento da proporção droga:solvente levou à ampliação da concentração de isoquercetina, através da diminuição de temperatura e o tempo de extração mediano, corroborando com os dados expostos por (Bindes *et al.*, 2019), sugerindo que altas temperaturas (acima de 90°C) e um curto tempo de extração (5-10 min), ou temperatura mais baixa ($60\text{-}80^{\circ}\text{C}$) e maior tempo de extração (acima de 20 min), podem evitar a degradação de alguns compostos fenólicos, proporcionando uma maior concentração.

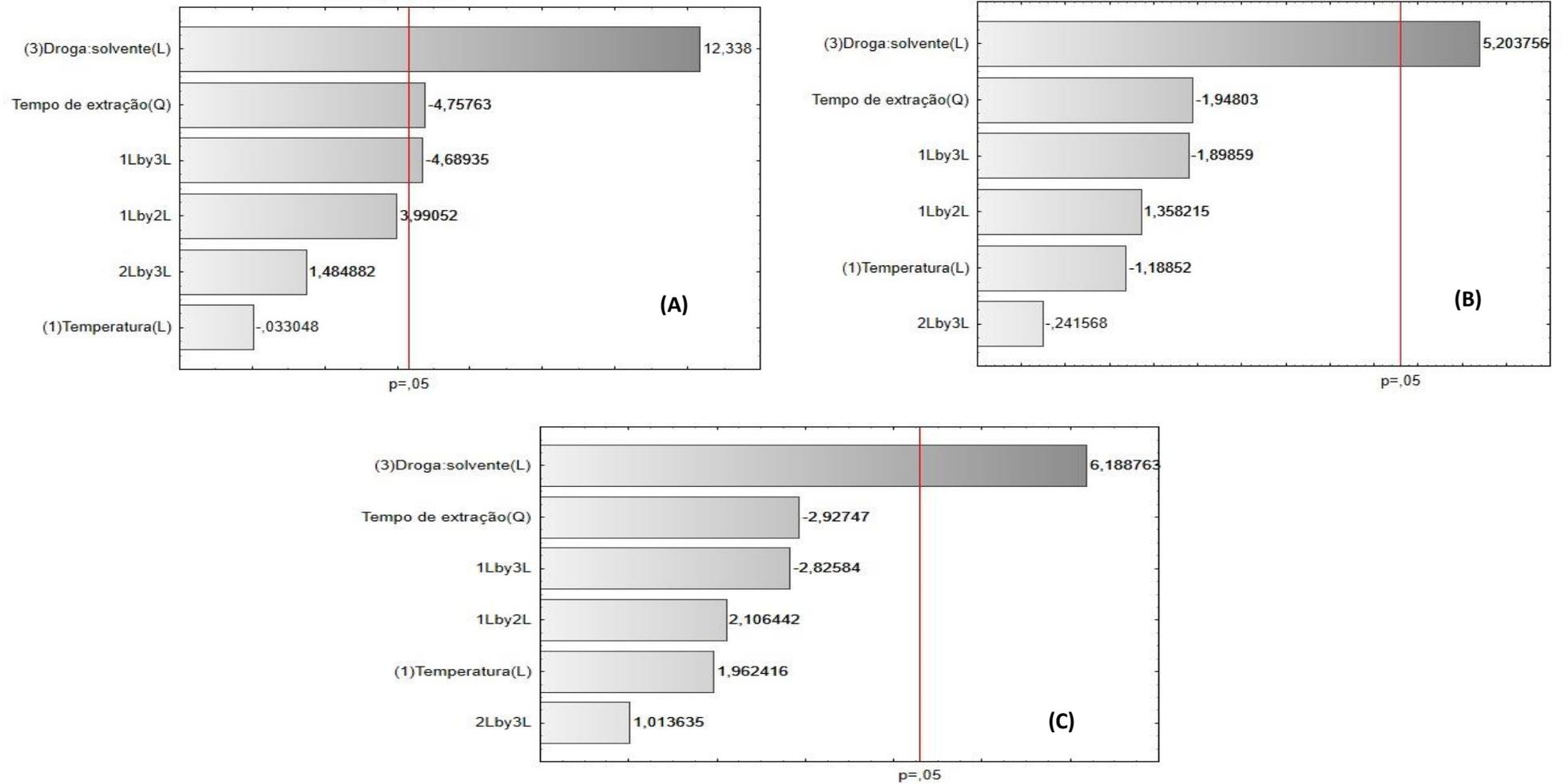
Assim, pode-se dizer que para a interação X_1X_3 por atuar negativamente na variável resposta e a proporção droga:solvente afetar em maior magnitude, para obter a maximização do teor de isoquercetina a temperatura estaria em seu menor nível (-1) e a proporção droga:solvente em seu maior nível (+1), da mesma forma que para a interação X_1X_2 e X_2X_3 , o tempo de extração manteria no nível intermediário e a temperatura no seu menor nível (-1) e a proporção droga:solvente em seu maior nível (+1) respectivamente. Desta forma, de acordo com os dados obtidos da análise do planejamento fatorial para o EaMn de Pernambuco foram determinadas as melhores condições do processo extrativo. Considerando o teor de isoquercetina, os melhores parâmetros foram: temperatura (70°C), tempo de extração (60 min) e proporção droga:solvente (25:250). A partir dos resultados obtidos, as condições ideais do extrato padronizado foram representadas pelo EA₂ do planejamento experimental do item 5.1.2.2.3.1

Figura 17- Influência das variáveis X1 (T °C), X2 (T min) e X3 (Droga:solvente) do extrato de Pernambuco e de suas interações sobre as variáveis respostas de isoquercetina(A), rutina (B) e ácido clorogênico (C).



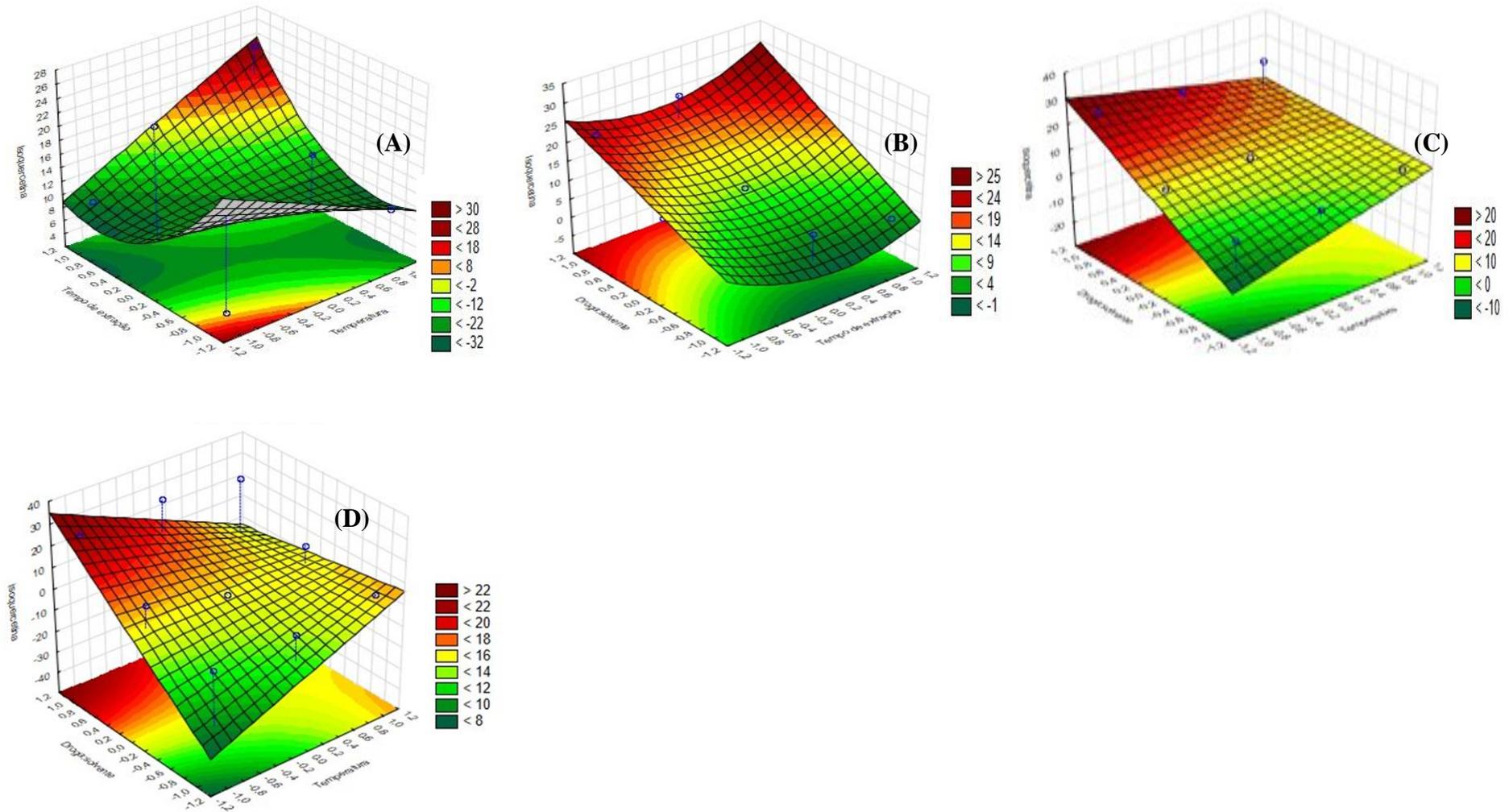
Fonte: Dados da pesquisa

Figura 18- Influência das variáveis X1 (T °C), X2 (T min) e X3 (Droga:solvente) do extrato da Paraíba e de suas interações sobre as variáveis respostas de isoquercetina (A), rutina (B) e ácido clorogênico (C).



Fonte: Dados da pesquisa

Figura 19- Superfícies de resposta que descrevem as interações das variáveis em relação ao teor de isoquercetina para o extrato obtido de Pernambuco (A, B e C) e da Paraíba (D) em função da razão temperatura (X1), tempo de extração (X2) e droga:solvente (X3).



Já para o extrato obtido na Paraíba, a variável linear droga:solvente apresentou uma influência linear positiva observada pela inclinação do gráfico, ou seja, sua eficiência é diminuída diretamente proporcional à medida que a proporção é levada ao seu menor nível (-1), tanto para as variáveis respostas de isoquercetina, quanto para rutina e ácido clorogênico. Para a variável tempo de extração quadrático, o menor nível (-1) obteve uma maior concentração de isoquercetina (>12µg/mL) sendo diminuída drasticamente em direção aos valores intermediários e aumentada em direção ao nível máximo.

Ao estudar influência mútua das variáveis sobre as respostas isoquercetina, rutina e ácido clorogênico com o extrato da Paraíba, observou-se apenas uma interação significativa, proveniente da interação entre a temperatura e a proporção:droga solvente, para o teor de isoquercetina. Assim, mantendo-se as condições da temperatura no seu nível intermediário, o teor de isoquercetina foi aumentado à medida que a proporção droga:solvente foi aumentado do nível médio ao nível máximo, obtendo desta forma a maximização do teor isoquercetina (>27µg/mL). Já quando nível de droga:solvente foi diminuído até o ponto médio, a concentração de isoquercetina foi diminuída drasticamente com diferenças mínimas do nível médio (<1,07) ao menor nível (<0,98µg/mL).

Sendo assim, considerando os dados apresentados, para o extrato da Paraíba obteve-se uma maximização da resposta quando os parâmetros estavam apresentados: temperatura (0), tempo de extração (-1) e proporção droga:solvente (+1), representado pelo EA₄ do desenho experimental.

A aplicação da metodologia de design de experimentos resultou em uma equação, chamada de modelo, que descreve a dependência entre a resposta (Y 1-3), e as variáveis de entrada (X 1-3). Depois da execução de todos os experimentos foi obtida uma equação de segunda ordem:

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_2^2 + b_4X_3 + b_5X_1X_2 + b_6X_1X_3 + b_7X_2X_3 \quad (9)$$

onde Y é a variável dependente (resposta), b₀ é a média dos valores de resposta, b₁-7 são coeficientes de regressão, X₁, X₂, X₃ são efeitos individuais que mostram como a resposta varia devido a um fator quando todos os outros são mantidos constantes, X₂² indica a dependência não linear do fator correspondente. X₁X₂, X₂X₃ e X₁X₃ são efeitos interativos obtidos quando dois fatores mudam simultaneamente.

Por isso, o modelo estatístico delineado e testado nesse estudo forneceu equações de predição levando em consideração apenas a influência significativa das variáveis (2), (3) e (4) para respostas de isoquercetina (ISO), rutina (RUT) e ácido clorogênico (AC) obtidos do extrato de Pernambuco, respectivamente:

$$\text{ISO: } 9,83 + 0,36X_1 + 4,40X_2^2 + 9,42X_3 + 4,76X_1X_2 - 6,42 X_1X_3 + 1,38 X_2X_3 \quad (10)$$

$$\text{RUT: } 8,44 + 4,94X_3 \quad (11)$$

$$\text{AC: } 90,09 + 78,85 X_3 \quad (12)$$

Enquanto, que para o extrato da Paraíba, o modelo estatístico delineado foi:

$$\text{ISO: } 1,06 + 15,72X_2 + 11,76X_3 - 13,41X_1X_3 \quad (13)$$

$$\text{RUT: } 6,23 + 7,82X_3 \quad (14)$$

$$\text{AC: } 9,61 + 8,67X_3 \quad (15)$$

5.1.3.4 Caracterizações das soluções extrativas

5.1.3.4.1 Determinação do pH

O pH é uma medida eletrométrica que avalia a concentração de íons hidrogênio em uma amostra, indicando acidez, neutralidade ou alcalinidade em uma solução aquosa. Segundo a teoria de Arrhenius, os ácidos são compostos que reagem com água e sofrem ionização, originando como único cátion o hidrônio (H_3O^+). Já as bases são compostas que, em meio aquoso, sofrem dissociação iônica, liberando como único ânion a hidroxila (OH^-). Por isso, quanto mais hidrônios houver no meio, mais ácida será a solução. Por consequência, podemos dizer que quanto mais íons OH^- houver no meio, mais básica ou alcalina será a solução. (Instituto Adolfo Lutz, 2008).

Alguns fatores são importantes para determinação do pH, como a influência da palatabilidade, no desenvolvimento de microrganismo, pois quanto mais ácido for, menor será a capacidade de reprodução de microrganismos; no conhecimento da constituição química de uma solução, pois valores elevados de acidez podem atuar negativamente; atuam como sensor da estabilidade, sinalizando prováveis alterações químicas que possam estar ocorrendo no meio extrativo, dentre outros (Hoffman F.L., 2001; Longhini *et al.*, 2007; Silveira; Maia; Coelho, 2012).

Assim, a análise do pH do extrato aquoso das folhas da amora apresentaram baixa variação e um pH ligeiramente básico, estando os valores entre $7,95 \pm 0,10$ e $8,08 \pm 0,12$ para o estado da Paraíba e Pernambuco, respectivamente. A hipótese presumível para esse comportamento é que em pH 8 (valor de pH ligeiramente básico), o extrato das folhas de *Morus nigra* L. contenha mais grupos funcionais carregados negativamente, devido a uma maior concentração de íons OH^- no meio.

5.1.3.4.2 Determinação da densidade relativa

A densidade relativa é a razão entre a densidade (massa de uma unidade de volume) de uma substância e a densidade de um dado material de referência. Alguns fatores afetam o valor da densidade, dentre elas: a temperatura, pois diferentes temperaturas gera uma maior aproximação, promovendo a diminuição da temperatura e aumento da densidade ou distanciamento das partículas da substância, requerendo o aumento da temperatura e diminuição da densidade; a composição do material ao qual está inserido, pois substâncias puras possuem seus próprios valores de densidade, porém em solução resultará em uma densidade intermediária.

Assim, o valor obtido para a densidade relativa do extrato aquoso de *Morus nigra* L. no estado da Paraíba e Pernambuco respectivamente foi de $1,086 \pm 0,02$ e $1,011 \pm 0,01$. A água foi utilizada como referência na temperatura de 23°C e os valores estão próximos ao da água, justamente por ter sido utilizado como líquido extrator. Possivelmente o extrato da Paraíba por ser mais concentrada, obteve uma densidade maior, pois quanto mais a substância estiver dissolvida no meio, a solução ficará mais densa.

5.1.3.4.3 Determinação do Resíduo Seco em Extratos Fluidos

O teor de resíduo seco permite visualizar o potencial de extração da água, determinando a quantidade de substâncias solúveis nesse solvente. No processamento industrial a determinação do teor de sólidos solúveis é importante, visto que elevados teores desses constituintes na matéria-prima implicam menor adição de açúcares, menor tempo de evaporação da água, menor gasto de energia e maior rendimento do produto, resultando em um menor processamento. (Silva et. al, 2002).

Das folhas de *Morus nigra* L. analisadas, as coletadas na Paraíba apresentaram o maior teor de resíduo seco, com um valor de $27,12\% \pm 0,0009$, enquanto as coletadas em Pernambuco exibiram um teor de $24,31\% \pm 0,0006$. Especificações de teores mínimos de sólidos solúveis para extratos fluidos, não está previsto na Farmacopeia Brasileira, porém (Guizzo et al., 2015) em seus estudos, obtiveram teor extrativo de 15,43% para o mesmo líquido extrator e parte da planta utilizada. Diante disso, pode-se sugerir que o alto valor observado reflete a alta concentração de substâncias hidrossolúveis na planta em questão.

5.1.3.5. Obtenção e caracterizações do extrato seco

5.1.3.5.1 Extrato seco pelo método da liofilização

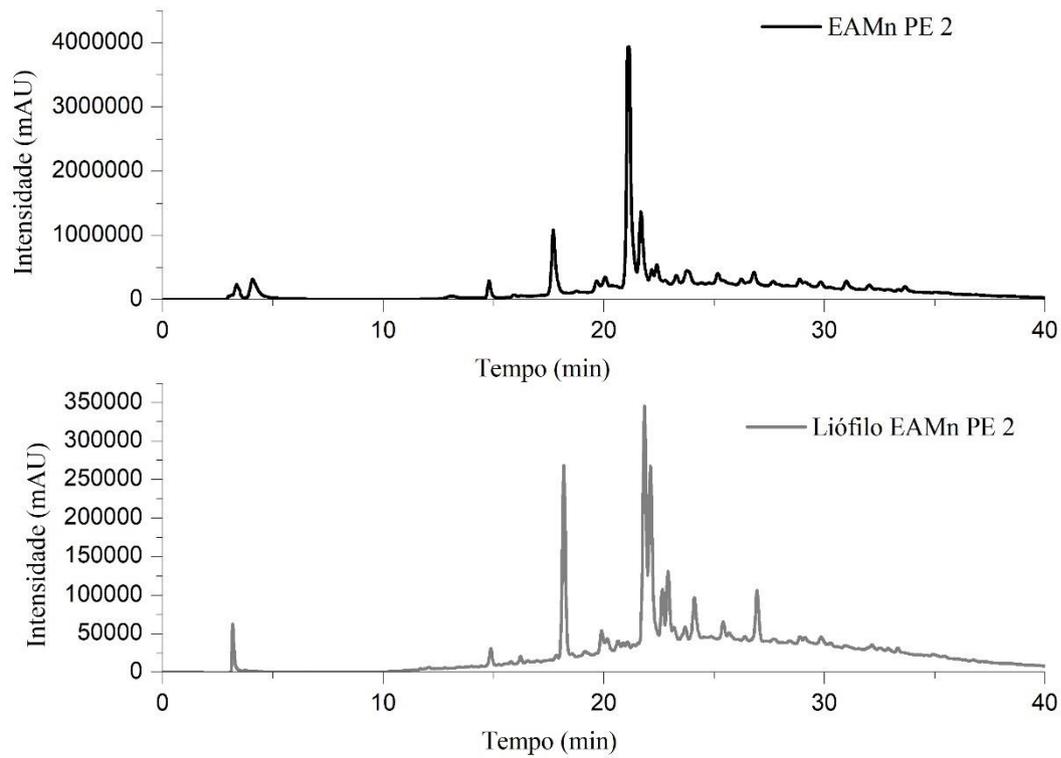
Considerando os dados apresentados anteriormente na seção 5.2.2 os extratos escolhidos para análises posteriores, considerando a maximização das respostas estudadas foram: extrato EA₂ de Pernambuco (temperatura de infusão 70°C; 60 min de extração; proporção droga solvente 25:250) e extrato EA₄ da Paraíba (temperatura de infusão 85°C; 30 min de extração; proporção droga:solvente 25:250).

Entretanto, preparações fitoterápicas na forma sólida, têm sido preferidas pela indústria farmacêutica, principalmente por apresentar vantagens relacionadas a homogeneidade de distribuição dos constituintes, maior estabilidade e facilidade de pesagem e manuseio. Considerando que a liofilização é uma técnica extremamente eficiente na secagem de extratos, pois promove a preservação dos polifenóis, por ser uma técnica de secagem baseada no fenômeno da sublimação, uma vez que é realizada em baixas temperaturas e sob vácuo, permanecendo estáveis por longos períodos devido a prevenção da degradação hidrolítica e oxidativa dos compostos ativos durante o armazenamento, foi a metodologia de escolha para o processo de secagem dos extratos aquosos de *Morus nigra* L. (Jovanović *et al.*, 2021; Malacrida; Motta, 2005; Souza, C. R. F. *et al.*, 2015).

Logo, a fim de determinar se as condições propostas pelo processo de secagem influenciariam na quantificação dos marcadores majoritários, os líofilos dos extratos escolhidos no planejamento experimental, foram submetidos a CLAE na concentração de 5 mg/mL. Através da figura 20 e 21 é possível observar as comparações cromatográficas do extrato aquoso e do líofilo correspondente do estado da Pernambuco e Paraíba respectivamente.

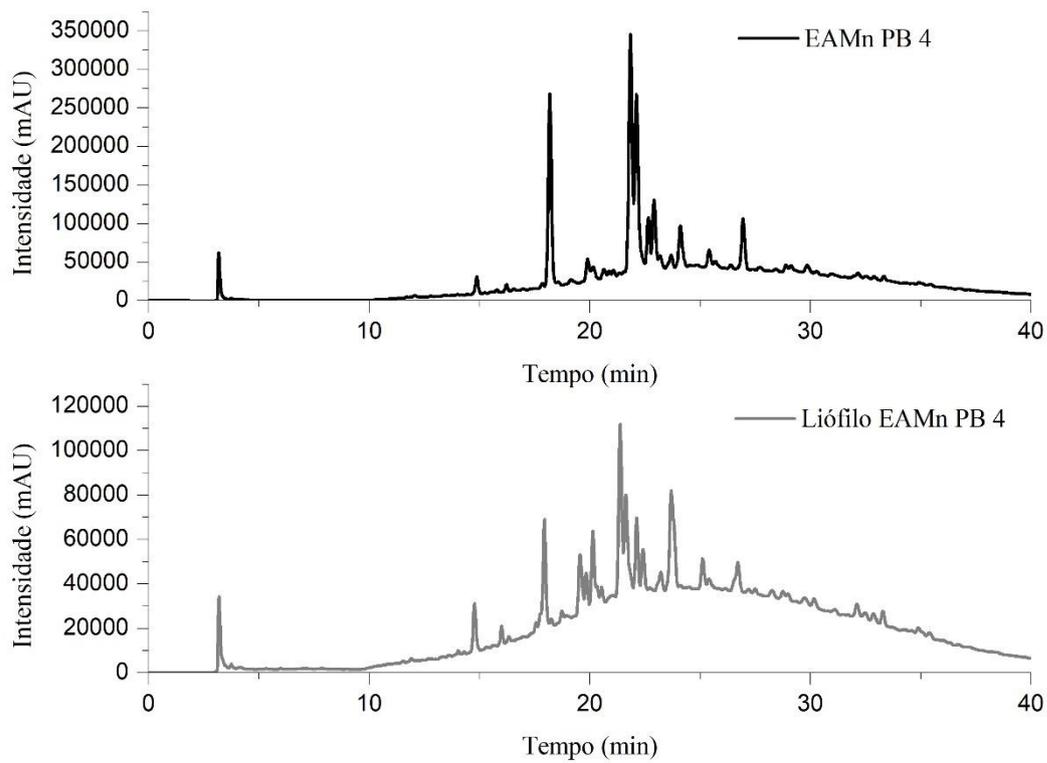
É possível inferir através da comparação entre os cromatogramas, que os picos majoritários presentes nos extratos aquosos são observados no cromatograma do líofilo, evidenciando desta forma, que o processo de secagem manteve os compostos químicos presentes, garantindo um processo de secagem eficiente. Consideravelmente, a intensidades dos picos foram menores para os líofilos por se tratar de concentrações diluídas em comparação com o extrato aquoso puro, assim, baseado no resíduo seco obtido a partir do processo de liofilização, sendo 27,4 mg/mL e 24,1 mg/mL para os líofilos do extrato da Paraíba e Pernambuco respectivamente, foi possível calcular a concentração dos compostos majoritários dos extratos secos em comparação com o extrato fluido, como observado através da tabela 6.

Figura 20- Cromatograma de comparação entre o extrato aquoso EA2PE e o líófilo



Fonte: Dados da pesquisa

Figura 21- Cromatograma de comparação entre o extrato aquoso EA4PB e o líófilo



Fonte: Dados da pesquisa

Tabela 6- Quantificação dos marcadores analíticos em extratos vegetais de *Morus nigra* L.

	Amostras	Isoquercetina ($\mu\text{g/mL}$)	Rutina ($\mu\text{g/mL}$)	Ácido clorogênico ($\mu\text{g/mL}$)
Extratos aquosos	EA ₂ PE	24,66 \pm 0,45	18,02 \pm 0,49	218,57 \pm 1,26
	EA ₄ PB	27,70 \pm 0,25	27,30 \pm 1,82	32,81 \pm 1,41
Liófilos	Liófilo PE	23,41 \pm 1,34	16,94 \pm 1,02	216,08 \pm 1,44
	Liófilo PB	29,052 \pm 1,20	28,20 \pm 1,25	34,524 \pm 0,34

Valores expressos em média \pm DP (n=3)

Fonte: Dados da pesquisa

De acordo com os resultados obtidos, o ácido clorogênico é o composto fenólico dominante encontrado nos extratos aquosos de *Morus nigra* L. Está de acordo com os resultados encontrados por (Zeni *et al.*, 2017) que obteve o extrato das folhas de amora, a partir da infusão utilizando água destilada fervida a 100°C. Já em comparação com (Radojković *et al.*, 2016) os extratos obtidos por maceração com etanol aquoso 70%, a uma temperatura de 30°C, obteve como componente majoritários derivados do ácido cafeico, derivados da quercetina e rutina. Essa diferença depende principalmente da escolha do solvente de extração, pois a afinidade molecular entre o composto fitoquímico e o solvente, pode favorecer a solubilidade e conseqüentemente a eficiência da extração. Por isso, nosso objetivo foi avaliar os extratos aquosos das folhas da amora. Apesar da água não ser tão eficiente na extração de polifenóis em comparação com o metanol e outros solventes orgânicos. No entanto, não é tóxico como o metanol e pode ser usado como meio de extração para a produção de alimentos, cosméticos e matérias-primas para medicamentos. (Kebal *et al.*, 2022a).

5.1.3.5.2. Determinação da umidade residual do extrato seco

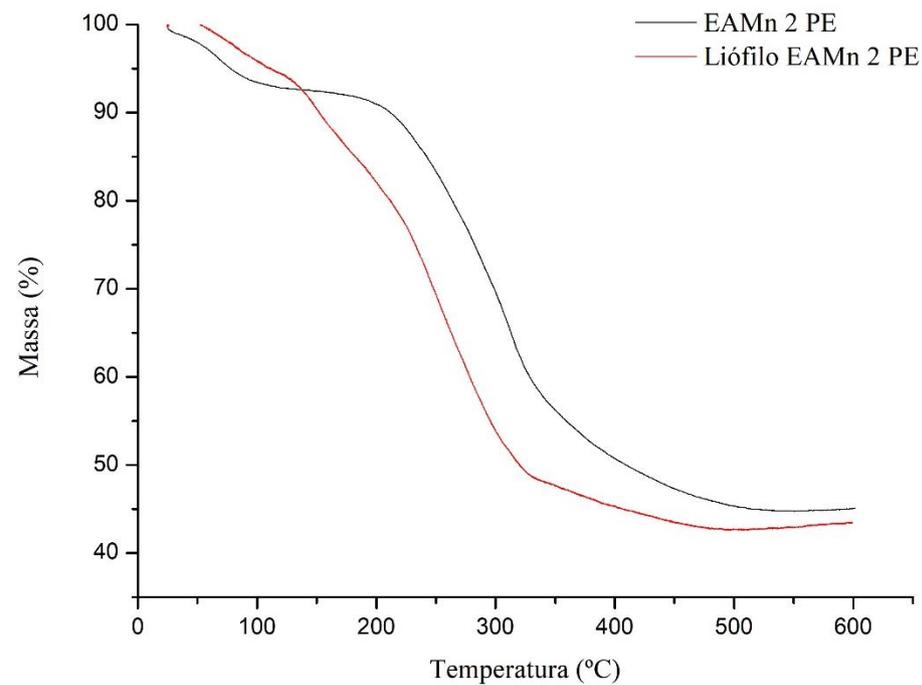
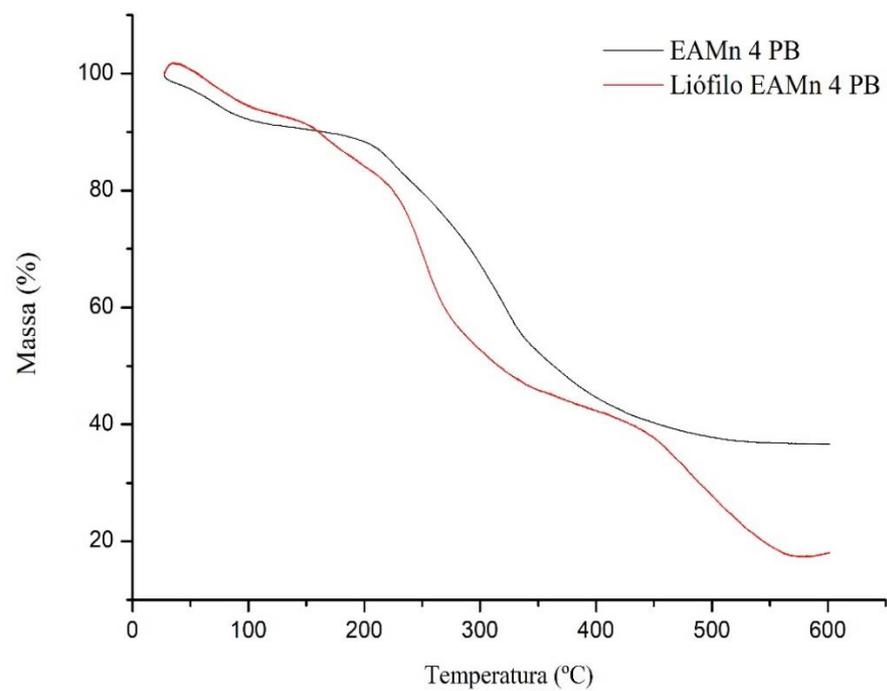
Um parâmetro fundamental no que diz respeito ao desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas é a determinação da umidade residual. Esse método tem a capacidade de interferir na estabilidade química e microbiológica da preparação, como também nas propriedades físicas do extrato seco, como distribuição granulométrica e propriedades de escoamento do pó. O resultado obtido da determinação da umidade residual do extrato seco foi de 4,63 \pm 0,10% e 4,80 \pm 0,13 % para liófilos obtidos da Paraíba e Pernambuco respectivamente, demonstrando que o processo de secagem utilizado foi satisfatório não necessitando de um processo de otimização.

5.1.3.5.3 Caracterização térmica do extrato seco

As curvas de termogravimetria (TG) da droga vegetal de *Morus nigra* L. e do extrato seco podem ser observadas na figura 22. A droga vegetal da PB apresenta um primeiro evento de perda de água na faixa de 28-91°C ($\Delta m=6,41\%$) e a decomposição térmica se inicia em 200°C com o percentual de perda de massa total de 51,67% até a temperatura final da análise de 600°C. Em relação ao extrato seco obtido da mesma amostra pelo processo de liofilização, foi observado inicialmente um perfil térmico semelhante, onde foi notado o evento de perda de água até 100°C ($\Delta m=1,81\%$) mostrando assim resquícios de umidade após o processo de secagem. Já a decomposição térmica apresentou dois eventos degradativos, o primeiro na faixa de 174 e 295°C e o segundo entre 330 e 510°C, podendo ser observados pelos declives da curva de TG, com o percentual de perda de massa de 35,6% e 22,11% respectivamente.

Enquanto que a droga vegetal do PE apresentou o primeiro evento de perda de voláteis, majoritariamente da água, na faixa de 30-100°C ($\Delta=6,46\%$) e a decomposição térmica com início em 202°C com o percentual de massa total de 45,94% até a temperatura final de análise. O extrato seco, demonstrou o primeiro evento térmico até 100°C ($\Delta=2,02\%$) e segundo evento de decomposição a partir de 115-170°C ($\Delta=7,6\%$) e terceiro evento em 176-330°C ($\Delta=38,01\%$).

O evento de degradação do extrato seco mostrou-se antecipado, quando comparado ao início da degradação da droga vegetal, o que pode estar relacionado a menor quantidade de água contida no extrato seco em comparação com a droga vegetal. As curvas de decomposição térmica são parcelas de fenômenos físico-químicos que ocorrem quando a mesma é aquecida. Porém, não é possível associar o efeito térmico e a perda de massa à identificação da decomposição de um determinado componente da amostra, entretanto, é uma análise fundamental para o controle da temperatura durante o processo de produção de formas farmacêuticas sólidas e armazenamento do material vegetal.

Figura 22- Curvas de TG das drogas vegetais e extratos seco de *Morus nigra* L. obtidos da Paraíba e Pernambuco.

Fonte: Dados da pesquisa

5.1.3.6 QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS DAS FOLHAS DE *Morus nigra* L.

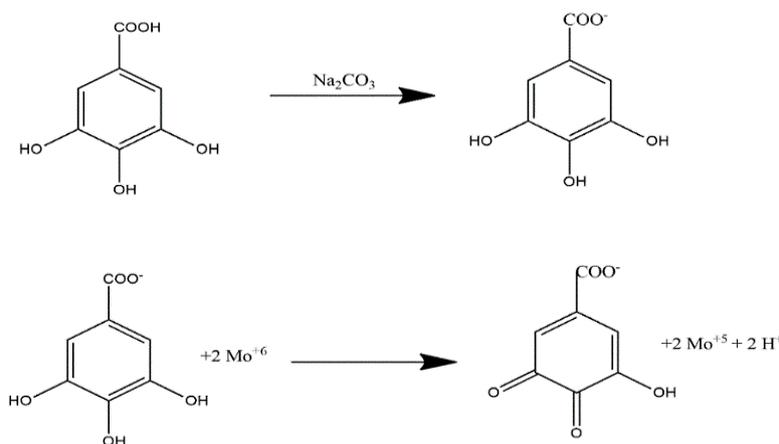
5.1.3.6.1 Desenvolvimento da metodologia analítica

A metodologia foi submetida a uma etapa de pré-validação, na qual se avaliou: o comprimento de onda de absorção máxima e a concentração do reagente carbonato de sódio (10%, 15% e 20%). Para prosseguir com a validação, a escolha do melhor extrato citado na seção 3.2.2 foi utilizado a fim de obter a melhor resposta em comum, na maximização dos compostos fenólicos.

Neste método o reagente de FC é constituído por uma mistura de fofomolibdato e fosfotungstato (designados em conjunto por ácido fosfomolibdicotungstico) e através de uma reação colorimétrica permite a analisar compostos orgânicos que possuem anéis aromáticos hidroxilados.

O grupo fenólico deve se encontrar na forma de fenolato, para os ânions produzirem a oxidação. Por isso, a desprotonação dos compostos fenólicos, em meio básico se gera o ânion carboxilado. A partir deste ponto, ocorre uma reação de oxi-redução entre o ânion e o reagente de Folin, na qual o molibdênio, componente do reagente de Folin que se encontram no estado de oxidação +6 (com a cor amarela), sofre redução a +5 e o meio reacional muda de coloração amarela para azul que pode ser medido opticamente na faixa de comprimento de onda a 700-760 nm. (Chen; Cheng; Liang, 2015; Vázquez *et al.*, 2015). A figura 23 demonstra a reação entre o ácido gálico com o molibdênio.

Figura 23- Reação do Ácido Gálico com Molibdênio, componente do reagente do Folin-Ciocalteu

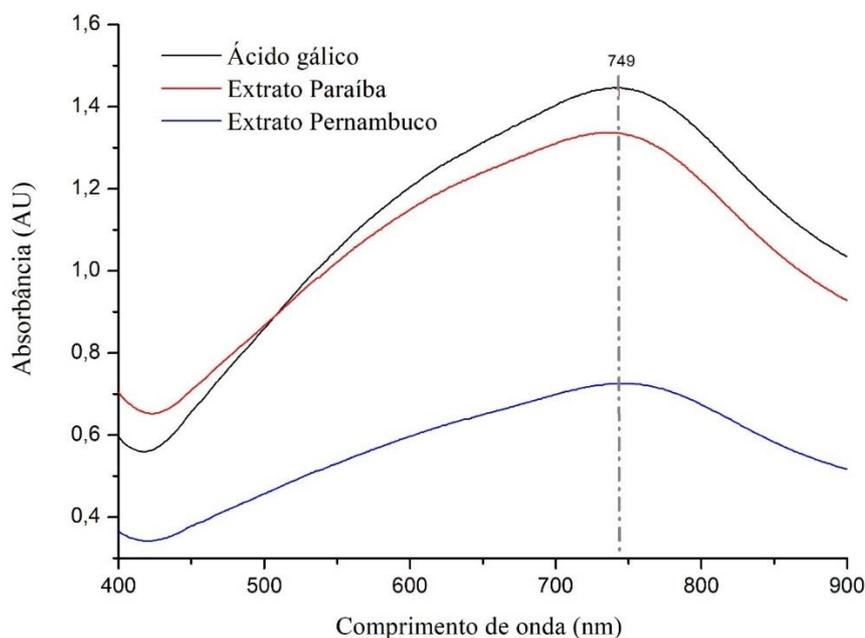


Fonte: autoria própria

A mistura de FCR e compostos fenólicos é estável em ácido, mas instável em solução alcalina. Portanto, o carbonato de sódio, é usado para fornecer um ambiente alcalino, é fundamental para a reação, pois a pigmentação azul, tem absorção máxima dependente da composição qualitativa e/ou quantitativa das misturas fenólicas e do pH das soluções.

O comprimento de onda ótimo da leitura foi determinado através da realização do espectro de varredura, na faixa de 400 a 900 nm dos extratos escolhidos e do ácido gálico, anteriormente citado. A figura 24 representa o espectro obtido para o ácido gálico e para o extrato da matéria-prima após a reação com Folin-Ciocalteu, demonstrando os máximos de absorbância em 749 nm.

Figura 24- Espectro de varredura (400-900 nm) do ácido gálico e do extrato aquoso obtido a partir da matéria-prima de *Morus nigra L.*



Fonte: Dados da pesquisa

O carbonato de sódio em meio alcalino promove a redução de polifenóis formando o óxido azul de tungstênio através da reação com o reagente Folin-Ciocalteu. Portanto, a intensidade da coloração azul é proporcional à quantidade de polifenóis presentes na solução. Sendo assim, analisando os dados, pode-se observar grandes diferenças quanto ao tempo da reação e a absorbância. Na concentração do reagente carbonato de sódio a 10%, foi observado menores absorbâncias para os extratos em estudo, em qualquer tempo de estabilização da reação, já para 15% a maximização da

absorbância foi em 30 min, no entanto, na concentração de 20% em 30 minutos a reação estabilizou-se, demonstrando o melhor resultado. Logo, a maior a concentração estudada da solução de carbonato de sódio de 20% foi a escolhida por fornecer uma maior absorbância da reação em tempo intermediário, otimizando o tempo de reação. Os dados citados podem ser vistos na tabela 7.

Tabela 7- Diferentes concentrações do reagente carbonato de sódio quanto ao tempo de análise e absorbância média

Concentração do reagente carbonato de sódio (% p/v)	Tempo de análise (min)	Absorbância média no tempo estável <i>Morus nigra</i> L. Paraíba	Absorbância média no tempo estável <i>Morus nigra</i> L. Pernambuco
10	15	0,02 ± 0,005	0,003 ± 0,002
	30	0,09 ± 0,006	0,008 ± 0,004
	60	0,04 ± 0,008	0,005 ± 0,002
15	15	1,416 ± 0,015	0,433 ± 0,014
	30	1,437 ± 0,018	0,447 ± 0,019
	60	1,00 ± 0,014	0,405 ± 0,009
20	15	1,528 ± 0,007	0,512 ± 0,006
	30	1,637 ± 0,002	0,520 ± 0,007
	60	1,238 ± 0,003	0,502 ± 0,002

Fonte: dados da pesquisa

5.1.3.6.2 Validação do método por espectrofotometria UV-Vis

A validação de um procedimento analítico deve ser realizada para atestar se o procedimento, processo, equipamento, material, atividade ou sistema leva aos resultados esperados, garantindo a confiabilidade, rastreabilidade ou comparabilidade dos resultados. (Silva *et al.*, 2017). Assim, absorção molecular da espectrofotometria na região espectral UV-Vis é uma técnica simples e apropriada para análises de rotina na indústria. Dentre esses fatores, a metodologia é acessível, têm baixo custo operacional, rapidez e elevada confiabilidade de resultados. Por isso, foi utilizada para o desenvolvimento da

validação, no intuito de quantificar os compostos fenólicos totais dos extratos, garantindo assim a possibilidade de analisar medicamentos que contém o extrato de *Morus nigra* L. (Gupta *et al.*, 2022).

5.1.3.6.2.1 Linearidade

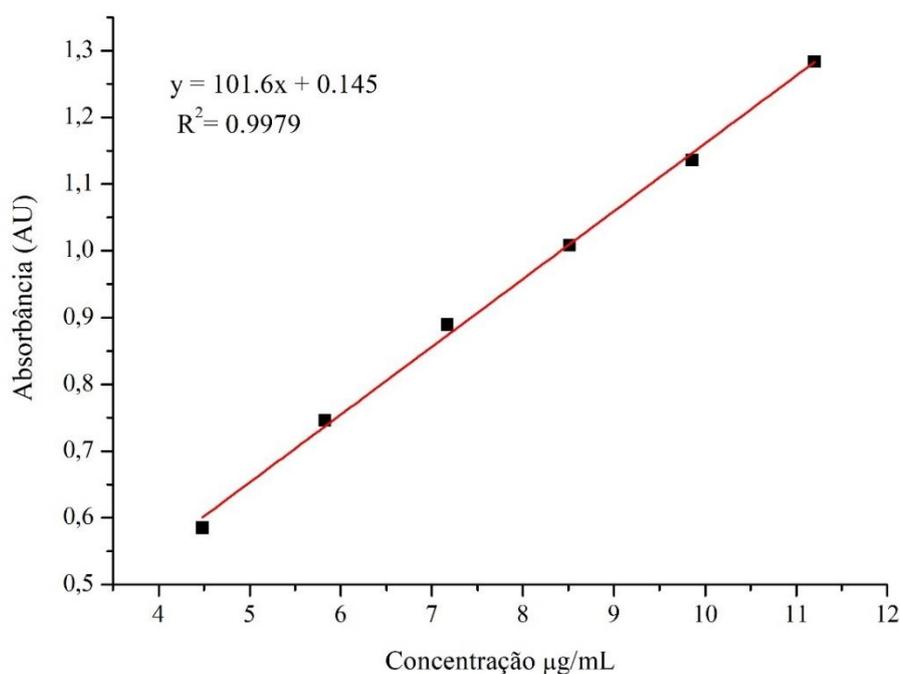
A linearidade é capacidade da metodologia aplicada demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro um intervalo especificado. É verificada a partir da equação de regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados. Seu critério mínimo aceitável é o coeficiente de correlação (r) ser maior ou igual a 0,99. Isto se explica, pois o coeficiente determina uma estimativa da qualidade da curva, sendo que quando r encontra-se próximo de 1,0, menor é a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão. No entanto, apenas este critério não suficiente para garantir adequação do modelo, por isso utilizou-se a análise de variância pelo método do mínimo quadrado, fornecendo resultados experimentais não tendenciosos e com uma variação mínima, predizendo os valores de y a partir dos valores de x (Ribani *et al.*, 2004).

5.1.3.6.2.2 Linearidade do ácido gálico

A substância de referência escolhida como padrão externo para determinação dos compostos fenólicos totais foi o ácido gálico. A linearidade do método foi verificada por meio da elaboração de curva analítica do ácido gálico na faixa de concentração de 4,5 a 11 $\mu\text{g/mL}$. A figura 25 apresentam a curva média obtida para avaliação da linearidade, com o valor de equação da reta obtida pela regressão linear e o coeficiente de determinação ($R^2 = 0,9979$).

A fim de comprovar estatisticamente se os dados apresentam uma suposta relação linear entre a concentração e a absorbância na linearidade, foi utilizada a análise de variância de regressão para o teste de significância do modelo, utilizando a estatística t -student para obter o teor das hipóteses. As hipóteses a serem testadas pela análise de variância na regressão são: hipótese nula (H_0) que corresponde a não correlação linear significativa entre a concentração e a absorbância e a hipótese alternativa (H_1) que confirma a correlação linear entre as variáveis. A seguir a ANOVA pode ser definida conforme a tabela 8.

Figura 25- Curva analítica média do ácido gálico



Fonte: Dados da pesquisa

Tabela 8- Análise de variância da linearidade do ácido gálico

	GL	SQ	MQ	F ₀ (calculado)	F _t (tabelado)	Valor-P
Modelo	1	0,9789	0,9789	2689,21	4,49	0,000
Residual	16	0,0058	0,0003			
Falta de ajuste	4	0,0020	0,0005	1,66	3,26	0,223
Erro puro	12	0,0037	0,0003			
Total	17	0,9847				

*GL: graus de liberdade; SQ: soma quadrática dos resíduos; MQ: quadrado média dos quadrados

Fonte: Dados da pesquisa

Desta forma, a estatística do modelo tem distribuição F de Fischer-Snedecor com 1 grau de liberdade a nível de significância de 5%, apresentada na tabela X demonstra que F calculado é maior que o F tabelado e o valor p menor que (0,05 – nível de significância), assim H₀ foi rejeitada, com evidências estatísticas de que há uma correlação linear entre a absorbância e concentração do ácido gálico, concluindo que a curva estudada é linear.

Para analisar a adequação do método e a significância estatística do modelo linear, a falta de ajuste pode ser utilizada, pois assume que a normalidade, a independência e homoscedasticidade das variâncias dos resíduos sejam válidas. As hipóteses a serem testadas pelo teste da falta de ajuste são: hipótese nula (H_0) curva não apresenta erro por falta de ajuste, ou seja, modelo linear adequado e hipótese alternativa (H_1) a curva apresenta erro por falta de ajuste, ou seja, modelo linear inadequado. Ao nível de significância de 5% o valor de F calculado é menor que o F tabelado, portanto, aceita-se H_0 e conclui que a falta de ajuste não é significativa com evidências estatísticas que o modelo utilizado é adequado. Assim, o método satisfaz as condições estatísticas, demonstrando que o modelo linear não apresenta erro por falta de ajuste. Além disso, a análise de variância demonstra que a regressão é significativa.

Enquanto que a distribuição F é usada para realizar teste de hipótese da equação da reta de regressão como um todo, a distribuição t é usada para realizar testes de hipóteses dos coeficientes da reta de regressão. Portanto, a significância do coeficiente de regressão foi determinada através do teste *t-student*, com os resultados previstos na tabela 9. Utilizando a tabela de distribuição t, para $H_0: B=0$ e para $H_1: B \neq 0$, pode-se observar que valor-p dos coeficientes é menor que 0,05, evidenciando que a hipótese nula é falsa, podendo afirmar que o coeficiente angular da reta é diferente de zero, ou seja, são estatisticamente significativos.

Tabela 9- Teste de significância do coeficiente angular.

	Coefficientes	Erro padrão	valor-t	valor-P	Inferior 95,0%	Superior 95,0%
Interseção	0,145	0,016	9,059548	1,07E-07	0,111	0,178
Variável X	101,601	1,959	51,8576	2,95E-19	97,448	105,754

Fonte: Dados da pesquisa

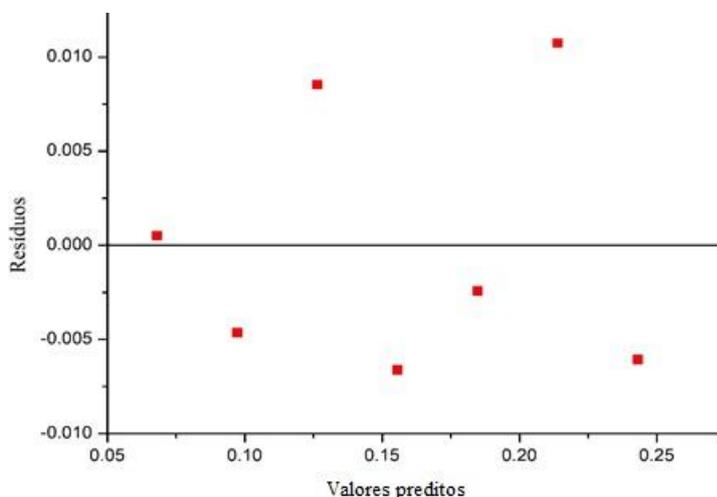
Além disso, para que os resultados sejam confiáveis, as precisões do modelo devem ser avaliadas. Assim, com análise dos resíduos é possível investigar adequabilidade de um modelo de regressão. Para estarem de acordo com a teoria estatística, os resíduos devem ter média próxima de zero, variância pequena e serem distribuídos simetricamente, ou seja, os resíduos devem seguir distribuição normal.

Os gráficos de resíduos que suspeitam de heterocedasticidade, resultam na presença de uma estrutura definida, como linear, quadrática ou formato de cone, isto pode

traduzir o fato de não existir uma relação entre as variáveis ou não constam no modelo uma ou várias variáveis independentes que influenciam significativamente a variável dependente. Por outro lado, quando os resíduos são aleatoriamente distribuídos conclui-se que a variância dos resíduos é constante, os pontos do gráfico se distribuem-se de forma aleatória em torno da reta que corresponde ao resíduo zero, formando uma mancha de largura uniforme.

Ao analisar a figura 26, pode-se observar que os resíduos estão normalmente distribuídos, próximo ao zero, com variância constantes e concentrados entre -0,04 e 0,026. não é possível, em princípio, identificar nenhuma estrutura definida ou tendência nos resíduos. Os valores positivos e negativos dos resíduos encontram-se equivalentes, indicando aleatoriedade. Sendo assim, isso dá fortes indícios para conclusão que os pontos são aleatoriamente distribuídos e que não há formação que sugerisse heterocedasticidade, sendo assim os resíduos são homocedásticos, advertindo um comportamento esperado para distribuição dos erros.

Figura 26- Distribuição da análise de resíduos da linearidade do ácido gálico

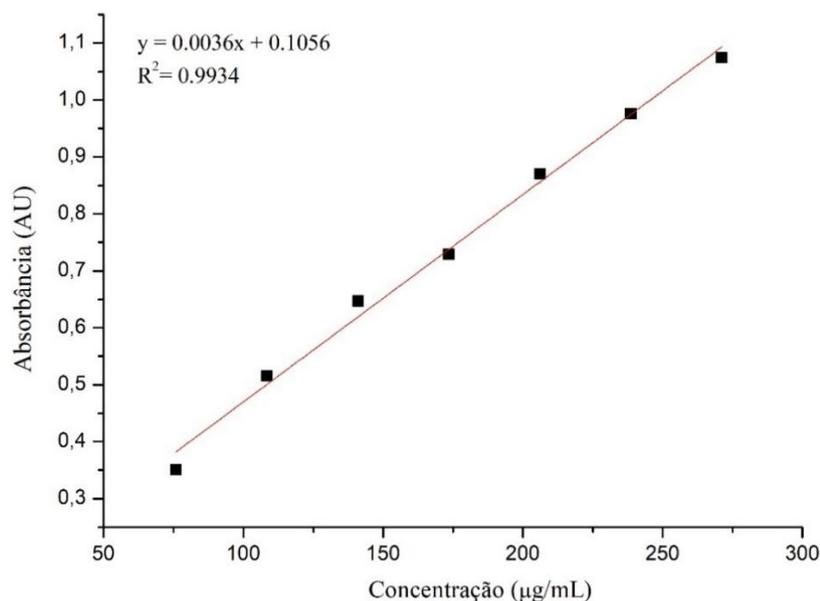


Fonte: Dados da pesquisa

5.1.3.6.2.3 Linearidade do extrato *Morus nigra* L. coletado na Paraíba

A linearidade do extrato das folhas de *Morus nigra* L. da Paraíba de acordo com o método de extração escolhido no item 5.2, foi verificada por meio da elaboração da curva analítica na faixa de concentração de 75 a 270 $\mu\text{g/mL}$. A figura 27 apresentam a curva média obtida para avaliação da linearidade, com o valor de equação da reta obtida pela regressão linear e o coeficiente de determinação ($R^2 = 0,9977$).

Figura 27-Representação gráfica da curva de linearidade do extrato das folhas de *Morus nigra* L. coletadas na Paraíba-



Fonte: Dados da pesquisa

Na determinação da melhor faixa de aplicação, foram utilizadas análises estatísticas. Para verificar a linearidade tem-se como hipóteses: H_0 = a curva não é linear e H_1 = a curva é linear. De acordo com a tabela 10 (ANOVA) para o modelo de regressão, tem-se o F calculado maior que o F tabelado, bem como valor-p menor que 0,05 (nível de significância), assim rejeita-se H_0 e conclui-se que a curva analítica é estatisticamente linear. Afim de avaliar se o modelo de regressão linear é adequado, o teste de falta de ajuste foi avaliado, ao nível de significância de 5% conclui-se que o F calculado é menor que o F tabelado, portanto, aceita-se H_0 e conclui que a falta de ajuste do modelo não é significativa, com evidências estatísticas que o modelo utilizado é adequado.

Tabela 10- Análise de variância da curva analítica do extrato de *Morus nigra* L. Paraíba

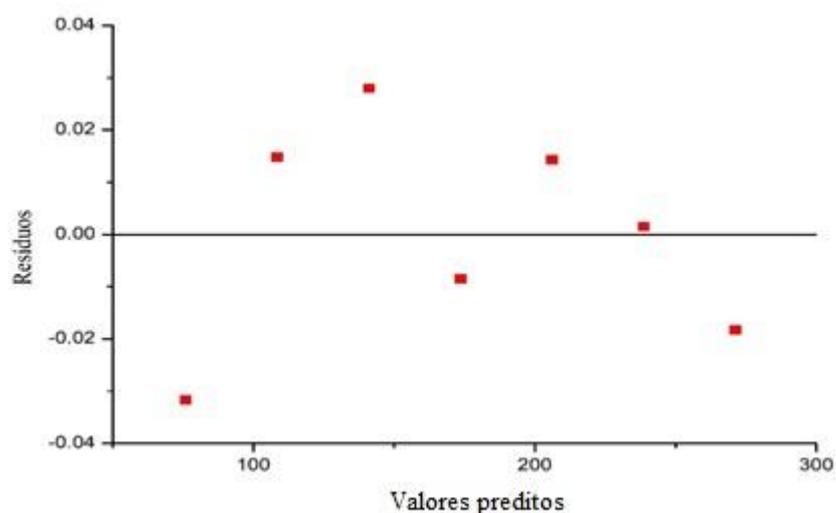
	GL	SQ	MQ	F ₀ (calculado)	F _t (tabelado)	Valor-P
Modelo	1	1,17931	1,17931	1395,60	4,38	0,000
Residual	19	0,01606	0,0085			
Falta de ajuste	5	0,00792	0,00158	2,73	2,96	0,063
Erro puro	14	0,00813	0,00058			
Total	20	1,19537				

Fonte: Dados da pesquisa

As precisões do modelo ajustado foram avaliadas, para que os resultados sejam confiáveis, através da distribuição de resíduos. Essa análise é possível investigar

adequabilidade da regressão, através de uma análise gráfica, como demonstrada na figura 28. Através da análise foi possível observar que os resíduos se encontram próximo ao zero, com variância constantes e concentradas entre -0,04 a 0,04.

Figura 28- Distribuição da análise de resíduos da linearidade do extrato da Paraíba



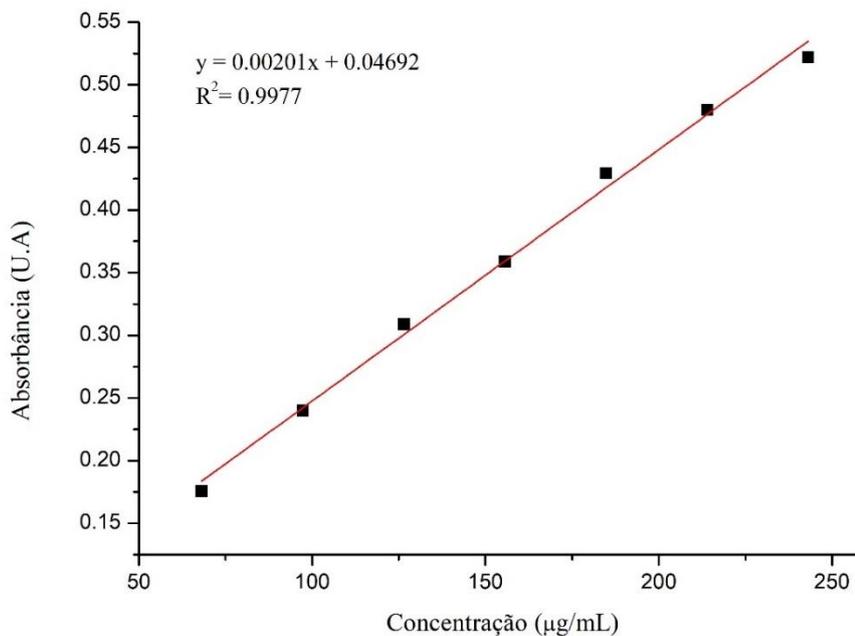
Fonte: Dados da pesquisa

5.1.3.6.2.4 Linearidade do extrato *Morus nigra* L. coletado em Pernambuco

A linearidade do extrato das folhas de *Morus nigra* L. de Pernambuco de acordo com o método de extração escolhido no item 5.2, foi verificada por meio da elaboração da curva analítica na faixa de concentração de 68 a 243 $\mu\text{g/mL}$. A figura 29 apresentam a curva média obtida para avaliação da linearidade, com o valor de equação da reta obtida pela regressão linear e o coeficiente de determinação ($R^2 = 0,9977$).

A fim de comprovar estatisticamente se os dados apresentam uma suposta relação linear entre a concentração e a absorbância na linearidade, foi utilizada a análise de variância da regressão para o teste de significância do modelo, utilizando a estatística t-student para obter o teste de hipóteses (Tabela 11). As hipóteses a serem testadas pelas análises de variância na regressão são: hipótese nula (H_0) não há correlação linear significativa entre a concentração e a absorbância e hipótese alternativa (H_1) diz que não há correlação linear entre as variáveis. Por isso pode-se sugerir que o modelo é adequado advertindo um comportamento esperado para distribuição dos erros.

Figura 29- Curva analítica média do extrato de Pernambuco



Fonte: Dados da pesquisa

Tabela 11- Análise de variância da curva analítica do extrato de *Morus nigra* L. Pernambuco-

	GL	SQ	MQ	F ₀ (calculado)	F _t (tabelado)	Valor-P
Modelo	1	0,204369	0,204369	1723,54	4,38	0,000
Residual	19	0,001423	0,000119			
Falta de ajuste	5	0,000540	0,000108	0,86	2,96	0,552
Erro puro	14	0,000883	0,000126			
Total	20	0,205792				

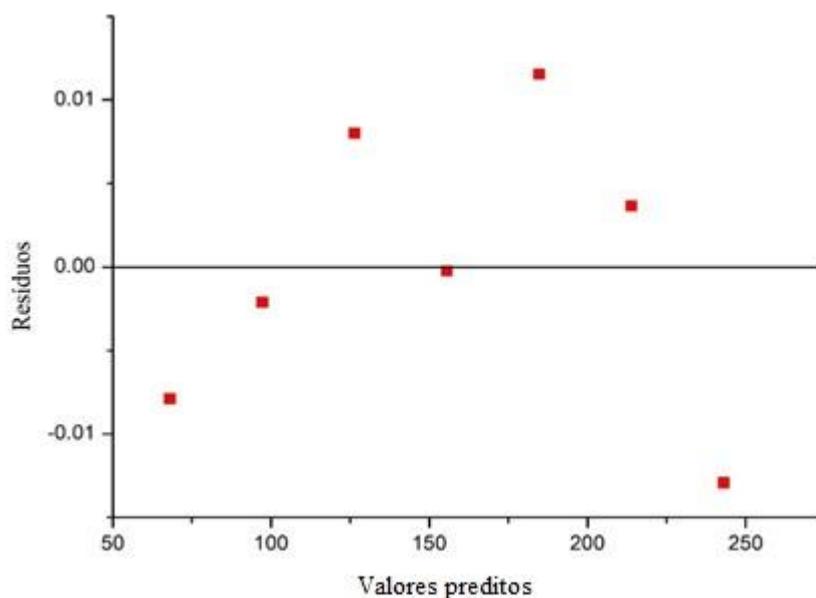
Fonte: Dados da pesquisa

A estatística do modelo tem distribuição ao nível de significância de 5%. Esses valores esperados nos sugerem que o valor de $F_{1,19}$ calculado (1723,54) é maior que o $F_{1,19}$ tabelado (4,38). Portanto, deve-se rejeitar H_0 , com evidências estatísticas de que há correlação linear entre a absorbância e a concentração do extrato. Para avaliar se o modelo de regressão linear é adequado, o teste da falta de ajuste (Lack Of Fit) é utilizado pois assume que a normalidade, independência e homoscedasticidade das variâncias dos

resíduos sejam válidos. As hipóteses a serem testadas pelo teste da falta de ajuste são: hipótese nula (H_0) modelo linear adequado e para hipótese alternativa (H_1) modelo linear inadequado. Ao nível de significância de 5% o valor de $F_{5,14}$ calculado (0,86) é menor que $F_{5,14}$ tabelado (2,96), portanto, aceita-se H_0 e conclui que a falta de ajuste não é significativa com evidências estatísticas que o modelo utilizado é adequado.

Para que os resultados sejam confiáveis, as precisões do modelo ajustado devem ser avaliadas. Com análise dos resíduos é possível investigar adequabilidade de um modelo regressão. Através da análise gráfica dos resíduos, como demonstrada na figura 30, pode-se concluir que os resíduos se encontram próximo a zero, com variância constantes e concentrados entre -0,001 a 0,001 e que aproximadamente a quantidade dos valores positivos e negativos dos resíduos encontram-se equivalentes, indicando aleatoriedade. Por isso pode-se sugerir que o modelo é adequado advertindo um comportamento esperado para distribuição dos erros.

Figura 30- Distribuição da análise de resíduos da linearidade do extrato de Pernambuco



Fonte: Dados da pesquisa

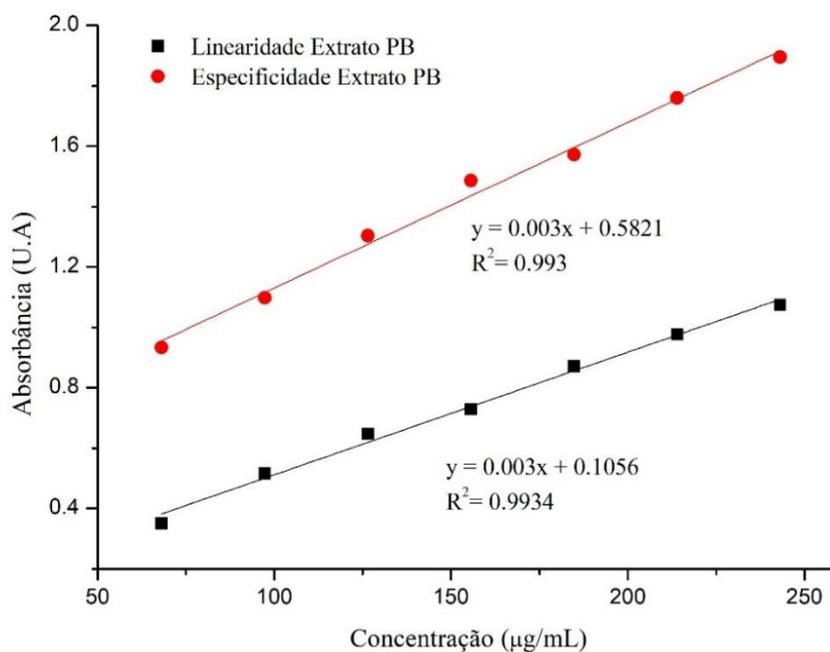
5.1.3.6.2.5 Especificidade

A especificidade é definida como a habilidade do método em distinguir o analito em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (Brasil, 2019).

Para avaliar este parâmetro, foi adicionado 100 µl padrão ácido gálico na concentração de 1,12 mg/mL nas amostras às sete diferentes concentrações da linearidade nos extratos da Paraíba e Pernambuco, realizando o teste em triplicata. Os resultados foram plotados em gráficos para se verificar a linearidade da curva e a mesma foi comparada com a curva da linearidade (seção 5.1.3.6.2.1)

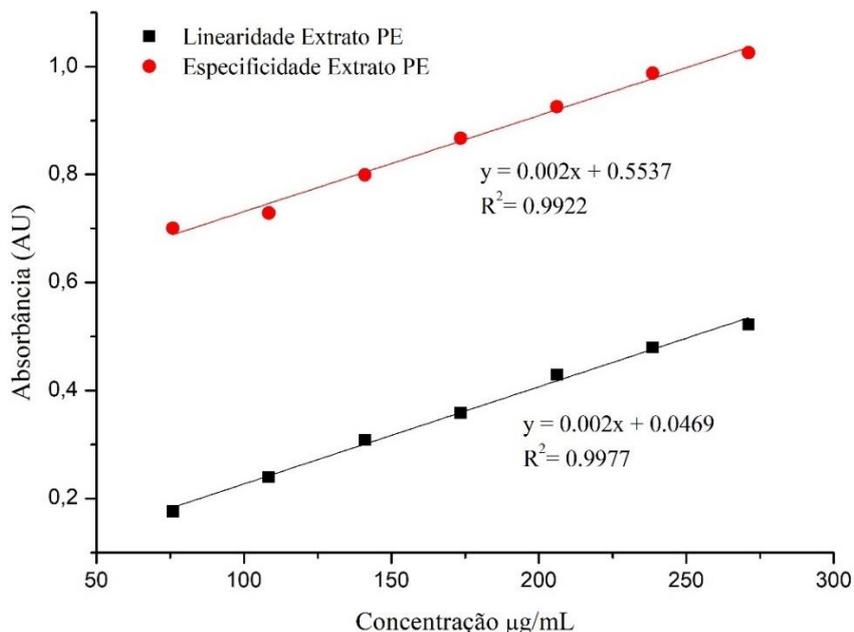
A figura 31 e 32 apresenta as curvas médias de linearidade (extrato de Paraíba e Pernambuco respectivamente) e as curvas médias da especificidade para cada uma das substâncias de referência. Assim, através do paralelismo entre as retas, é possível observar que não há diferença entre os coeficientes angulares obtidos nas curvas de calibração da especificidade e linearidade, podendo afirmar que o método é específico para a finalidade que se propõe, devido as amostras tratar-se de matrizes complexas e esse efeito pode ser avaliado observando os coeficientes angulares das retas de linearidade e especificidade (Ribani *et al.*, 2004).

Figura 31- Comparação entre a curva de especificidade e linearidade do extrato de *Morus nigra* L. da Paraíba



Fonte: Dados da pesquisa

Figura 32- Comparação entre a curva de especificidade e linearidade do extrato de *Morus nigra* L. de Pernambuco



Fonte: Dados da pesquisa

Porém, para comprovação da especificidade do método, é necessário que a curva analítica do extrato, através da contaminação do padrão, apresente linearidade. Ao observar os valores dos coeficientes de correlação para os dois tipos de extratos, apresentam-se maiores do que 0,99, tanto para linearidade, como para especificidade, o que pode sugerir que a curva analítica é linear. No entanto, conforme discutido para o teste de linearidade, além do valor do coeficiente de correlação, são necessários testes estatísticos que comprove a linearidade do modelo.

Deste modo, para verificar a linearidade do intervalo estudo, tem-se como hipóteses: H_0 = a curva não linear e H_1 = a curva é linear. De acordo com a tabela 12 e 13 tem-se o $F_{\text{calculado}}$ maior que o F_{tabelado} , bem como valor-p menor que 0,05, assim rejeitou-se a hipótese nula e aceita-se a hipótese alternativa, concluindo-se que as curvas analíticas estudadas para a especificidade dos extratos obtidos na Paraíba e Pernambuco são lineares.

Quanto a falta de ajuste, tem-se outras duas hipóteses: H_0 = a curva apresenta erro por falta de ajuste; H_1 = a curva não apresenta erro por falta de ajuste. Portanto quando não há falta de ajuste, ocorre o contrário, ou seja, o $F_{\text{calculado}}$ é menor que o F_{tabelado} ,

sendo assim, recusa-se a hipótese nula e aceita a hipótese alternativa, demonstrando que o modelo linear para os dois tipos de extratos, não apresentam erros por falta de ajuste

Tabela 12- Análise estatística do teste de especificidade do extrato da Paraíba

	GL	SQ	MQ	F₀ (calculado)	F_t (tabelado)	Valor-P
Modelo	1	2,15104	2,15104	2678,77	4,38	0,000
Residual	19	0,01526	0,00080			
Falta de ajuste	5	0,01486	0,00029	0,96	2,96	0,58
Erro puro	14	0,00039	0,00003			
Total	20	2,16630				

Fonte: dados da pesquisa

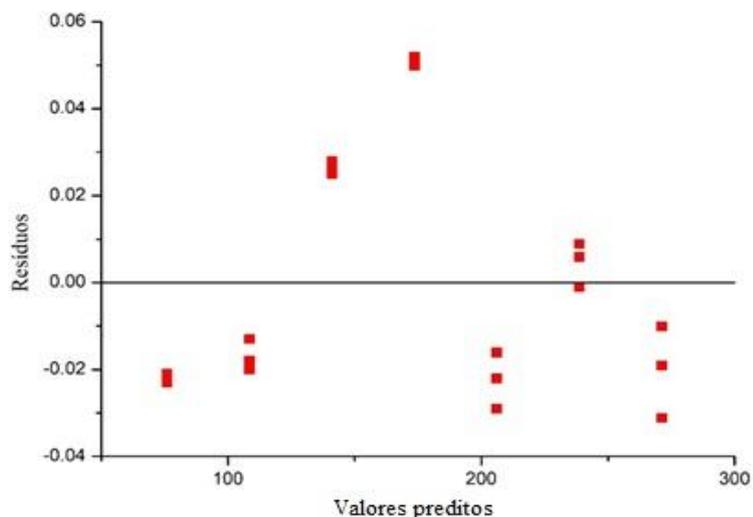
Tabela 13- Análise estatística do teste de especificidade do extrato de Pernambuco

	GL	SQ	MQ	F₀ (calculado)	F_t (tabelado)	Valor-P
Modelo	1	0,280954	0,280954	2080,76	4,38	0,000
Residual	19	0,002564	0,000135			
Falta de ajuste	5	0,002217	0,000042	1,6	2,96	0,62
Erro puro	14	0,000348	0,000025			
Total	20	0,283520				

Fonte: dados da pesquisa

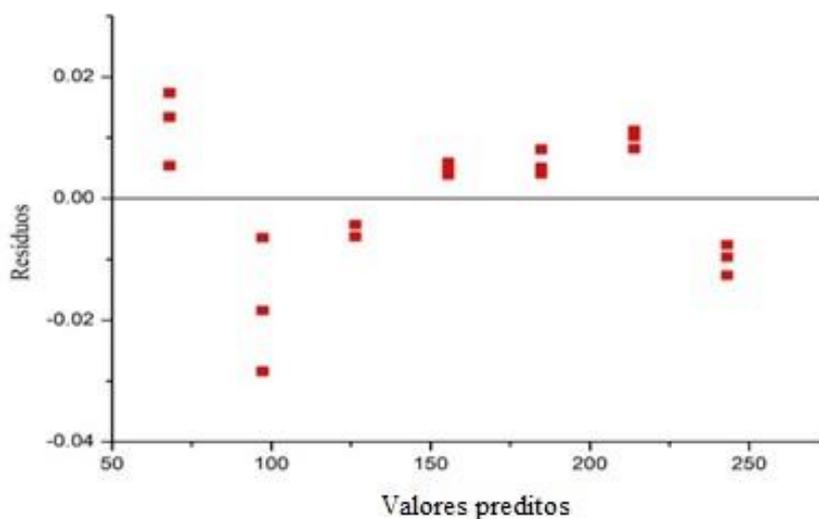
Além disso, é possível observar que os pontos ficam próximo a reta, seguindo uma distribuição normal e que os resíduos se distribuem aleatoriamente em torno da média zero para ambos extratos (Figura 33 e 34), confirmando a linearidade da curva analítica.

Figura 33- Gráfico de heterogeneidade das variâncias dos resíduos obtidos no teste de especificidade das amostras de extrato da Paraíba



Fonte: Dados da pesquisa

Figura 34- Gráfico de heterogeneidade das variâncias dos resíduos obtidos no teste de especificidade das amostras de extrato de Pernambuco



Fonte: Dados da pesquisa

5.1.3.6.2.6 Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção (LD) é a menor concentração do analito em uma amostra que pode ser detectada e diferenciada do ruído, mas não necessariamente quantificada, enquanto que o limite de quantificação (LQ) é a menor concentração do analito que pode ser determinada com precisão e exatidão, sob condições estabelecidas (BRASIL, 2017).

O LD e LQ podem ser estabelecidos através da análise de soluções e concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até se chegar ao nível detectável e quantificável. Podem ser determinados a partir de 3 métodos diferentes: método visual, método de relação sinal-ruído e baseado em parâmetros da curva analítica. Para a análise espectrofotométrica em questão foi utilizado a curva analítica dos extratos, na qual deve-se considerar a equação da reta obtida na linearidade do extrato da Paraíba ($y = 0.0036x + 0.1056$) e Pernambuco ($y = 0.00201x + 0.04692$), para se obter o LD e LQ.

Pela equação da reta tem-se o desvio padrão do intercepto $y(DPa) = 0,0464$ e $y(DPa) = 0,0026$ e a inclinação da reta de $(IC) = 0,0036$ e $(IC) = 0,002$ para a curva analítica do extrato Paraíba e Pernambuco, respectivamente. Sendo assim, resultam em um LD e LQ de 38,31 e 127,70 $\mu\text{g/ml}$ e 3,87 e 12,89 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente para o extrato de Paraíba e Pernambuco.

5.1.3.6.2.7. Precisão

A precisão é considerada uma avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de amostragens de uma mesma amostra, sendo analisada por precisão intra-dia (repetibilidade) e inter-dias (precisão intermediária). A repetibilidade observa a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo e com o mesmo analista e mesma instrumentação, enquanto a precisão intermediária observa a concordância dos resultados do mesmo laboratório, mas obtido em dias diferentes e com analistas diferentes.

Nesse sentido, o ensaio de precisão pretende avaliar e quantificar tais variações nos dados obtidos e expressar através do desvio padrão relativo (DPR), a proximidade dos resultados. Sendo assim, ao analisar os dados obtidos na tabela 14 e 15, através do cálculo da variação de repetibilidade e precisão intermediária, nota-se que o DPR se encontra abaixo de 5%, para os dois extratos em estudo, de acordo como preconizado pela legislação.

Tabela 14- Teor de polifenóis totais (PT) obtidos nos testes intra-dia e inter-dia do extrato aquoso de *Morus nigra* L. da Paraíba.

Amostras	Teor de PT (%)	Teor de PT intra- dia	Teor de PT inter- dia
1	7,050	7,428	7,419
2	7,249	7,211	7,560
3	7,400	7,230	7,419
4	6,975	7,258	7,428
5	7,069	7,296	7,211
6	7,390	7,296	7,201
$\bar{x} \pm dp$ [DPR%]	7,188 \pm 0,019 [2,3%]	7,286 \pm 0,007 [0,87%]	7,373 \pm 0,013 [1,56%]

\bar{x} = média; dp=desvio padrão; dpr= desvio padrão relativo

Fonte: Dados da pesquisa

Tabela 15- Teor de polifenóis totais (PT) obtidos nos testes intra-dia e inter-dia do extrato aquoso de *Morus nigra* L. de Pernambuco

Amostras	Teor de PT (%)	Teor de PT intra- dia	Teor de PT inter- dia
1	2,638	2,610	2,478
2	2,590	2,667	2,610
3	2,600	2,393	2,676
4	2,695	2,657	2,468
5	2,657	2,386	2,456
6	2,638	2,468	2,506
$\bar{x} \pm dp$ [DPR%]	2,63 \pm 0,004 [1,11%]	2,53 \pm 0,007 [0,87%]	2,533 \pm 0,008 [2,45%]

\bar{x} = média; dp=desvio padrão; dpr= desvio padrão relativo

Fonte: Dados da pesquisa

5.1.3.6.2.8 Exatidão

A exatidão é considerada um grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro, da curva de calibração.

Os extratos são amostras complexas e desconhecidas, de tal modo, que o método de adição de padrão é muito utilizado na determinação da exatidão, já que não é possível o preparo do branco da matriz. Por isso, nas amostras foram acrescentadas três concentrações conhecidas do padrão ácido gálico com objetivo de utilizar o método mais adequado para determinar a exatidão. Os resultados obtidos na tabela 16 e 17 permaneceram com valor de limite para matrizes complexas entre 85 a 115%, esse valor consiste na relação percentual entre a concentração real e a concentração determinada após aplicação do procedimento analítico, garantindo desta forma que o método proposto para quantificar os compostos fenólicos a partir do extrato de *Morus nigra* L. da Paraíba e Pernambuco são exatos. (Maroneze *et al.*, 2014).

Tabela 16- Teor de polifenóis totais obtidos no teste de exatidão do extrato da Paraíba e seus respectivos percentuais de recuperação

Concentrações	Teor de PT esperado (EM + padrão) (%)	Teor de PT obtido (%)	Recuperação (%)
Baixa	10,81	10,84	100,27
Média	12,78	13,09	102,42
Alta	14,30	14,02	98,04

Fonte: Dados da pesquisa

Tabela 17- Teor de polifenóis totais obtidos no teste de exatidão do extrato da Pernambuco e seus respectivos percentuais de recuperação

Concentrações	Teor de PT esperado (EM + padrão) (%)	Teor de PT obtido (%)	Recuperação (%)
Baixa	5,73	5,65	98,60
Média	7,71	7,56	98,05
Alta	9,23	9,13	98,91

Fonte: Dados da pesquisa

5.1.3.6.2.9 Robustez

A robustez é a capacidade do método proposto em resistir a pequenas variações dos parâmetros analíticos. Considera-se que o método é robusto, quando ele não é afetado por uma modificação pequena e deliberado em seus parâmetros, sem perder exatidão e precisão.

Assim, o método de quantificação dos compostos fenólicos foi considerado robusto, pois quando as amostras foram expostas a luz, os resultados experimentais apresentados na tabela 18 e 19, constatou valores de DPR menores do que 5% e a exatidão manteve-se no intervalo de confiança de 85 a 115%, ou seja, dentro das especificações exigidas pela legislação.

Tabela 18- Médias dos teores fenólicos totais obtidas no teste de robustez do extrato de *Morus nigra* L da Paraíba.

Amostras	Teores de compostos fenólicos $\bar{x} \pm dp$ [DPR%]
Com presença de luz	7,261 \pm 0,003 [0,41]
Sem a presença de luz	7,132 \pm 0,019 [2,34]

\bar{x} = média; dp=desvio padrão; dpr= desvio padrão relativo

Fonte: Dados da pesquisa

Tabela 19- Médias dos teores fenólicos totais obtidas no teste de robustez do extrato de *Morus nigra* L de Pernambuco.

Amostras	Teores de compostos fenólicos $\bar{x} \pm dp$ [DPR%]
Com presença de luz	2,610 \pm 0,002 [0,73]
Sem a presença de luz	2,865 \pm 0,006 [1,79]

\bar{x} = média; dp=desvio padrão; dpr= desvio padrão relativo

Fonte: Dados da pesquisa

5.1.3.3.6.3 DETERMINAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

Os compostos fenólicos são constituintes antioxidantes que são eficazes nos alimentos e nas amostras vegetais e têm sido apontados como os principais compostos

fitoquímicos das folhas de amoreira, com propriedades biológicas comprovadas ((Chung *et al.*, 2013; Hunyadi *et al.*, 2013).

Portando, após a metodologia descrita para quantificação dos compostos fenólicos ser validada, realizou-se a quantificação do teor dos polifenóis totais para os extratos provenientes da Paraíba e Pernambuco escolhidos a partir do planejamento fatorial fracionado, cujo os resultados estão expressos na tabela 20.

O conteúdo de fenóis totais foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu e expresso em miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama de amostra seca. Analisando os resultados obtidos, foi observada uma diferença significativa na quantidade de polifenóis totais entre os dois estados.

Tabela 20- Teor de compostos fenólicos totais (PT) dos extratos de *Morus nigra* L

Amostra	PT mg de EAG/ g de amostra ($\bar{x} \pm dp$)
EA₂PE	3,424 \pm 0,02
EA₄PB	7,05 \pm 0,01

Valores foram expressos média \pm d.p (n=3); EAG = equivalentes de ácido gálico

Fonte: Dados da pesquisa

. A maior concentração de fenólicos consistiu do extrato obtido da Paraíba com 7,05 mg de ácido gálico/g de amostra seca, enquanto o extrato obtido de Pernambuco foi de 3,42 mg de ácido gálico/ g de amostra seca. Essas diferenças podem ser atribuídas a diferentes condições climáticas e ambientais (temperatura, solo, umidade) em que planta cresce, entre os dois estados estudados. Porém, os resultados estão de acordo com os dados publicados por (Polumackanycz; Wesolowski; Viapiana, 2021), que a partir de infusões das folhas de *Morus nigra* L. obteve concentrações de 3,26 mg de EAG/ g de amostra de seca.

5.1.3.6.4. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Os radicais livres são produzidos durante diferentes processos metabólicos no corpo. No entanto, a superprodução desses radicais resulta em estresse oxidativo que pode causar várias doenças graves, como câncer, diabetes, doenças cardiovasculares, inflamações e neurodegenerativas. Assim, atividade antioxidante é conhecido uma substância particular que pode retardar e prevenir significativamente o processo de oxidação quando é

apresentado em baixa concentração em comparação com os substratos oxidáveis, sendo assim, os antioxidantes conseguem combater os efeitos destrutivos aos danos causados pelos radicais livres (Abu Bakar *et al.*, 2022; Rubio *et al.*, 2016b).

Nesse presente estudo, a capacidade dos diferentes extratos de sequestrar o radical DPPH foi avaliado. Portanto, a capacidade antioxidante da amostra de teste foi determinada pela quantidade de conversão da solução de DPPH instável (cor púrpura) reduzido para a forma estável difenil-picril-hidrazina (forma amarela) *in vitro*. A capacidade dos antioxidantes de doar hidrogênio é considerada a causa de sua ação sobre o DPPH, clareando sua cor e diminuindo sua absorvância, essa diferença na coloração possibilita a leitura da absorvância, realizada em 517 nm.

Os resultados da atividade antioxidante dos extratos escolhidos no planejamento fatorial são apresentados na tabela 21 e indicam a porcentagem de poder antioxidante ou sequestradora de radicais livres e são expressos na capacidade necessária para obter a inibição da atividade antioxidante do DPPH em 50% (IC₅₀), sendo melhor a atividade, quanto menor o valor de IC₅₀.

Tabela 21-Atividade antioxidante dos extratos das folhas de *Morus nigra* L.-

Amostra	IC₅₀ inibição do radical DPPH (mg/ml)	Atividade antioxidante (%)
EAMn PE	1,80	29,33 ± 0,014
EAMn PB	1,07	43,99 ± 0,041

Fonte: Dados da pesquisa

Ambos os extratos das folhas podem eliminar o radical livre DPPH, provando que possuem atividade antioxidante. Os resultados dos estudos revelaram que o extrato aquoso obtido no estado da Paraíba (43,99%) teve a atividade inibitória do radical DPPH mais expressiva, comparado ao estado de Pernambuco (29,33%) (p>0,05). Os dados apontam, que os extratos de *Morus nigra* L. obtidos na Paraíba evidenciam uma maior capacidade de sequestrar radicais livres (IC₅₀=1,07 mg/mL) comparada com a do extrato obtido das folhas de Pernambuco (IC₅₀=1,80 mg/mL), por menores concentrações do extrato conseguirem reduzir pela metade o DPPH remanescente no sistema. Os resultados apresentam conformidade com o estudo de (Dalmagro; Camargo; Zeni, 2017b) no qual, observaram valores de atividade antioxidante em extratos aquosos de folhas de amoreira preta de IC₅₀ de 1,25 mg/mL.

Esse padrão de resultado pode ser esperado, principalmente pelos teores de compostos fenólicos dos extratos aquosos obtido na Paraíba serem maiores, já que esses compostos são conhecidos por serem fortes antioxidantes que permitem doar prótons, eliminando espécies de radicais de oxigênio, bem como de metais quelatos (Abu Bakar *et al.*, 2022; Atanu *et al.*, 2022). Além de que, tem-se sugerido que a maioria dos compostos antioxidantes trabalham sinergicamente para gerar uma ampla gama de atividade e que a presença de diferentes compostos fenólicos, principalmente ácidos fenólicos e flavonoides, podem influenciar nos mecanismos que exibem na atividade de eliminação dos radicais livres, pois são compostos antioxidantes primordiais responsáveis pela desativação de radicais livre, devido à sua capacidade de doar átomos de hidrogênio. O que justifica a diferença dessa atividade entre os extratos dos dois estados estudados, já que o processo de cultivo ou as condições de extração são diferentes, embora, tenham utilizado o mesmo solvente para ambos os extratos (Gobbo-Neto; Lopes, 2007; Kebal *et al.*, 2022b).

5.1.3 Considerações Finais

No processo de otimização da extração, a variável proporção droga:solvente surgiu como uma das variáveis mais importantes devido a sua influência sobre as variáveis dependentes, essa influência recaiu sobre as variáveis dos extratos obtidos nas duas localidades.

Na análise dos extratos padronizados por HPLC foram observados como principais picos majoritários o do ácido clorogênico, isoquercetina e rutina. Para o efeito das variáveis de entrada sobre o teor de polifenóis as variáveis temperatura e proporção droga:solvente tiveram influência significativa sobre o teor de polifenóis, sendo o teor de ISO relatado como o único estatisticamente relevante. A maximização para o extrato de PE foi obtida no EaMn2 (temperatura= 70°; droga:solvente= 25:250; tempo 60 min) e para o extrato da PB no EaMn4 (temperatura= 85°; droga:solvente= 25:250; tempo= 30 min) demonstrando condições ótimas de preparo das soluções extrativas por infusão, bem como comprovando), que condições de cultivo influenciam nas características químicas das folhas. Dessa forma é imprescindível a padronização e otimização do método extrativo em plantas medicinais de interesse comercial.

Foi desenvolvido e validado ainda um método para quantificação de fenólicos totais por espectrofotometria no UV-Vis, expressos em equivalente de ácido gálico. O método

desenvolvido demonstrou ser linear, seletivo, exato, robusto e preciso quanto aos subparâmetros de repetitividade e reprodutibilidade.

Obtendo, portanto, dados apresentados que confirmam que o extrato das folhas de *Morus nigra* L. obtidos através do método de infusão, apresentam atividade antioxidante *in vitro* e devem ser considerados novas fontes de antioxidantes naturais em conjunto, com outras plantas ricas em fenólicos. Dado este, que servem como objeto de pesquisa, visto que as plantas medicinais têm potencial para produção de medicamentos, cosméticos, nutracêuticos e afins.

Porém, mais estudos são necessários para examinar o potencial o uso desses extratos na prevenção ou tratamento de patologias onde o estresse oxidativo parece desempenhar um papel importante. Embora, apesar de ser um estudo preliminar, este trabalho fornece dados importantes para estudos posteriores.

5.2 ARTIGO 2- DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS PARA INCORPORAÇÃO DO EXTRATO AQUOSO DE *Morus nigra* L.

5.2.1. Introdução

A crescente demanda pela utilização de produtos naturais em diversos setores, incluindo as indústrias alimentícias e farmacêuticas, está atualmente impulsionando a pesquisa científica em torno das plantas medicinais amplamente utilizadas pela cultura popular. A folha de *Morus nigra* L., também conhecida como folha de amoreira-preta, é uma parte da planta *Morus nigra* L., a qual é amplamente conhecida por seus frutos comestíveis, as amoras-pretas. As folhas dessa planta também são de grande interesse devido à presença de compostos fenólicos (D'urso *et al.*, 2020; Hao *et al.*, 2022).

Os compostos fenólicos encontrados na folha de *Morus nigra* L. incluem diversos tipos de polifenóis, como flavonoides, antocianinas, ácido clorogênico, quercetina e rutina, entre outros. Esses compostos conferem várias propriedades benéficas à folha, tornando-a valiosa para diferentes aplicações. Os flavonoides, por exemplo, são conhecidos por suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e potencialmente cardioprotetoras (Chen *et al.*, 2018; D'urso *et al.*, 2020; Erden, 2021; Hao *et al.*, 2022; Talo Yildirim *et al.*, 2019; Turan *et al.*, 2017).

Com o objetivo de fortalecer a estabilidade e proteger a sensibilidade dos compostos bioativos durante o processamento e armazenamento, as indústrias de alimentos e nutracêuticos têm adotado a tecnologia de nano/microencapsulação. Além de oferecer proteção contra condições adversas durante o processamento e armazenamento, os compostos bioativos encapsulados permitem a entrega direcionada e a liberação controlada para um local ou aplicação específica. Essa abordagem torna-se especialmente vantajosa, pois garante uma maior eficácia e potencializa o impacto positivo dos compostos encapsulados.

A encapsulação é um processo de empacotamento em partículas que envolve o carregamento de compostos bioativos em matrizes, mantendo sua estabilidade química e permitindo a liberação controlada no momento e taxa desejada. Essa técnica melhora a estabilidade e a biodisponibilidade dos compostos ao reduzir sua reatividade com o ambiente (água, luz e oxigênio) e diminuir a evaporação ou a taxa de transferência para o exterior, protegendo-os contra oxidação, fotólise e interações com outros componentes da formulação (De Conto *et al.*, 2020; Massella *et al.*, 2018).

Os compostos a serem encapsulados são chamados de núcleo ou recheio, enquanto o material que forma as partículas é conhecido como encapsulante, cobertura ou parede. As partículas encapsuladas podem ser classificadas como macro, micro ou nanopartículas, dependendo de seu tamanho. As nanopartículas, por exemplo, são partículas individuais com diâmetro menor que 1000 nm (Laller *et al.*, 2020). Devido ao seu tamanho reduzido, as nanopartículas apresentam propriedades de liberação de compostos bioativos mais eficientes, como aumento da solubilidade e tempo prolongado de resistência no trato gastrointestinal, entre outras características. Esses benefícios tornam a encapsulação uma abordagem promissora para a aplicação de compostos bioativos em diversas indústrias, incluindo alimentos e nutracêuticos (Ferreira; Nunes, 2019b).

Levando em consideração tais fatores, este estudo tem como objetivo desenvolver e caracterizar nanopartículas contendo compostos fenólicos a partir do extrato aquoso de *Morus nigra* L.

5.2.2. MATERIAL E MÉTODOS

5.2.2.1 MATERIAL

O polímero Eudragit® RL100 foi doado pela Evonik (Essen, Alemanha), o tensoativo Pluronic® F-127 foi comprado da Sigma (St Louis, EUA), o Álcool Polivinílico foi comprado da Química Contemporânea (Indaiatuba, São Paulo), o diclorometano e acetona foi obtido da Neon Comercial Reagentes Analíticos (Suzano, São Paulo), Água ultrapura foi obtida pelo equipamento Milli Q water Ultrapure Simplicity® (Merck, Darmstadt, Alemanha).

5.2.2.2 MÉTODOS

5.2.2.2.1 Desenvolvimento e otimização de nanopartículas

5.2.2.2.1.1 Modelo de triagem Planejamento Fatorial Fracionado

O desenvolvimento tradicional de formulações farmacêuticas geralmente é baseado na alteração de uma variável de cada vez, mantendo outras constantes, o que requer tempo, energia e custo. O uso de DOE permite avaliar simultaneamente um grande número de variáveis em poucas análises experimentais, determinando os fatores mais críticos no seu desenvolvimento.

Assim, inicialmente, foram realizados experimentos preliminares para determinar os principais fatores e faixas apropriadas que afetam significativamente no desenvolvimento da formulação. Para isso, o método de Planejamento Fatorial Fracionado foi aplicado, pois este projeto experimental é uma ferramenta de triagem útil, que reduz o número de experimentos e determina variáveis influentes para otimização adicional. O planejamento foi aplicado para os dois métodos de obtenção de nanopartículas brancas, ou seja, sem a presença do ativo, afim de determinar as variáveis que influenciam significativamente na variável resposta.

5.2.2.2.1.1.1 MODELO DE TRIAGEM PARA O MÉTODO DE NANOPRECIPITAÇÃO

Efeitos de oito fatores como: A= concentração do tensoativo (mg/mL); B= concentração do polímero (mg/mL); C= frequência de sonicação (W); D= tempo de sonicação (s); E= volume da fase aquosa interna (mL); F=volume da fase dispersante (mL) e G= volume da fase orgânica (mL) e H= tipo de tensoativo foram avaliados utilizando o planejamento fatorial fracionado com dois pontos centrais, gerando um total de 18 experimentos, para as respostas Y_1 = índice de polidispersão, Y_2 = tamanho de nanopartículas (nm) e Y_3 = potencial zeta (mV) testados como descrito na tabela 22. O objetivo do planejamento é minimizar o índice de polidispersão e o tamanho de partícula, e maximizar a estabilidade das nanopartículas através do potencial zeta mais próximo ou acima de +30 mV. A seleção dos parâmetros significativos foi realizada com base em o valor-p ($< 0,05$) obtido a partir da análise ANOVA do modelo para o modelo linear equações.

Tabela 22- Níveis de desenho experimental para o método de obtenção de nanopartículas por nanoprecipitação

(Continua)

Variáveis independentes		Nível de variação		
Código	Fatores	-1	0	+1
A	Concentração do tensoativo (mg/mL)	1	2	3
B	Concentração do polímero (mg/mL)	1,4	2,1	2,8

Fonte: Dados da pesquisa

Tabela 23- Níveis de desenho experimental para o método de obtenção de nanopartículas por nanoprecipitação

(Conclusão)

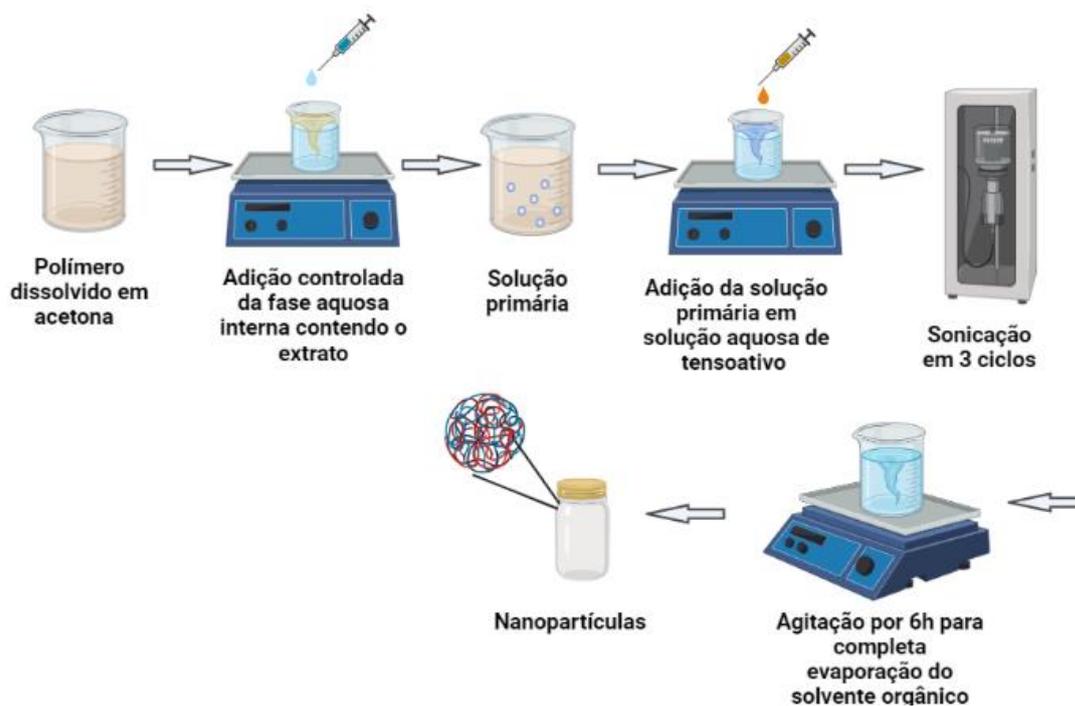
Variáveis independentes		Nível de variação		
Código	Fatores	-1	0	+1
C	Frequência do sonificador (w)	40	60	80
D	Tempo de sonicação (s)	30	60	90
E	Volume da fase aquosa interna (mL)	1,5	2,0	2,5
F	Volume da fase dispersante (mL)	8	10	12
G	Volume da fase orgânica (mL)	2	3,5	5
H	Tipo de tensoativo	PVA	-	Pluronic®F- 127
Variáveis dependentes				
Y₁ = índice de polidispersão				
Y₂ = tamanho das nanopartículas (nm)				
Y₃ = potencial zeta (mV)				

5.2.2.2.1.2. Método de preparação das nanopartículas por nanoprecipitação

As nanopartículas foram preparadas através do método de nanoprecipitação (figura 35) ou deslocamento do solvente usando diferentes proporções de polímero e tensoativo, baseado por (Salatin *et al.*, 2017) com pequenas modificações. Diferentes quantidades de polímero Eudragit RL100 foram dissolvidas em acetona. O extrato aquoso ou água Mili-Q (para as nanopartículas brancas) foi adicionada gota a gota com o auxílio de uma seringa equipada com uma agulha (22G, 30x0,7mm diâmetro interno) na solução orgânica com 7cm de altura e velocidade de 0,5 mL/min, agitada a 500 rpm. Essa mistura foi então adicionada a uma solução aquosa externa contendo tensoativo para estabilização da suspensão. Em seguida a mistura foi homogeneizada através de uma sonda de

ultrassom (Ecosonics® QR 800, São Paulo) e deixada a temperatura de 25°C por 6h a uma velocidade de 500 rpm para completa evaporação do solvente orgânico.

Figura 35- Fluxograma da obtenção de nanopartículas por nanoprecipitação



Fonte: Dados da pesquisa

5.2.2.2.1.3 Modelo de triagem para o método de dupla emulsificação

Os efeitos de nove fatores como: A= concentração do tensoativo (mg/mL); B= concentração do polímero (mg/mL); C= frequência de sonicção (W); D= tempo de sonicção (s); E= volume da fase aquosa interna (mL); F=volume da fase dispersante (mL), G= volume da fase orgânica (mL), H= fase dispersante final (mL) e I= tipo de tensoativo para as respostas Y_1 = índice de polidispersão, Y_2 = tamanho de nanopartículas (nm) e Y_3 = potencial zeta (mV) foram testados como descrito na tabela 23, através de um planejamento fatorial fracionado com 18 ensaios e dois pontos centrais. O objetivo do planejamento é minimizar o índice de polidispersão e tamanho de partícula e maximizar a estabilidade das suspensões, através do potencial zeta esteja mais próximo ou acima de +30mV. A seleção dos parâmetros significativos foi realizada com base em o valor-p (< 0,05) obtido a partir da análise ANOVA do modelo para o modelo linear equações.

Tabela 24- Níveis de desenho experimental para o método de obtenção de nanopartículas por dupla emulsificação do solvente.

Variáveis independentes		Nível de variação		
Código	Fatores	-1	0	+1
A	Concentração do tensoativo (mg/mL)	0,5	0,75	1
B	Concentração do polímero (mg/mL)	4	4,5	5,0
C	Frequência do sonificador (w)	30	45	60
D	Tempo de sonicação (s)	30	60	90
E	Volume da fase aquosa interna (mL)	1,0	1,5	2,0
F	Volume da fase dispersante (mL)	10	17,5	25
G	Volume da fase orgânica (mL)	6	8	10
H	Volume dispersante final (mL)	100	110	120
I	Tipo de tensoativo	PVA	Pluronic® F-127	
Variáveis dependentes				
Y_1 = índice de polidispersão				
Y_2 = tamanho das nanopartículas (nm)				
Y_3 = potencial zeta (mV)				

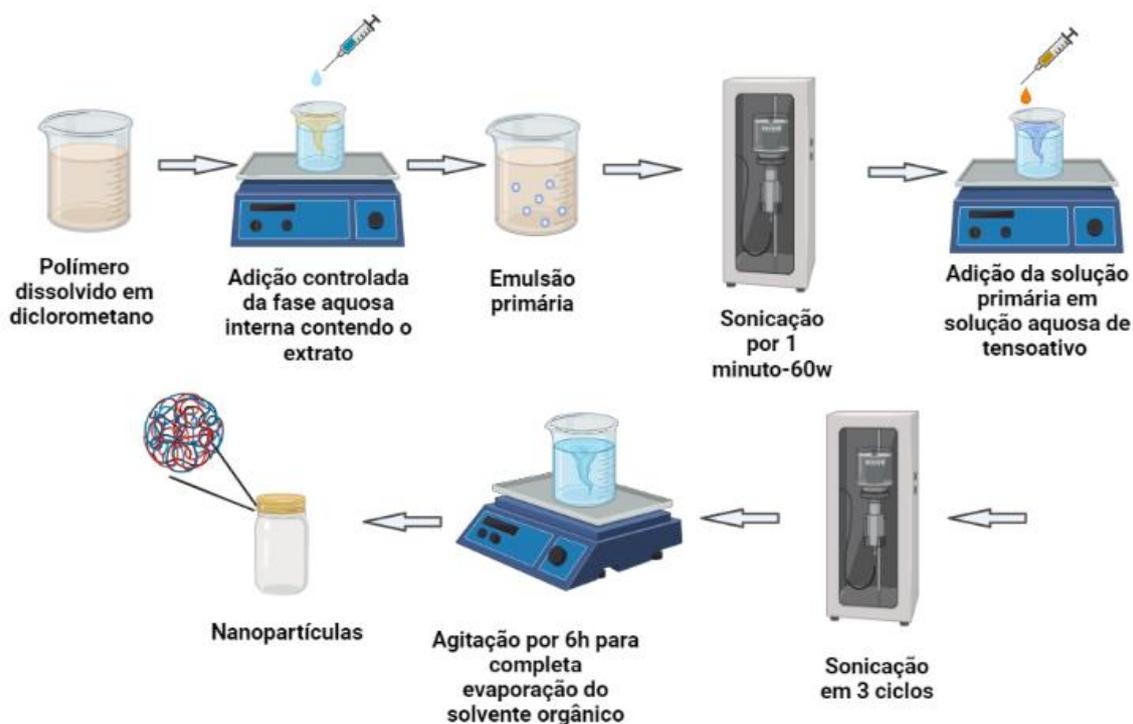
Fonte: Dados da pesquisa

5.2.2.2.1.4 Método de preparação das nanopartículas por dupla emulsificação

As nanopartículas foram preparadas pelo método de dupla emulsificação por evaporação do solvente (A/O/A) desenvolvido por (Dillen *et al.*, 2006) com pequenas modificações. Brevemente, a fase orgânica foi preparada dissolvendo o polímero Eudragit RL100 em diclorometano. A emulsão primária foi então preparada através da emulsificação da fase aquosa, na fase orgânica usando uma sonda de ultrassom (Ecosonics® QR 800, São Paulo) por 60s a 40w. A emulsão resultante a/o foi então vertida a uma solução aquosa de álcool polivinílico ou Pluronic® F-127 gota a gota, com

o auxílio de uma seringa equipada com uma agulha (22G, 30x0,7mm diâmetro interno) e sonicada para obter uma emulsão múltipla a/o/a durante três ciclos. A emulsão foi então diluída em solução de tensoativo de acordo com o método da otimização a 0,3 % (p/v) em água, para minimizar a coalescência. O solvente orgânico, foi então evaporado sob agitação magnética a 500 rpm por 6h à temperatura de 25°C como demonstrado através do fluxograma da figura 36.

Figura 36- Fluxograma de obtenção das nanopartículas pelo método de dupla emulsificação por evaporação do solvente



Fonte: Dados da pesquisa

5.2.2.2.2. Ensaio de compatibilidade

Um ensaio de compatibilidade entre os componentes da formulação foi realizado para triagem dos componentes que seriam usados no desenvolvimento das nanopartículas com o extrato. Uma análise, com os componentes da formulação através de misturas binárias e misturas da formulação completa foi realizada por TG/DTG, e FTIR, de modo a avaliar possíveis incompatibilidades entre os componentes. Alterações drásticas como deslocamento, surgimentos ou desaparecimento de eventos térmicos, bem como surgimento/desaparecimento de bandas no espectro do infravermelho comparados ao

perfil original dos compostos isolados foram avaliados quanto à indicação de incompatibilidades.

5.2.2.2.3. Design BOX-BEHNKEN para otimização das nanopartículas

Com base nos ensaios preliminares de triagem, o projeto Box-Behnken de 3 níveis, com 3 pontos centrais, levando a 15 experimentações aleatórias, foi empregado para estudar o efeito de cada variável independente em variáveis dependentes (tamanho de partícula, índice de polidispersão, potencial zeta e eficiência de encapsulação), no intuito de definir as interações dos principais fatores, bem como para otimização da formulação e os parâmetros de processo para a preparação de nanopartículas de Eudragit®RL100 carregadas com extrato de *Morus nigra* L.

Este projeto é adequado, pois explora um planejamento fatorial de três níveis, permitindo uma estimativa eficiente e econômica dos coeficientes de primeira e segunda ordem do modelo matemático ajustado, requerendo poucas combinações de fatores.

5.2.2.2.3.1 Planejamento Box-Behnken para otimização de nanopartículas através da nanoprecipitação

A partir do planejamento de triagem, foi possível compreender as variáveis significativas que influenciavam na produção das nanopartículas e, portanto, foram utilizadas durante a preparação com o objetivo de maximizar a resposta pretendida. Assim, as nanopartículas foram preparadas conforme descrito na seção 2.2.1.1.1.1 empregando o Eudragit®RL100 como polímero, acetona como solvente orgânico, extrato aquoso como fase aquosa e Pluronic®F-127 como tensoativo. Sendo assim, foi utilizado no preparo 2,5 mL da fase aquosa interna, 2 mL da fase orgânica, 12 mL da fase dispersante e 90 s de sonicação para homogeneização, com uma potência de 40w.

Para otimização das nanopartículas contendo o extrato foram verificadas três variáveis independentes: concentração do polímero, concentração de tensoativo e proporção polímero/extrato. Para cada variável foi atribuído um valor baixo, médio ou alto (ver Tabela 24). O índice de polidispersão, tamanho, potencial zeta e eficiência de encapsulação das nanopartículas foram selecionados como variáveis dependentes de resposta. O objetivo da otimização foi obter nanopartículas com menor índice de polidispersão e tamanho, com maior carga positiva de superfície e maior eficiência de encapsulação.

Tabela 25- Níveis de desenho experimental para o método de obtenção de nanopartículas por nanoprecipitação com extrato

Fatores	Nível de variação		
	-1	0	+1
Concentração do polímero (% m/v)	0,7	1,4	2,1
Concentração de tensoativo (% m/v)	0,5	1,0	1,5
Proporção polímero/extrato	7:1	10:1	13:1
Variáveis dependentes			
Y₁ = índice de polidispersão			
Y₂ = tamanho das nanopartículas			
Y₃ = potencial zeta			
Y₄ = eficiência de encapsulação			

Fonte: Dados da pesquisa

O modelo experimental mais adequado (linear, interação de dois fatores, quadrático e modelos cúbicos) foi avaliada estatisticamente de acordo com o coeficiente de correlação múltipla (R^2) fornecido pelo software STATISTICA 10 (StatSoft®, Dell Software, Round Rock, TX, EUA). Os efeitos dos modelos obtidos foram avaliados analisando a estatística significância dos coeficientes usando ANOVA (p-valor 0,05).

A otimização da formulação foi realizada, assumindo valores obtidos após o perfil do software STATISTICA10. O objetivo do estudo foi atingir: nanopartículas com tamanhos menores que 300 nm, minimizar o PDI, atingir o potencial zeta em torno +30mV ou mais e maximizar a eficiência de encapsulação.

5.2.2.2.3.2 Planejamento Box-Behnken para otimização de nanopartículas através da dupla emulsificação por evaporação do solvente

A fim de avaliar a correlação entre as respostas e os fatores durante o desenvolvimento das nanopartículas, maximizando a eficiência experimental com o mínimo número de experimentos, um projeto BOX-BEHNKEN de três níveis e três fatores foi aplicado.

As variáveis independentes selecionadas foram a quantidade do polímero, a quantidade de surfactante e proporção polímero:extrato. Esses parâmetros e seus valores mais baixos (-1), valores médios (0) e superiores (+1) foram selecionados com base em

estudos de triagem anteriores para cada variável. Outros parâmetros foram definidos como níveis fixos. As respostas estudadas foram: Y_1 = PDI, Y_2 = diâmetro médio da partícula, Y_3 = potencial zeta (ZP), Y_4 = eficiência de encapsulação. Os resultados foram estudados por meio da análise de variância (ANOVA) e análise de regressão como demonstrados na tabela 25.

Tabela 26- Níveis de desenho experimental para o método de obtenção de nanopartículas por dupla emulsificação com extrato

Fatores	Nível de variação		
	-1	0	+1
Concentração do polímero (% m/v)	4,5	5,0	5,5
Concentração de tensoativo (% m/v)	0,25	0,5	0,75
Proporção polímero/extrato (p/v)	10:1	15:1	20:1
Variáveis dependentes			
Y_1 = índice de polidispersão			
Y_2 = tamanho das nanopartículas			
Y_3 = potencial zeta			
Y_4 = eficiência de encapsulação			

Fonte: Dados da pesquisa

Assim, as nanopartículas foram preparadas conforme descrito na seção 5.2.2.2.1 empregando o Eudragit®RL100 como polímero, diclorometano como solvente orgânico, extrato aquoso como fase aquosa e Pluronic®F-127 como tensoativo. Dessa forma, foi utilizado no preparo 2 ml da fase aquosa interna, 10 ml da fase orgânica, 10 ml da fase dispersante, 100 ml de Pluronic®F-127 a 0,3% como fase final externa, utilizando 90s de sonicação para homogeneização, com uma potência de 60w.

O modelo experimental mais adequado (linear, interação de dois fatores, quadrático e modelos cúbicos) foi avaliada estatisticamente de acordo com o coeficiente de correlação múltipla (R^2) fornecido pelo software STATISTICA 12 (StatSoft®, Dell Software, Round Rock, TX, EUA). Os efeitos dos modelos obtidos foram avaliados analisando a estatística significância dos coeficientes usando ANOVA (p-valor 0,05).

A otimização da formulação foi realizada, assumindo valores obtidos após o perfil do software STATISTICA®12. O objetivo do estudo foi atingir: nanopartículas com

tamanhos menores que 300 nm, minimizar o PDI, atingir o potencial zeta em torno +30mV ou mais e maximizar a eficiência de encapsulação.

5.2.2.2.4 Avaliação analítica da formação das nanopartículas

5.2.2.2.4.1 Determinação do tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta

Foi utilizado o equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern, Reino Unido), com ângulo de incidência da luz de 90°, o tamanho médio, bem como o PDI foram analisados por dispersão dinâmica de luz (DLS). As nanopartículas foram diluídas com água ultrapura até atingir uma concentração adequada para medição, ou seja, Kcps em torno de 500, portanto as amostras foram diluídas a uma proporção de 1:10 para evitar dispersão múltipla. Cerca de 1 mL de amostra foi transferido para uma cubeta de poliestireno, a medição foi realizada a 25°C, com ângulo de detecção de 90° e comprimento de onda de 633nm. Já o potencial zeta foi determinado por laser Doppler microeletroforese em um Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Reino Unido) usando o Equação de Smoluchowsky a 25°C.

Todas as medidas foram realizadas em triplicata com três leituras verdadeiras para cada amostra. Os resultados foram apresentados como média \pm desvio padrão dos valores obtidos.

5.2.2.2.4.2 Eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação dos polifenóis totais nas diferentes formulações foi avaliada pelo método de Folin-Ciocalteu para quantificar o extrato livre na fase aquosa e deduzir a quantidade do extrato encapsulado de acordo com método descrito por (Gali *et al.*, 2022) com algumas modificações. As amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 40 min Daiki DTC-16000). Os sobrenadante obtido foi filtrado através de filtros de PTFE de 0,2 μ m (Acrodisc®, PALL Italia srl, Milão, Itália). Os extratos livres foram determinados pelo método de Folin-Ciocalteu, conforme relatado na seção 4.5. Resumidamente, 250 μ L da amostra foram misturados com 12,5 mL de água destilada, 5 mL de carbonato de sódio (20%) e 1,2 mL de reagente Folin Ciocalteu em um balão de 25 mL. A mistura foi vigorosamente agitada e incubada em temperatura ambiente por 30 min. A absorbância da cor azul foi lida a 749 nm usando um espectrofotômetro UV-Visível Shimadzu (Modelo UV mini 1240). Uma curva de calibração padrão foi obtida

contra diferentes concentrações de extrato. Para levar em conta o efeito dos constituintes das partículas a nanopartícula sem o extrato foram usadas como brancos.

Todas as análises foram realizadas em triplicata e a eficiência de encapsulamento (EE%) dos compostos fenólicos encapsulados foi calculado usando a Equação 15:

$$EE (\%) = 100\% - \left(\frac{\text{Total dos compostos fenólicos não incorporado}}{\text{Quantidade de compostos fenólicos inicial}} \right) \times 100\% \quad (15)$$

5.2.2.2.4.3 Análise morfológica por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A análise morfológica das nanopartículas foi realizada com o auxílio de um microscópio eletrônico de varredura (Shimadzu SS-550 com filamento de Tungstênio e com acoplamento para EDS). As amostras foram fixadas em um suporte metálico com auxílio de uma fita dupla-face de carbono e recobertas com uma fina camada de ouro. A visualização foi realizada em aumentos de 300 a 2200 vezes, com uma voltagem de excitação de 10 a 15 kV (Fávaro; trindade; grosso, *et al.* 2002).

5.2.2.2.4.4. Determinação da estabilidade de armazenamento

As nanopartículas contendo o extrato ou não foram divididas e armazenadas em temperatura ambiente ($30^\circ \pm 2^\circ\text{C}$) e sob refrigeração ($4^\circ \pm 0,5^\circ\text{C}$). Ao longo do período de armazenamento, análises das propriedades físico-químicas foram realizadas em intervalos de tempo pré-determinados (7, 15, 30, 45 e 60 dias), monitorando o diâmetro médio, PDI e potencial zeta

5.2.2.2.4.5. Liofilização das nanopartículas

Na última etapa da obtenção das nanopartículas, após a avaliação da viabilidade tecnológica da preparação de nanopartículas, e das vantagens em relação ao fármaco livre, um estudo sobre a conversão destas formulações em formas farmacêuticas sólidas foi realizado, objetivando a obtenção de produtos secos redispersíveis, capazes de aumentar a estabilidade físico-química do ativo.

Assim, a liofilização das nanopartículas foi realizada no liofilizador L101 (Liobras, Brasil), que consiste principalmente de três prateleiras dentro de uma câmara, um condensador a $-45 \pm 5^\circ\text{C}$ e uma bomba de vácuo. A pressão do sistema ficou abaixo

de 150 μ Hg. O equipamento utilizado na liofilização forneceu boa estabilidade de temperatura no condensador e pressão baixa, requisitos importantes durante o processo.

Para determinar os parâmetros ideais para o processo de liofilização foram usados diferentes crioprotetores (sacarose, maltodextrina e maltose) em diferentes concentrações (2; 2,5 e 3%) a fim de analisar o efeito da concentração do crioprotetor em relação à quantidade de polímero (m/m). As condições otimizadas consistiram no congelamento das nanopartículas em nitrogênio líquido (-196°C) por 4 minutos seguidos de 96 horas de liofilização. A fim de comparação, nanopartículas sem a utilização de crioprotetor foram liofilizadas e utilizadas como controle. Os liofilizados foram preparados em triplicata e armazenados em dessecador, em frascos de vidro e ao abrigo da luz. As suspensões foram reconstituídas em água sob leve agitação e foram avaliadas o tamanho médio de partícula e PDI.

5.2.2.2.4.5.3 FTIR

O FTIR foi realizado entre os componentes da formulação e o crioprotetor para avaliar a compatibilidade entre eles. Essa análise é importante para verificar se os componentes da formulação e o crioprotetor interagem de forma adequada e se não há reações indesejadas que possam comprometer a estabilidade ou eficácia das nanopartículas durante o processo de liofilização. Alterações drásticas como deslocamento, surgimentos ou desaparecimento de eventos térmicos, bem como surgimento/desaparecimento de bandas no espectro do infravermelho comparados ao perfil original dos compostos isolados foram avaliados quanto à indicação de incompatibilidades.

5.2.2.2.4.5.2 ESTUDO DE LIBERAÇÃO *IN VITRO*

Ensaio de liberação do fármaco *in vitro* das nanopartículas foram conduzidos de acordo com a técnica de bolsa de diálise (LUAN et al., 2015). Membranas de diálise de acetato de celulose com tamanho de poro de 12-14 KDa (SERVAPOR®, Alemanha) foram embebidos em água ultrapura 12h antes do ensaio. Para o teste, 2 mL da solução do extrato e das nanopartículas em dispersão foram colocados, separadamente, na bolsa de diálise selada em ambas as extremidades e então colocado em um béquer contendo 20 mL do meio de liberação, sob agitação de 100 rpm em banho-maria à 37 ± 1 °C. O ensaio foi conduzido consecutivamente em diferentes meios, simulando a administração oral, sendo 2h em tampão HCl pH 1,2 (meio gástrico), e o restante em tampão fosfato pH 6,8

(meio intestinal) até o fim do ensaio. Em todos os estágios, 2 mL de meio de liberação foi retirado nos tempos de 15 minutos, 30 minutos, 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h, 8h, 12h, 24h, 36h e 48h, e a mesma quantidade de meio fresco foi repostado para manter o volume constante e as condições sink.

A solução de HCl 6M foi usada como zero para as análises, bem como as soluções tampão de cada etapa foram utilizadas como branco. As amostras foram quantificadas a partir da determinação dos compostos fenólicos totais a partir da reação com Folin-Ciocalteu devidamente validada, como demonstrado no capítulo 1. Os resultados foram expressos pela porcentagem cumulativa de extrato liberada em função do tempo, que foi calculada baseada na quantidade total de extrato adicionada ao ensaio.

Um segundo ensaio de liberação foi realizado após o processo de liofilização das nanopartículas. Neste caso, as nanopartículas liofilizadas foram redispersas em água ultrapura, na mesma quantidade presente antes da liofilização, e 2 mL desta dispersão foi utilizada no ensaio de liberação, o qual seguiu o mesmo protocolo citado acima.

A cinética de liberação do fármaco foi estimada usando o DDSolver, a fim de encontrar o modelo cinético mais adequado. Foram testados os modelos ordem zero, primeira ordem, Higuchi, Korsmeyer-Peppas, Peppas-Sahlin e Hixon-Crowell. O coeficiente de determinação (R^2) e o coeficiente de determinação ajustado (R^2 ajustado) foram calculados para determinar o modelo de melhor ajuste.

5.2.2.2.4.5.3 CITOTOXICIDADE IN VITRO

A citotoxicidade em células de mamíferos foi determinada pelo método colorimétrico baseado na redução dosais tetrazolium3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl]-2,5-difeniltetrazolium brometo (MTT) por células viáveis. As células da linhagem endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC-ATCC) foram soltas das garrafas de cultura, colocados em placas de 96 poços e incubados por 24 h à 37°C e atmosfera com 5% de CO₂. Após esse tempo, os compostos (extrato de *Morus nigra* L., nanopartículas branca e nanopartículas contendo o extrato) foram adicionados nas concentrações de 1500 a 23,37 µg/mL incubados novamente por um período de 48h. Após a incubação foi acrescentado 25 µL de 5 mg/mL em PBS, seguida de uma nova incubação por 2h, a 37°C e ao abrigo da luz. Parte do meio de cultura juntamente com o restante de MTT foi aspirado e 100 µL de DMSO foi adicionado por poço para solubilização dos cristais de formazan resultantes da redução do MTT. Foi realizada a leitura da absorbância a 570 nm no espectrofotômetro THERMO SCIENTIFIC Multiskan FC. A concentração citotóxica

para 50% da cultura (CC50) foi determinada por análise de regressão pelo software GraphPad Prism. Cada amostra foi testada em sextuplicada.

5.2.2.2.4.5.4 *Análise estatística*

Os dados foram apresentados como a média de três experimentos. As análises estatísticas para cada resposta do planejamento fatorial fracionado e Box-Behnken foram realizadas no software Statistica® 12 (Stat-Soft®, Dell Software, TX, EUA, utilizando regressão dos mínimos quadrados e ANOVA. Para o perfil cinético de liberação foi utilizado o Microsoft Excel juntamente com a extensão DD-Solver. Os resultados da citotoxicidade foram tratados no software Graph Pad Prism (versão 9.0, La Jolla, CA, EUA), analisados com análise de variância unidirecional, considerando valores de $p < 0,05$ estatisticamente significativos.

5.2.3 Resultados e Discussão

5.2.3.1 *Otimização das nanopartículas poliméricas a partir do planejamento fatorial de triagem*

A otimização das NPs foi realizada a partir da utilização de dois métodos de obtenção: nanoprecipitação e dupla emulsificação por evaporação do solvente.

O método de nanoprecipitação é uma técnica simples, de baixo custo, reprodutível, utiliza-se poucos reagentes, obtém facilidade no controle do tamanho das partículas, baixa contaminação da suspensão resultante, no entanto, a nanoprecipitação apresenta limitações significativas em termos de encapsulamento de moléculas hidrofílicas, essa deficiência deve-se principalmente à baixa solubilidade dos compostos hidrofílicos na maioria dos solventes orgânicos. (Bilati; Allémann; Doelker, 2005; Massella *et al.*, 2018; Xu, Jiang *et al.*, 2019).

Enquanto que a dupla emulsificação por evaporação do solvente apresenta vantagens incluindo a aceleração da formação de nanopartículas, melhor seletividade do produto, distribuição estreita do tamanho das partículas e alto rendimento. Porém, devido ao elevado volume da fase aquosa utilizado na preparação, a obtenção desse tipo de sistema promove o risco de difusão dos princípios ativos para a fase aquosa, durante a emulsificação, reduzindo a eficiência de encapsulamento, bem como a tendência das gotículas internas se coalescerem transformando-as em emulsões únicas. (Sánchez-López *et al.*, 2018; Souto; Severino; Santana, 2012; Venugopal *et al.*, 2016).

Baseado nas vantagens e desvantagens dos métodos escolhidos para obtenção de nanopartículas, a modificação de parâmetros nas técnicas, causam mudanças cruciais nas características físico-químicas das nanopartículas, como tamanho, eficiência de encapsulamento, entre outras. Por isso, o impacto desses parâmetros relacionado ao processo, pode ser explorado a partir de um planejamento de experimento (DOE).

O DOE tem sido usado como uma abordagem poderosa para reduzir a variação em um processo, entre várias abordagens de projetos, o planejamento fatorial fracionado é usado para otimizar e avaliar os efeitos principais das variáveis. Seu uso é importante em planejamento exploratórios, em que muitos fatores são considerados, e geralmente são realizados nos estágios iniciais de um projeto, quando é provável que muitos dos fatores tenham influência ou nenhum efeito na resposta. Além disso, um pequeno número de experimentos é necessário para fornecer uma grande quantidade de dados.(Park *et al.*, 2013).

Sendo assim, o projeto de planejamento fatorial fracionado foi selecionado para identificar os principais fatores que influenciam nas características das nanopartículas, obtidas por nanoprecipitação e dupla emulsificação por evaporação do solvente. Os fatores que ocasionalmente sejam considerados como significativos, serão avaliados em experimentos subsequentes.

5.2.3.2 Planejamento fatorial fracionado de triagem na obtenção de nanopartículas por nanoprecipitação

A escolha da nanoprecipitação para obtenção das nanopartículas, deve-se a sua relevância citada na literatura na produção de nanopartículas a partir de polímeros, além de permitir produção de pequenas nanopartículas (100-300nm) com distribuição unimodal, o método não requer taxa de cisalhamento estendidas, além disso, surfactantes nem sempre são necessários e solventes orgânicos tóxicos inaceitáveis geralmente não são utilizados no procedimento.(Dias *et al.*, 2016; Oliveira *et al.*, 2021) Porém, o método é ideal na incorporação de princípios ativos lipossolúveis, pois a técnica basicamente requer dois solventes miscíveis (acetona e água), em que o composto a ser incorporado é solúvel na fase solvente (acetona), mas apresenta solubilidade muito limitada em água (fase não solvente).

No entanto, pesquisas relacionam a incorporação de substâncias hidrofílicas nesses sistemas, fornecendo evidências de que a nanoprecipitação também pode se

estender para incorporação de substâncias hidrofílicas. (Bilati; Allémann; Doelker, 2005; Massella *et al.*, 2018; Yoo; Choi; Park, 2001).

Assim, nanopartículas sem a presença do extrato aquoso de *Morus nigra* L. foram desenvolvidas pelo método de nanoprecipitação através de um planejamento experimental fracionado, a fim de identificar fatores críticos para a sua produção.

Por conseguinte, o planejamento foi criado por meio de análises estatísticas para tornar o estudo mais robusto. Os fatores analisados nesse estudo foram: (X_1) porcentagem de tensoativo (m/v %), (X_2) = porcentagem de polímero (m/v %), (X_3) = frequência (W), (X_4) = tempo de sonicação (s), (X_5) = fase aquosa interna (mL), (X_6) = fase dispersante (mL), (X_7) = fase orgânica (mL), e por último (X_8) = tipo de tensoativo, (PVA ou Pluronic F-127) que foi o único fator categórico utilizado. Os resultados do planejamento para as respostas (PDI, tamanho e potencial zeta) podem ser vistas na tabela 26.

Para a resposta PDI, na tabela 27 é apresentada os dados da ANOVA, juntamente com os valores de p associados para o projeto da formulação. Os valores de PDI ficaram na faixa entre 0,121 a 0,641 e o principal fator que influenciou esse parâmetro foi a quantidade de polímero, a frequência utilizada no processo de sonicação, o volume da fase aquosa interna, o tipo de tensoativo e as interações entre o polímero e o tipo de tensoativo, bem como a interação entre o polímero e o tempo de sonicação.

Os resultados podem ser comprovados através do valor p dos fatores abaixo de 0,05, que foi o nível de significância estabelecido no modelo. Além disso, pode ser comprovada com base na estatística F, em que $F_{\text{calculado}}$ de todos os fatores citados anteriormente é maior que $F_{\text{crítico}}$, que assume um valor de 161,4 através da tabela F de distribuição ao nível de significância de 0,05. Portanto, aceita-se a hipótese alternativa que pronuncia que os fatores analisados influenciam significativamente na resposta e recusa-se a hipótese nula, onde afirma que não há correlação entre os fatores e variável resposta estudada.

Enquanto que para variável resposta do tamanho de nanopartículas os valores ficaram entre 115,4 a 346,4 nm. Porém nenhum fator estudado influenciou significativamente na variável resposta, como pode ser observado através da tabela X, por meio dos valores de p maiores do que o nível de significância de 0,05, aceitando-se desta forma a hipótese nula.

Já para variável dependente potencial zeta, os valores foram fortemente positivos em todos os casos, variando entre 19,6 e 50,5 mV. Assim, fatores como a concentração do tensoativo, bem como o tipo de tensoativo e a interação entre a concentração do

polímero e do tensoativo, influenciaram na resposta. Os fatores apresentaram valor p menor que o nível de significância de 0,05, afirmando que há correlação entre os fatores significativos e a variável potencial zeta.

Através dos resultados, também é possível concluir que não há falta de ajuste no modelo, para nenhuma resposta estudada, visto que o valor p é maior que nível de significância considerado no modelo (0,05). Assim, aceita-se a hipótese nula, em que discorre que não há falta de ajuste no modelo e recusa-se a hipótese alternativa que assume que há falta de ajuste no modelo.

A fim de determinar se as variáveis influenciaram de forma sinérgica ou antagonica sob a variável resposta, o gráfico de pareto é demonstrado através da figura 37. A linha vertical em vermelho é indicativa do limite de rejeição da hipótese nula, ou seja, para as barras das variáveis dependentes que estiverem após o limite, deve-se aceitar a hipótese alternativa e rejeitar a hipótese nula, confirmando que para aquela resposta específica, os fatores influenciam significativamente na resposta.

Assim, com o objetivo de obter menores valores de índice de polidispersão para as nanopartículas (Figura 37A), pois valores de PDI baixos ($<0,3$), indicam a formação de sistemas monodispersos e nos fornece informações sobre homogeneidade da distribuição dos tamanhos do sistema. (Nemen; Lemos-Senna, 2011). Assim, os fatores independentes como volume da fase aquosa interna e tipo de tensoativo foram positivamente significativos, ou seja, a utilização do maior nível desses fatores estudados, conseguem diminuir significativamente o índice de polidispersão.

Esse resultado é possível ser compreendido, através do sinal do valor da estimativa do efeito padronizado (ser positivo ou negativo), apesar dos valores estimados dos efeitos para esses fatores serem negativos, como o objetivo do sistema é minimizar o índice de polidispersão, deve-se considerar o sinal contrário de cada fator significativo. Da mesma forma, é possível compreender que menores concentrações de polímero, bem como a menor potência de sonicação, conseguem diminuir significativamente o índice de polidispersão. Por isso, a utilização do menor nível para os fatores estudados deve ser acatada.

Tabela 27- Projeto de planejamento fatorial fracionado obtido para seleção de fatores por nanoprecipitação

Experimentos	Variáveis independentes								Variáveis dependentes		
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	Y ₁	Y ₂	Y ₃
1	1	1,4	40	30	1,5	8	2	PVA	0,238	227,6	+39,9
2	3	1,4	40	30	1,5	12	5	Pluronic	0,327	346,4	+38,9
3	1	2,8	40	30	2,5	8	5	Pluronic	0,166	173,6	+49,0
4	3	2,8	40	30	2,5	12	2	PVA	0,641	192,9	+19,6
5	1	1,4	80	30	2,5	12	5	PVA	0,182	242,4	+32,3
6	3	1,4	80	30	2,5	8	2	Pluronic	0,121	266,7	+48,5
7	1	2,8	80	30	1,5	12	2	Pluronic	0,491	225,4	+50,5
8	3	2,8	80	30	1,5	8	5	PVA	0,733	115,4	+28,1
9	1	1,4	40	90	2,5	12	2	Pluronic	0,185	236,7	+40,2
10	3	1,4	40	90	2,5	8	5	PVA	0,209	242,6	+21,1
11	1	2,8	40	90	1,5	12	5	PVA	0,440	196,0	+36,8
12	3	2,8	40	90	1,5	8	2	Pluronic	0,161	242,0	+39,7
13	1	1,4	80	90	1,5	8	5	Pluronic	0,616	123,7	+31,7
14	3	1,4	80	90	1,5	12	2	PVA	0,446	207,2	+20,7
15	1	2,8	80	90	2,5	8	2	PVA	0,429	208,9	+40,6
16	3	2,8	80	90	2,5	12	5	Pluronic	0,254	180,2	+48,5
17	2	2,1	60	60	2,0	10	3,5	PVA	0,162	259,7	+31,6
18	2	2,1	60	60	2,0	10	3,5	PF-127	0,143	243,9	+33,0

X₁= porcentagem de tensoativo (m/v %), X₂= porcentagem de polímero (m/v %), X₃= frequência (W), X₄ = tempo de sonicação (s), X₅= fase aquosa interna (mL), X₆= fase dispersante (mL), X₇= fase orgânica (mL), X₈ = tipo de tensoativo, Y₁= PDI, Y₂= tamanho (nm), Y₃= potencial zeta (mV).

Fonte: Dados da pesquisa

Tabela 28- Resultado da ANOVA modelo quadrático de nanopartículas por nanoprecipitação

Fatores	PDI					Tamanho					Potencial Zeta				
	SS	DF	MS	F	<i>p</i>	SS	DF	MS	F	<i>P</i>	SS	DF	MS	F	<i>p</i>
X₁	0,001	1	0,001	7,280	0,225	1582,05	1	1582,051	12,674	0,174	195,301	1	195,300	199,286	0,045
X₂	0,061	1	0,061	340,055	0,034	8050,58	1	8050,576	64,497	0,078	97,516	1	97,515	99,505	0,063
X₃	0,051	1	0,051	283,595	0,037	5180,40	1	5180,401	41,502	0,098	15,406	1	15,405	15,720	0,157
X₄	0,001	1	0,001	8,753	0,207	1464,98	1	1464,976	11,736	0,180	47,266	1	47,265	48,230	0,091
X₅	0,100	1	0,100	554,094	0,027	227,26	1	227,256	1,820	0,406	11,391	1	11,390	11,623	0,181
X₆	0,005	1	0,005	29,726	0,115	3212,06	1	3212,056	25,733	0,123	7,701	1	7,700	7,857	0,218
X₇	0,002	1	0,002	16,005	0,155	2187,90	1	2187,901	17,528	0,149	11,056	1	11,055	11,281	0,184
X₈	0,062	1	0,062	344,185	0,034	1634,18	1	1634,181	13,092	0,171	727,651	1	727,650	742,500	0,023
X₁X₄	0,113	1	0,113	626,393	0,025	184,28	1	184,281	1,476	0,438	18,706	1	18,705	19,087	0,143
X₁X₅	0,009	1	0,009	50,263	0,089	862,89	1	862,891	6,913	0,231	3,151	1	3,150	3,214	0,323
X₁X₆	0,0221	1	0,022	122,584	0,057	711,56	1	711,556	5,700	0,252	4,306	1	4,305	4,393	0,283
X₁X₇	0,0005	1	0,000	2,994	0,333	1202,36	1	1202,356	9,632	0,198	54,391	1	54,390	55,500	0,084
X₁X₈	0,1113	1	0,111	617,113	0,025	9638,33	1	9638,331	77,217	0,072	258,406	1	258,405	263,679	0,039
Lack of Fit	0,094	3	0,031	173,817	0,055	11407,4	3	3802,467	30,463	0,132	162,882	3	54,294	55,402	0,098
Pure Error	0,000	1	0,000			124,82	1	124,820			0,980	1	0,9800		
Total SS	0,636	17				47671,03	17				1616,105	17			

X₁= porcentagem de tensoativo (m/v %), X₂= porcentagem de polímero (m/v %), X₃= frequência (W), X₄ = tempo de sonicação (s), X₅= fase aquosa interna (mL), X₆= fase dispersante (mL), X₇= fase orgânica (mL), X₈ = tipo de tensoativo, SS = soma dos quadrados, DF= graus de liberdade, MS= quadrado médio.

Ao considerar as interações, é possível observar que para a interação entre a concentração de tensoativo e tipo de tensoativo, juntas influenciam positivamente na variável resposta PDI, de tal modo que se deve avaliar, que para a interação ser positiva, é necessário que os dois fatores sejam positivos ou que os dois fatores sejam negativos, mas devido ao fato da variável independente tipo de tensoativo isoladamente ser significativa e influenciar positivamente na variável resposta, sua interação favorece para que ambas influenciem positivamente na variável resposta PDI. A mesma conclusão é dita para a interação entre a concentração de tensoativo e tempo de sonicação, porém gráficos mais específicos, como o de superfície, são mais úteis para identificar de forma tridimensional para determinar os valores de resposta desejáveis e as condições de funcionamento.

Já no gráfico de pareto para o tamanho das nanopartículas (Figura 37 B), todos os fatores isolados e com interação, não afetaram significativamente na variável resposta, como é possível comprovar através da linha rejeição da hipótese nula, em que todas as barras estão à esquerda da linha.

Enquanto que para variável resposta potencial zeta (Figura 37 C), o objetivo neste caso é maximizar a resposta, já que valores maiores ou próximos de ± 30 mV é bom um indicativo de estabilidade do sistema, pois quanto maior o valor do potencial zeta em módulo, maior será as forças repulsivas e mais estável será o sistema, portanto, a utilização de menores concentrações de tensoativo e a utilização do Pluronic F-127, ou seja, o nível mais baixo da concentração do tensoativo e o nível mais alto do fator tipo de tensoativo aumentam significativamente a variável resposta (Bhattacharjee, 2016; Li *et al.*, 2016). Podendo ser comprovado, devido a variação de sinal negativo e positivo para os efeitos respectivos.

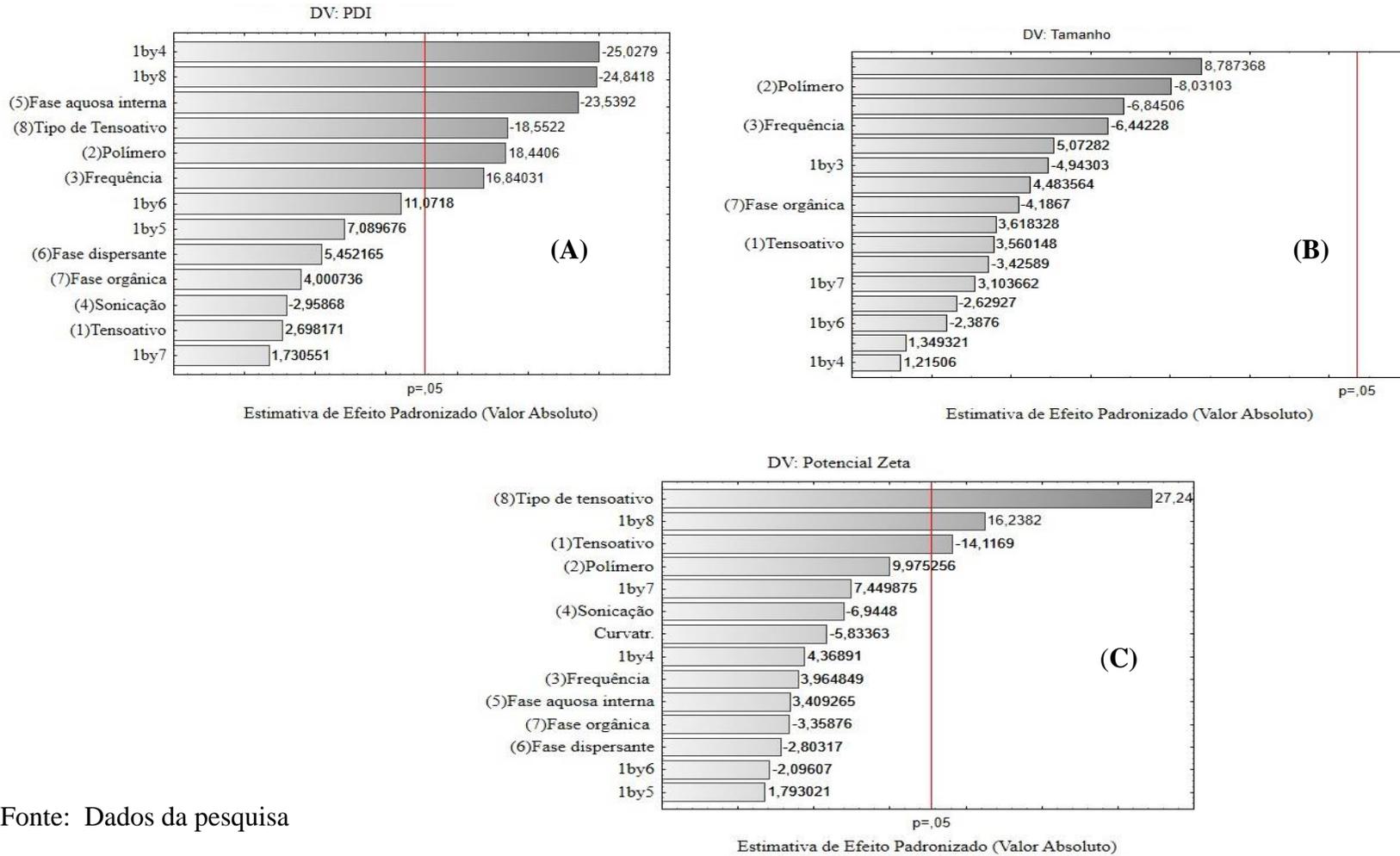
Ao estudar a influência das interações sob a respostas, através do gráfico de superfície visto na Figura 38, observou-se que para a resposta do PDI a interação significativa entre a concentração do polímero e o tempo de sonicação, afim de obter menores valores de PDI abaixo de 0,26, podem ser adquiridos, quando se diminui o tempo de sonicação e utiliza menores concentrações do tensoativo ou quando se emprega maiores concentrações de tensoativo e maiores tempo de sonicação,

Já na figura 38- B, é possível advertir que à medida que se aumenta a concentração de tensoativo Pluronic F-127, é possível obter valores de PDI abaixo de 0,21. Enquanto que para interação da resposta do potencial zeta (Figura 38 C), para a mesma interação, é indicado que ao utilizar PVA (nível mais baixo), deve-se empregar

menores concentrações de tensoativo afim de maximizar a resposta, enquanto que para Pluronic F-127 (nível mais alto), à medida que diminui a concentração do tensoativo é possível obter potencial zeta maiores do que 38,9.

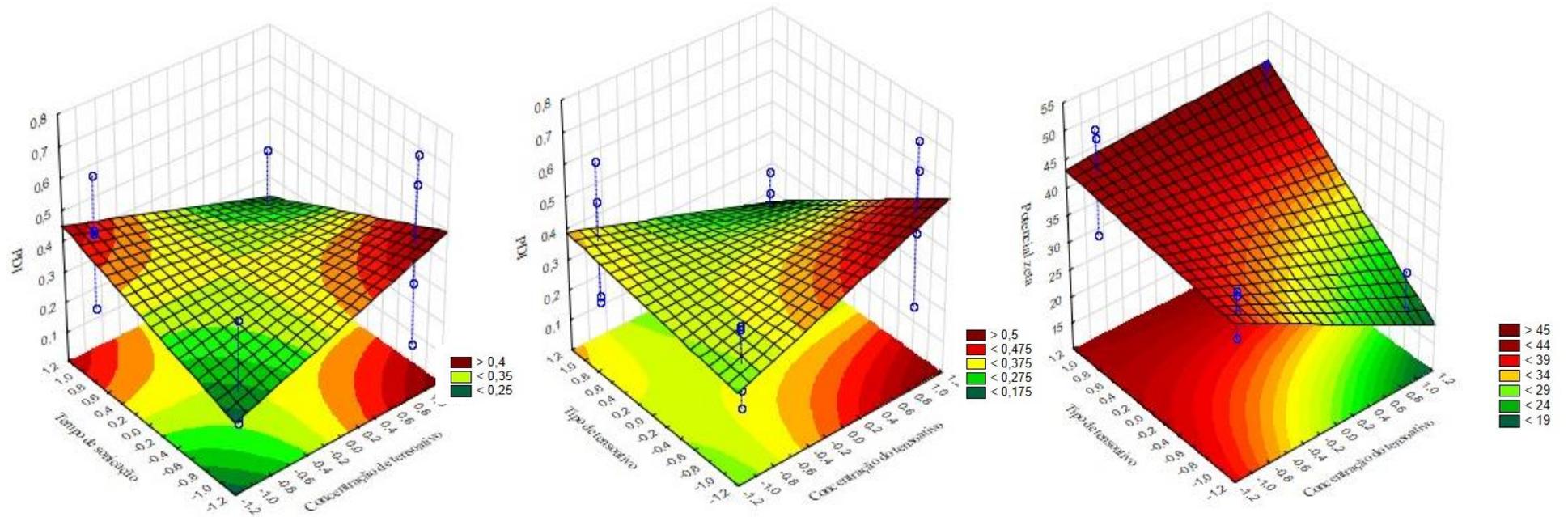
Sendo assim, é possível concluir através do planejamento fatorial fracionado de triagem, que variáveis influenciaram significativamente nas respostas estudadas e ao considerar os dados apresentados anteriormente, foi obtido sistemas ideais, ou seja, menores índice de polidispersão e maior potencial zeta, quando os parâmetros apresentados se encontraram em: maior volume da fase aquosa (2,5mL), menores concentrações de polímero (1,4% m/v), menores concentrações de tensoativo (1% m/v), menor potência de sonicação (40W) e utilizando como tensoativo de escolha o Pluronic F-127.

Figura 37- Gráficos de pareto mostrando a significância das variáveis (A) PDI, (B) tamanho de partícula e (C) potencial zeta



Fonte: Dados da pesquisa

Figura 38- Gráfico de superfície das variáveis para as respostas PDI (A e B) e potencial zeta (C).



Fonte: Dados da pesquisa

5.2.3.3. Planejamento fatorial fracionado de triagem na obtenção de nanopartículas por dupla emulsificação

A técnica de evaporação do solvente é uma das metodologias mais utilizadas para formulação de nanopartículas poliméricas, o método basicamente depende da formação de emulsões seguida de evaporação do solvente orgânico.

A estratégia da emulsão múltipla (A/O/A), um dos exemplos da preparação de emulsões, é de incorporar princípios ativos hidrossolúveis em uma fase aquosa interna da emulsão, aumentando desta forma a eficiência de encapsulação desses compostos. Porém, esses sistemas são termodinamicamente instáveis e a técnica requer uma alta fonte de energia, por isso fatores como tipo e concentração de estabilizador, a tensão de cisalhamento aplicada e a concentração do polímero, podem influenciar tamanhos de partículas da fase dispersa, da mesma forma que o rápido processo de cisalhamento pode influenciar na eficiência de encapsulação (Alenazi *et al.*, 2022).

Sendo assim, a técnica de dupla emulsificação por evaporação do solvente foi escolhida afim de obter NPs com características ótimas para incorporação subsequentes do extrato aquoso de *Morus nigra* L. Com esse objetivo, o planejamento fatorial fracionado de triagem foi aplicado utilizando determinados fatores como: (X_1) porcentagem de tensoativo (m/v %), (X_2) = porcentagem de polímero (m/v %), (X_3) = frequência (W), (X_4) = tempo de sonicação (s), (X_5) = fase aquosa interna (mL), (X_6) = fase dispersante (mL), (X_7) = fase orgânica (mL), (X_8) = fase dispersante final (m/v %) e (X_9) = tipo de tensoativo (PVA ou Pluronic F-127). Os resultados do planejamento para as respostas (PDI, tamanho e potencial zeta) utilizadas como fatores dependentes podem ser analisadas na tabela 28.

Realizou-se análise estatística das variáveis e das interações combinadas, a fim de obter o melhor modelo estatístico. Observa-se na tabela 29 apresentada os dados da ANOVA, juntamente com os valores de p associados para o projeto da formulação por dupla emulsificação. Os valores de PDI ficaram na faixa entre 0,103 a 0,485 e os principais fatores estatisticamente significativos para este parâmetro foram: porcentagem do tensoativo, porcentagem do polímero, tempo de sonicação, fase final dispersa, tipo de tensoativo e as interações entre porcentagem do polímero e frequência, porcentagem de polímero e tempo de sonicação, porcentagem do polímero e fase aquosa interna e a interação por três fatores envolvendo a porcentagem de tensoativo, tipo de polímero e a fase dispersante.

Tabela 29- Projeto de planejamento fatorial fracionado obtido para seleção de fatores na obtenção por dupla emulsificação

Experimentos	Variáveis independentes									Variáveis dependentes		
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	X ₉	Y ₁	Y ₂	Y ₃
1	0,5	4	30	30	1	25	10	100	Pluronic	0,242	296,0	+43,9
2	1,0	4	30	30	2	25	6	120	PVA	0,476	299,0	+38,0
3	0,5	5	30	30	2	10	10	120	PVA	0,371	333,8	+44,3
4	1,0	5	30	30	1	10	10	100	Pluronic	0,201	260,7	+43,3
5	0,5	4	60	30	2	25	6	100	PVA	0,310	335,2	+44,0
6	1,0	4	60	30	1	25	10	100	Pluronic	0,223	250,5	+53,1
7	0,5	5	60	30	1	10	10	120	Pluronic	0,276	215,9	+44,5
8	1,0	5	60	30	2	10	6	100	PVA	0,485	277,1	+47,6
9	0,5	4	30	60	1	25	10	120	PVA	0,456	414,6	+45,6
10	1,0	4	30	60	2	25	6	100	Pluronic	0,254	280,2	+45,9
11	0,5	5	30	60	2	10	10	100	Pluronic	0,103	255,9	+52,6
12	1,0	5	30	60	1	10	6	120	PVA	0,220	277,2	+46,4
13	0,5	4	60	60	1	10	6	120	Pluronic	0,248	198,2	+52,9
14	1,0	4	60	60	1	10	10	100	PVA	0,436	276,2	+50,4
15	0,5	5	60	60	1	25	6	100	PVA	0,235	315,1	+48,6
16	1,0	5	60	60	2	25	10	120	Pluronic	0,262	214,5	+54,9
17	0,75	4,5	45	45	1,5	17,5	8	110	PVA	0,231	328,9	+48,1
18	0,75	4,5	45	45	1,5	17,5	8	110	PF-127	0,238	220,1	+50,1

X₁= porcentagem de tensoativo (m/v %), X₂= porcentagem de polímero (m/v %), X₃= frequência (W), X₄ = tempo de sonicação (s), X₅= fase aquosa interna (mL), X₆= fase dispersante (mL), X₇= fase orgânica (mL), X₈= fase final dispersa (mL), X₉ = tipo de tensoativo, Y₁= PDI, Y₂= tamanho (nm), Y₃= potencial zeta (mV)

Fonte: Dados da pesquisa

Os resultados foram comprovados através do valor de p dos fatores abaixo de 0,05, que é nível de significância estabelecido no modelo. Portanto, aceita-se a hipótese alternativa que pronuncia que os fatores analisados influenciam significativamente na resposta e recusa-se a hipótese nula, onde afirma que não há correlação entre os fatores e variável resposta estudada para os fatores abordados.

Para variável dependente tamanho de partículas, os valores encontrados no planejamento estão na faixa de 198,2 a 414,6 nm. Porém, nenhum fator estudado durante o planejamento influenciou significativamente na variável resposta, observado, por meio dos valores de p serem maiores que o nível de significância de $p < 0,05$.

Já para variável dependente potencial zeta, os valores se encontraram 38 e 54,9 mV. Fatores como: porcentagem do polímero, frequência e sonicação, bem como as interações entre porcentagem do polímero e a fase aquosa interna, influenciaram significativamente na variável resposta. Fatores estes, que apresentaram valor p menor que o nível de significância de 0,05.

Através dos resultados, também é possível concluir que não há falta de ajuste no modelo, para nenhuma resposta estudada, visto que o valor p é maior que nível de significância considerado no modelo ($p < 0,05$) para Lack of Fit. Assim, aceita-se a hipótese nula, em que discorre que não há falta de ajuste no modelo e recusa-se a hipótese alternativa que assume que há falta de ajuste no modelo.

O gráfico de Pareto ordena a frequência das ocorrências da menor para maior, permitindo a priorização dos problemas. Ou seja, o gráfico de Pareto sugere qual a variável significativa dentro das condições avaliadas. Sendo assim, através da figura 38, é possível avaliar quais variáveis ou interações são significativas, bem como que níveis do planejamento para determinado parâmetro é expressivo no estudo.

A variável significativa, com maior influência sob a variável resposta PDI (Figura 39 A) é o tipo de tensoativo utilizado no desenvolvimento da dupla emulsificação. Como objetivo do planejamento é minimizar valores de PDI, visto que, sugere a homogeneidade do sistema e quanto menor o valor obtido, maior o grau de homogeneidade da amostra, deve-se considerar o sinal contrário do gráfico em questão. Sendo assim, a utilização do Pluronic® F-127, foi capaz de diminuir o PDI, quando comparada ao outro tipo de tensoativo utilizado (PVA).

Tabela 30- Resultado da ANOVA modelo quadrático de nanopartículas por dupla emulsificação

Fatores	PDI					Tamanho					Potencial Zeta				
	SS	DF	MS	F	<i>p</i>	SS	DF	MS	F	<i>P</i>	SS	DF	MS	F	<i>p</i>
X₁	0,006	1	0,006	254,735	0,040	2230,20	1	2230,20	0,377	0,650	1,210	1	1,210	9,680	0,198
X₂	0,015	1	0,015	617,510	0,026	1586,03	1	1586,03	0,268	0,696	20,702	1	20,702	165,620	0,049
X₃	0,001	1	0,001	58,939	0,082	8765,64	1	8765,64	1,481	0,438	41,602	1	41,602	332,820	0,035
X₄	0,009	1	0,009	349,235	0,034	365,77	1	365,77	0,062	0,845	50,410	1	50,410	403,280	0,032
X₅	0,003	1	0,003	123,469	0,057	1445,90	1	1445,90	0,244	0,708	12,960	1	12,960	103,680	0,062
X₆	0,002	1	0,002	77,235	0,072	7599,48	1	7599,48	1,284	0,460	10,890	1	10,890	87,120	0,068
X₇	0,004	1	0,004	149,398	0,052	435,77	1	435,77	0,074	0,831	4,202	1	4,202	33,620	0,109
X₈	0,004	1	0,004	180,500	0,047	1103,90	1	1103,90	0,187	0,740	14,823	1	14,823	118,580	0,058
X₉	0,087	1	0,087	3552,041	0,011	22193,55	1	22193,55	3,750	0,303	3,422	1	3,422	27,380	0,120
X₂X₃	0,021	1	0,021	840,500	0,022	1691,27	1	1691,27	0,286	0,687	4,202	1	4,202	33,620	0,109
X₂X₄	0,027	1	0,027	1097,796	0,019	45,23	1	45,23	0,008	0,944	17,640	1	17,640	141,120	0,053
X₂X₅	0,008	1	0,008	326,949	0,035	1955,85	1	1955,85	0,330	0,668	56,250	1	56,250	450,000	0,030
X₁X₆X₉	0,008	1	0,008	310,124	0,036	31,83	1	31,83	0,005	0,953	5,367	1	5,367	42,936	0,096
Lack of Fit	0,002	3	0,001	22,425	0,154	1460,20	3	486,73	0,082	0,960	33,322	3	11,107	88,860	0,078
Pure Error	0,000	1	0,000			5918,72	1	5918,72			0,125	1	0,125		
Total SS	0,196	17				56829,32	17				277,129	17			

X₁= porcentagem de tensoativo (m/v %), X₂= porcentagem de polímero (m/v %), X₃= frequência (W), X₄ = tempo de sonicação (s), X₅= fase aquosa interna (mL), X₆= fase dispersante (mL), X₇= fase orgânica (mL), X₈= fase final dispersa (mL), X₉ = tipo de tensoativo, SS = soma dos quadrados, DF= graus de liberdade, MS= quadrado médio.

Fonte: Dados da pesquisa

Da mesma forma, é possível compreender que maiores concentrações de polímero, bem como maior tempo de sonicação, conseguem diminuir significativamente o índice de polidispersão. Por isso, a utilização do maior nível para os fatores estudados deve ser acatada.

Já a concentração do tensoativo e a fase final dispersa, níveis mais altos dessas variáveis são capazes de obter menores valores de PDI. Ao considerar as interações, a interação entre concentração do polímero e tempo de sonicação, influenciam positivamente na variável resposta PDI, de tal modo que, para a interação ser positiva, é necessário que os dois fatores sejam positivos ou que os dois fatores sejam negativos, mas devido ao fato dos dois parâmetros influenciarem positivamente isoladamente, sua interação favorece para que níveis mais altos de ambas respostas influenciem para diminuição do PDI. Já a interação entre porcentagem de polímero e frequência obtém influência negativa na resposta, ou seja, o maior nível da concentração do polímero e o menor nível utilizado na frequência de sonicação, são capazes de diminuir o PDI. Da mesma forma ocorre para interação entre a porcentagem do polímero e a fase aquosa interna, então, o maior nível da concentração do polímero e menores quantidades de fase aquosa interna, são capazes de minimizar o PDI.

Já na figura 39 (B) é possível advertir, que todos os fatores isolados e com interação, não afetaram significativamente na variável resposta tamanho, como é possível comprovar através da linha rejeição da hipótese nula, em que todas as barras estão à esquerda da linha.

Enquanto que na figura 39 (C), o tempo de sonicação, concentração do polímero e a frequência utilizada influenciam de forma positiva na variável resposta potencial zeta, portanto, níveis mais altos utilizados na obtenção de nanopartículas por dupla emulsificação de acordo com o planejamento, são capazes de maximizar o potencial zeta.

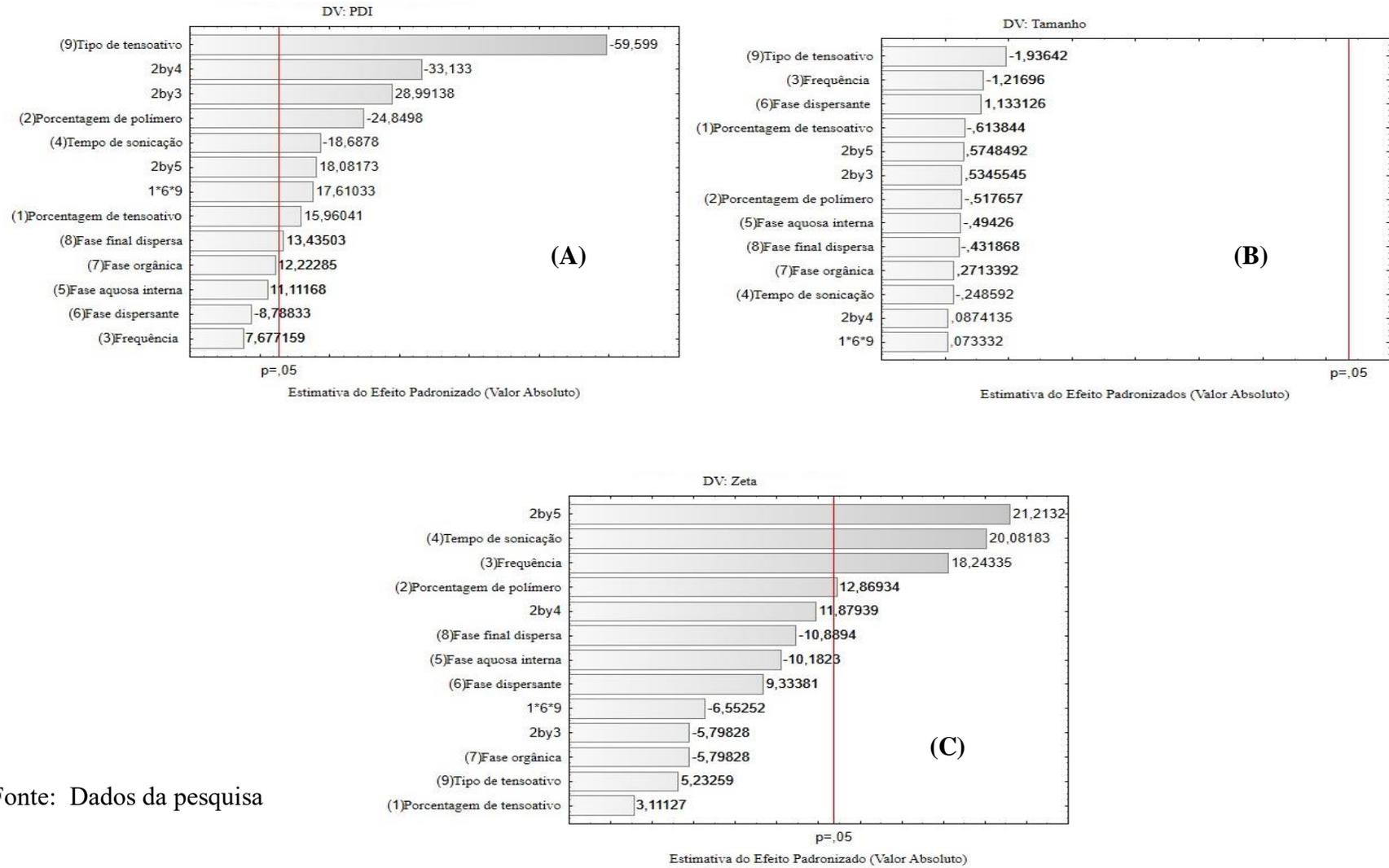
Ao estudar a influência das interações sob a respostas, através do gráfico de superfície visto na Figura 40 (A), observou-se que para a resposta do PDI a interação significativa entre a concentração do polímero e a frequência, a fim de obter menores valores de PDI abaixo de 0,22, podem ser adquiridos, quando se diminui a frequência e utiliza maiores concentrações de polímero.

Já na figura 40 B, é possível advertir que à medida que se aumenta a concentração do polímero e maior tempo de sonicação é possível obter valores de PDI abaixo de 0,21. Enquanto que para interação da resposta da Figura 40 (C), maiores concentrações do

polímero e maiores volumes da fase aquosa interna é possível obter maiores valores de potencial zeta.

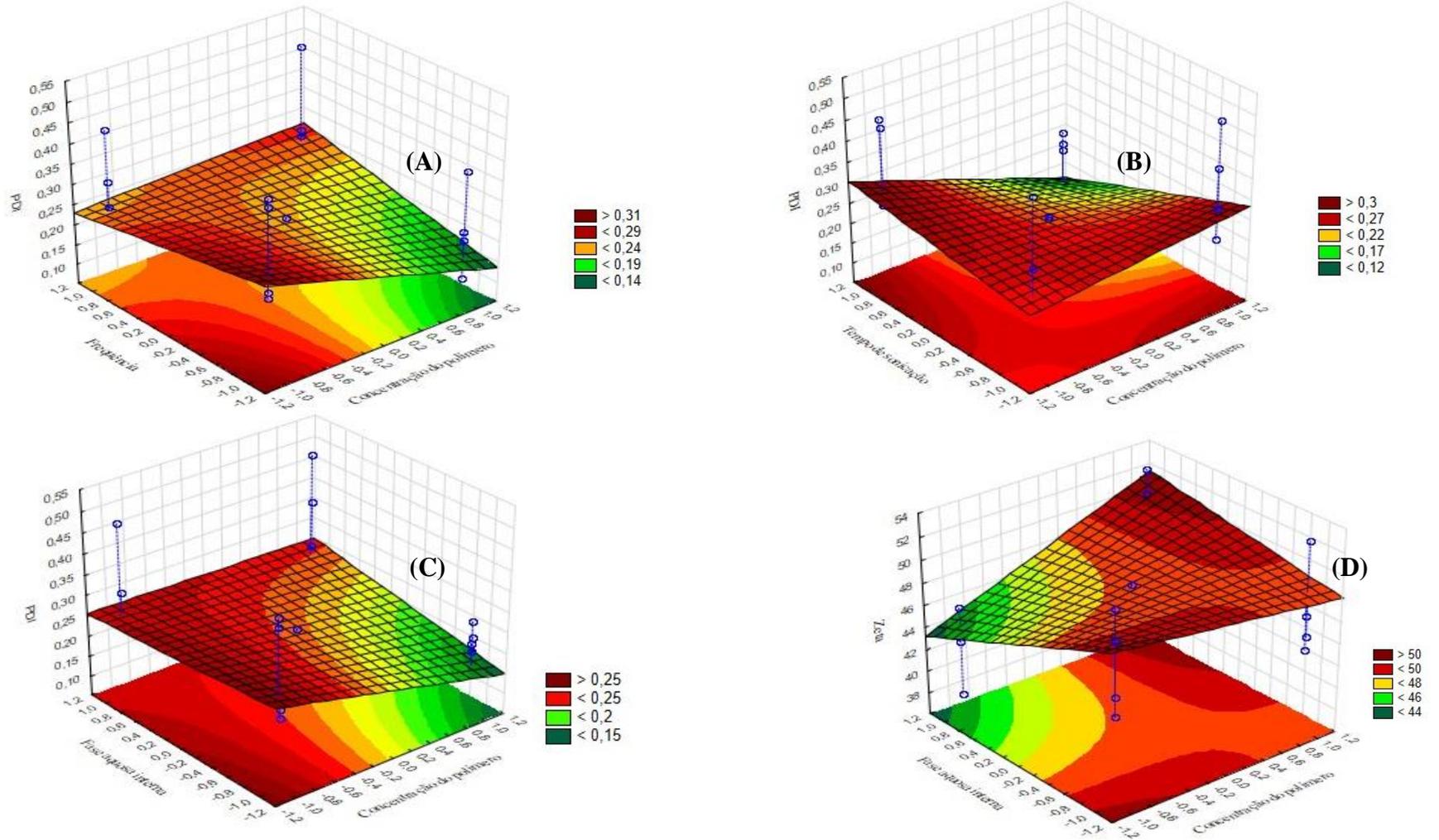
Sendo assim, é possível concluir através do planejamento fatorial fracionado de triagem, que variáveis influenciaram significativamente nas respostas estudadas e ao considerar os dados apresentados anteriormente, foi obtido sistemas ideais, ou seja, menores índice de polidispersão e maior potencial zeta, quando os parâmetros apresentados se encontraram nos níveis de: maior concentração de tensoativo (1 % m/v), maior concentração de polímero (5 % m/v), maior frequência (60W) , nível mais alto de tempo de sonicação (90s), maior nível de fase aquosa interna (2 mL), menor nível da fase dispersa final (100mL), utilizando como tensoativo de escolha o Pluronic F-127.

Figura 39- Gráficos de pareto dupla emulsificação triagem (A) PDI, (B) tamanho de partícula e (C) potencial zeta



Fonte: Dados da pesquisa

Figura 40- Gráfico de superfície das variáveis de triagem por dupla emulsificação para PDI (A, B e C) e Potencial Zeta (D)



5.2.3.4 OTIMIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS COM EXTRATO DE *Morus nigra* L.

5.2.3.4.1 Estudo de compatibilidade

A análise térmica (TG) e espectroscópicas (FTIR) são ferramentas comuns e poderosas para estudar a compatibilidade. Elas permitem a detecção de mudanças físicas e químicas nos materiais, como fusões, degradações, transições de fase e interações moleculares. Essas análises são fundamentais para uma melhor compreensão da compatibilidade dos componentes e para orientar o desenvolvimento de formulações mais estáveis, eficazes e seguras de NPs como sistemas de liberação de medicamentos, pois as incompatibilidades podem ocorrer quando há reações químicas entre o ativo e os excipientes, o que pode levar a mudanças indesejáveis na estabilidade, biodisponibilidade e eficácia do medicamento, bem como a possíveis efeitos tóxicos no organismo. (Pires *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2020).

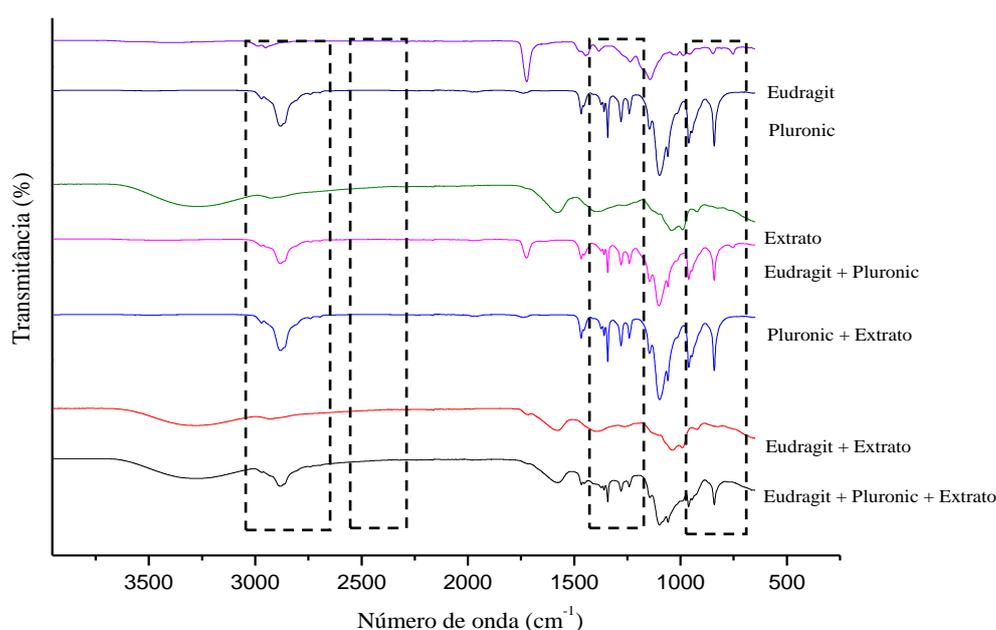
5.2.3.4.1.1 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier – FTIR

A técnica espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) é amplamente utilizada para a análise de misturas de componentes e avaliação de interações químicas entre eles. Essa técnica é uma ferramenta poderosa para identificar compostos e investigar suas estruturas moleculares. No FTIR, um feixe de luz infravermelha é passado através de uma amostra e a quantidade de luz absorvida em diferentes comprimentos de onda é medida. Cada composto tem sua própria "impressão digital" de absorção de energia em função dos comprimentos de onda, resultando em um espectro característico para cada substância. Quando as misturas de componentes estão presentes, é possível observar interações químicas entre eles. Essas interações podem resultar em mudanças significativas na forma e posição das bandas dos espectros. (Chadha; Bhandari, 2014; Kaur; Thakur; Goswami, 2023)

Na figura 41 estão representados os espectros de FTIR dos componentes da formulação e suas misturas binárias e ternárias. Para o espectro do Eudragit® RL-100, as bandas fortes foram facilmente reconhecidas nas regiões das bandas de absorção em 1717 cm^{-1} e 3436 cm^{-1} atribuída à vibração do grupo carbonila (C=O) e grupos OH associados respectivamente, que pode estar relacionada aos grupos éster no Eudragit® RL 100. Em 1141 cm^{-1} e 1243 cm^{-1} deve-se à vibração de estiramento da carbonila dos grupos éster do polímero. Em 2981 cm^{-1} essa banda é geralmente associada às vibrações dos grupos -

CH₃ simétricos (metil) no polímero. Em 1389 cm⁻¹ essa banda pode estar relacionada a vibrações de grupos metileno (-CH₂-). (Gandhi; Jana; Sen, 2014; Katata-Seru *et al.*, 2020). Já no espectro FTIR do PF-127 exibiu picos de absorção característicos em 2872 cm⁻¹ (CH), 1100 cm⁻¹ vibrações de alongamento C-O-C e 1337 cm⁻¹ (dobra no plano OH), em 1460 cm⁻¹ são de vibração de flexão do grupo CH₂ e as bandas em 1344 e 1284 cm⁻¹ estão relacionadas às deformações angulares deste mesmo grupo e são consideradas assinaturas de PF127 (Hardiansyah *et al.*, 2022; Karolewicz *et al.*, 2014).

Figura 41- Espectro de infravermelho das substâncias isoladas, misturas ternárias e mistura total.



Fonte: Dados da pesquisa

Para o extrato seco obtido a partir da infusão das folhas de *Morus nigra* L. o espectro obteve banda larga e intensa em 3280 cm⁻¹ geralmente associada a vibrações de grupos -OH (hidroxilas), o que pode indicar a presença de compostos polares, como açúcares ou polifenóis. Em 2926 cm⁻¹ banda pode estar associada a vibrações dos grupos -CH₂ e -CH₃ de lipídios ou outros compostos alifáticos presentes nas folhas. Em 1300 e 1000 cm⁻¹ mostraram vibrações de estiramento do anel de piranose e em 1043 cm⁻¹ pode estar relacionada a vibrações de grupos C-O e C-O-C presentes em açúcares e outros compostos polares. A absorção em 926 cm⁻¹ foi atribuída aos modos C-C, alongamento

CO e COH, modos de deformação C-O-C dos modos oligo e polissacarídeos. (Adiana; Mazura, 2011; Hu *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2003; Walkowiak-Bródka *et al.*, 2022).

Em todas as misturas não foi observado deslocamentos bruscos de bandas de absorção, nem surgimento de novas bandas. Na mistura binária entre Pluronic F-127 e Eudragit® RL 100, por exemplo, a banda de absorção de 1460 cm^{-1} está presente tanto no Pluronic F-127 isolado quanto na mistura binária. Isso sugere que essa banda não é afetada pela presença do Eudragit® RL100 e, portanto, não indica uma interação significativa entre os componentes. Da mesma forma entre as misturas do Eudragit®RL100 e extrato seco as bandas características mencionadas anteriormente dos componentes isolados foram admitidas a partir de suas misturas (3286 cm^{-1} , 2920 cm^{-1} , 1576 cm^{-1} , 1392 cm^{-1} , 1256 cm^{-1} , 1039 cm^{-1} , 984 cm^{-1} e 917 cm^{-1}). Na mistura ternária, foi possível identificar as principais bandas dos três componentes, uma banda larga em 3280 cm^{-1} característica do grupamento hidroxila (OH) proveniente de grupamentos de compostos polares esperado proveniente do extrato, em 2968 cm^{-1} geralmente associada às vibrações dos grupos $-\text{CH}_3$ simétricos em menor intensidade devido a menor proporção dos componentes de Eudragit® RL100 e PF-127, já em 1344 e 1280 cm^{-1} deformações angulares do grupo CH_2 característica do PF-127 foram identificadas.

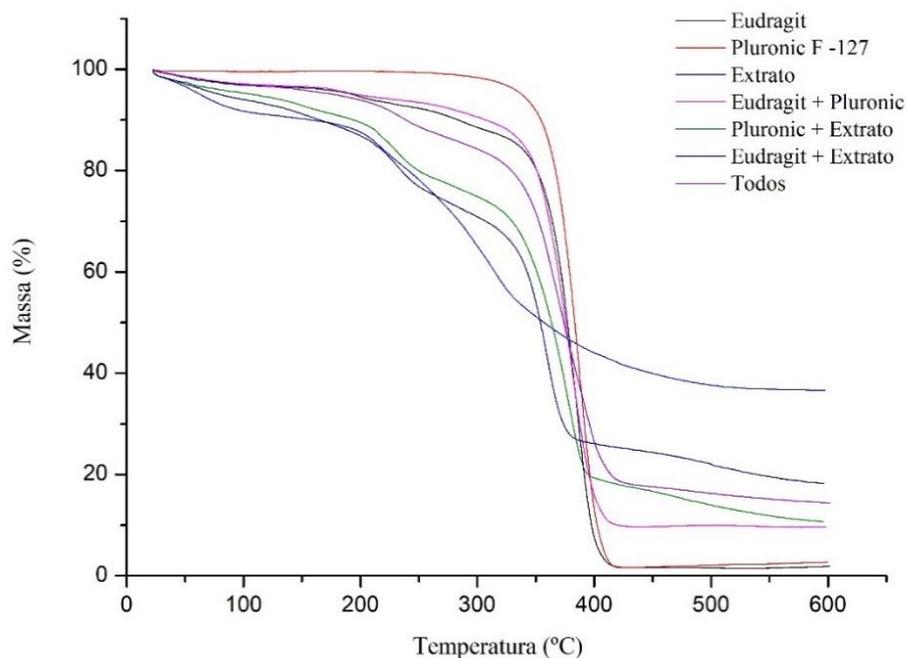
5.2.3.4.1.2. Análise termogravimétrica (TG)

Neste estudo, as análises termogravimétricas (TG) foram empregadas para investigar as variações nas perdas de massa durante eventos térmicos dos compostos isolados, bem como em comparação com as misturas físicas binárias e misturas totais. Essas misturas totais incluíram todos os componentes usados para a obtenção das NPs em estudo apresentado na figura 42. A utilização de misturas físicas binárias (compostas pelo extrato e um único polímero) e misturas totais (com todos os componentes presentes na formulação das nanopartículas) permite a análise das interações específicas entre cada componente e a identificação de possíveis efeitos sinérgicos ou antagonistas entre os compostos (Iqbal *et al.*, 2013; Pires *et al.*, 2017).

Como é possível observar nas curvas TG dos compostos isolados, os polímeros apresentaram-se com um evento principal de decomposição, onde o Eudragit RL 100 e Pluronic F-127, apresentaram-se com perdas graduais de massa à medida que os grupos poliméricos se quebram e são liberados na forma de gases voláteis de 90,4% entre $257\text{--}420^\circ\text{C}$ e 97,75% entre $300\text{--}430^\circ\text{C}$ respectivamente (Abbas *et al.*, 2023; Nguyen *et al.*,

2019). Já o extrato, demonstrou o primeiro evento térmico até 100°C ($\Delta=8,02\%$) e segundo evento de decomposição a partir de 115-170°C ($\Delta=7,6\%$) e terceiro evento em 176-330°C com perda de 83,01%. Em todos foi possível verificar a decomposição quase completa das amostras (>90%).

Figura 42- Curvas de Tg das substâncias isoladas, misturas binárias e ternárias



Fonte: Dados da pesquisa

Já em relação a misturas, mostra-se uma decomposição que se iniciou em 285°C para a mistura binária entre o Eudragit RL 100 e Pluronic F-127 com perda de massa de 98%, observa-se também que não houve uma decomposição completa da mistura assim como nos isolados. Enquanto que para mistura binária do Eudragit RL 100 e extrato, a primeira etapa de decomposição se iniciou em 176°C-306°C com perda de massa de 18% e o segundo entre 315-482°C com perda de massa de 55%. O último evento está na faixa esperada para decomposição do polímero e do polímero, isso indica que a decomposição do polímero está ocorrendo na mesma temperatura em que ocorreria se o polímero estivesse isolado.

Já na mistura entre Pluronic F-127 e o extrato, o primeiro evento de decomposição se iniciou em 170°C até 294°C, com perda de massa de 15%, característica da decomposição do extrato isolado. Já o segundo evento se iniciou em 294°C-467°C com perda de 59%, isso pode indicar que a mistura binária está preservando a estabilidade

térmica do polímero, e não há interações significativas entre o extrato e o polímero que afetem a sua temperatura de decomposição.

Quanto as misturas dos polímeros com o extrato, as três etapas de decomposição característica da decomposição do extrato foram mantidas nas misturas, podendo indicar que as misturas não causaram alterações significativas nas etapas de decomposição do extrato. Com o primeiro evento de decomposição em 165-293°C com perda de 8% e o segundo em 302- 497°C com 72% de perda de massa, com um ganho maior na massa nessa faixa de temperatura devido as características de decomposição dos polímeros nessa faixa. Para ambas misturas com o extrato houve uma primeira decomposição antes dos 170°C, ou seja, há uma certa proteção fornecida pelo pluronic à matéria prima do extrato.

5.2.3.4.2 Planejamento Box- Behnken

Na nanotecnologia farmacêutica é frequentemente aplicado planejamentos estatísticos para entender quais fatores relativos ao processo e à formulação afetam o desenvolvimento de um dado nanossistema. Na literatura, por exemplo, são encontrados diversos estudos destinados à otimização de NPs (de Oliveira *et al.*, 2021; Goswami *et al.*, 2022; Khan *et al.*, 2023a; Shaikh; Kala; Nivsarkar, 2017).

Esses problemas podem ser resolvidos usando a metodologia de superfície de resposta (RSM) e podem ser otimizados em muitas formulações de liberação de fármacos. O RSM pode analisar múltiplas variáveis simultaneamente quando as interações de fatores são complexas. O tipo de RSM mais comumente usados para analisar formulações é o projeto Box-Behnken. Requer menos execuções e menos tempo para três variáveis independentes do que outros designs, como o design composto central. (Battaglia; Gallarate, 2012; Kraisit *et al.*, 2017; Rahman; Zidan; Khan, 2010; Sood; Jain; Gowthamarajan, 2014)

Além disso, fornece informações sobre os principais efeitos e as interações entre variáveis independentes com base nas características da formulação e minimizam combinações de números de fatores, nas quais os efeitos sobre a resposta podem ser comparados. Sendo assim, o planejamento experimental Box-Behnken foi proposto para otimização das NPs utilizando as duas metodologias propostas de obtenção (nanoprecipitação e dupla emulsificação) desenvolvidas baseada nos resultados do planejamento de triagem. Essa caracterização foi determinada utilizando parâmetros fixos no desenvolvimento das nanopartículas, com o objetivo de obter um sistema branco que

estivesse dentro dos padrões desejáveis, ou seja, tamanhos de partícula inferior a 300 nm, PDI inferior a 0,3 e potencial zeta acima de +30 mV (Khan *et al.*, 2023b; Kraisit, 2019; Kraisit; Sarisuta, 2018).

5.2.3.4.2.1 Otimização e análise estatística de Box Behnken Design pelo método de nanoprecipitação

Para incorporação do extrato de *Morus nigra* L., foi realizado um planejamento experimental do tipo Box-Behnken com três variáveis independentes (concentração do polímero, concentração do tensoativo e proporção polímero/extrato) e três níveis para cada variável: baixo, médio e alto. Utilizado para otimizar e estudar as interações e efeitos, empregando como resposta o tamanho, potencial zeta e eficiência de encapsulação das nanopartículas. Os resultados do planejamento são demonstrados através da figura 43 e tabela 31.

Figura 43- Nanopartículas obtidas pela nanoprecipitação a partir do planejamento Box-Behnken

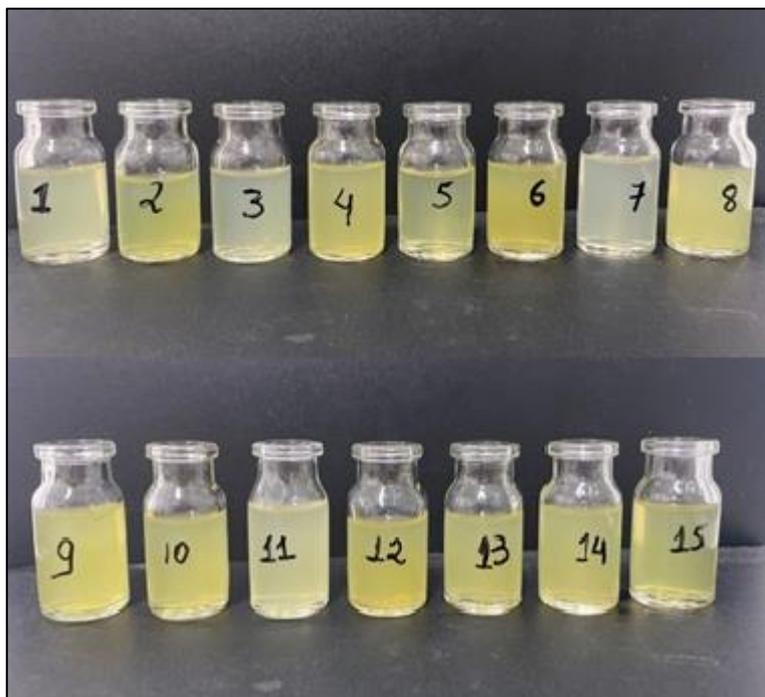


Tabela 31- Matriz de planejamento Box-Behnken e respostas das nanopartículas por nanoprecipitação.

Experimentos	Variáveis independentes			Variáveis dependentes			
	X ₁	X ₂	X ₃	Y ₁	Y ₂	Y ₃	Y ₄
1	0,7	0,5	10:1	0,218	235,5	+21,1	54,75
2	2,1	0,5	10:1	0,302	178,2	+51,1	65,79
3	0,7	1,5	10:1	0,121	261,0	+39,2	24,29
4	2,1	1,5	7:1	0,308	221,3	+49,4	36,54
5	0,7	1,0	7:1	0,161	246,8	+30,1	62,73
6	2,1	1,0	13:1	0,352	288,0	+47,7	22,14
7	0,7	1,0	13:1	0,045	274,2	+41,4	89,39
8	2,1	1,0	7:1	0,205	257,9	+47,8	41,34
9	1,4	0,5	7:1	0,326	210,5	+14,6	88,51
10	1,4	1,5	7:1	0,290	227,6	+30,3	44,31
11	1,4	0,5	13:1	0,370	202,8	+20,2	71,75
12	1,4	1,5	13:1	0,254	255,5	+19,2	41,98
13	1,4	1,0	10:1	0,256	232,5	+28,2	50,21
14	1,4	1,0	10:1	0,217	250,8	+44,8	27,60
15	1,4	1,0	10:1	0,360	199,0	+42,3	19,13

X₁= concentração do polímero (m/v %), X₂= concentração do tensoativo (m/v %), X₃= proporção polímero e extrato (m/m); Y₁= PDI, Y₂= tamanho (nm), Y₃= potencial zeta (mV); Y₄=Eficiência de encapsulação

Fonte: Dados da pesquisa

Na tabela 32, é apresentado os dados obtidos na ANOVA. Se o modelo estiver bem ajustado, a falta de ajuste terá a mesma intensidade dos erros aleatórios. Ou seja, para um modelo aceitável, a falta de ajuste não será significativo ($p > 0,05$). Sendo assim, através dos resultados, é possível identificar que o modelo utilizado na análise, a fim de otimizar as condições ideias das nanopartículas incorporada com extrato utilizando o método de nanoprecipitação, não possui falta de ajuste, visto que, o valor de p é maior que o nível de significância considerado no modelo ($p < 0,05$). Por isso, aceita-se a hipótese nula, em que discorre que não há falta de ajuste no modelo e recusa-se a hipótese alternativa, que assume que há falta de ajuste no modelo para todas as respostas estudadas.

Neste trabalho, a única variável significativa obtendo como resposta o PDI foi a concentração de polímero utilizada no planejamento. A partir do gráfico de pareto na figura 44 (A) é possível observar, de que forma esse parâmetro influenciou na resposta, sendo assim, como o objetivo do experimento, é diminuir o índice de polidispersão, favorecendo sua homogeneidade, o menor nível da concentração do polímero favorece para este objetivo, ou seja, a utilização de menores quantidades de polímero de acordo com os parâmetros estabelecidos para produção de nanopartículas por nanoprecipitação, é preconizado.

Portanto, esses resultados demonstram que a proporção utilizada para produção das nanopartículas foi capaz de ser suficiente para atingir a concentração crítica de nucleação. Por outro lado, o aumento do PDI com o aumento da concentração é ocasionado, visto que o excesso de soluto no sistema leva a grandes precipitações, devido à taxa de crescimento prolongada, promovendo dessa forma a instabilidade da formulação (Torres-Flores; Nazende; Emre, 2019).

Enquanto que para resposta do tamanho (Figura 44 B), nenhuma variável estudada foi considerada significativa, da mesma forma para a variável dependente eficiência de encapsulação (Figura 44 D). Já para variável dependente potencial zeta (Figura 44 C) a concentração do polímero de forma linear e quadrática e do tensoativo de forma quadrática foram estatisticamente significativos. Os termos quadráticos não são analisados como um aumento ou diminuição da variável resposta, devido ao fato de os resultados das mudanças dos efeitos dentro da variável serem responsáveis pela curvatura na superfície de resposta.

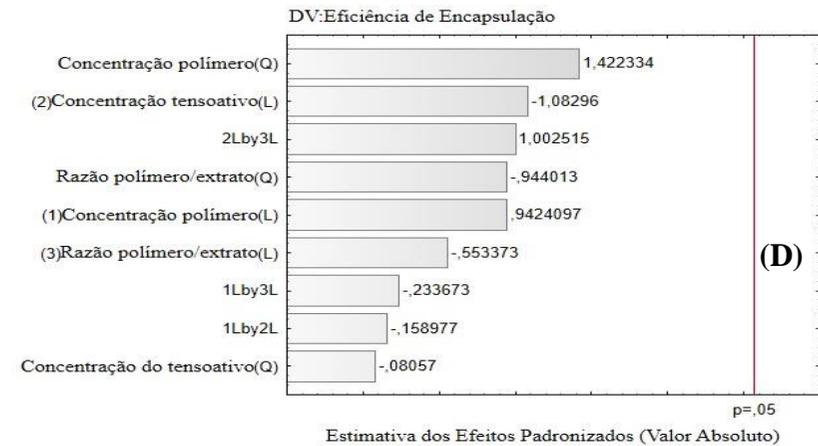
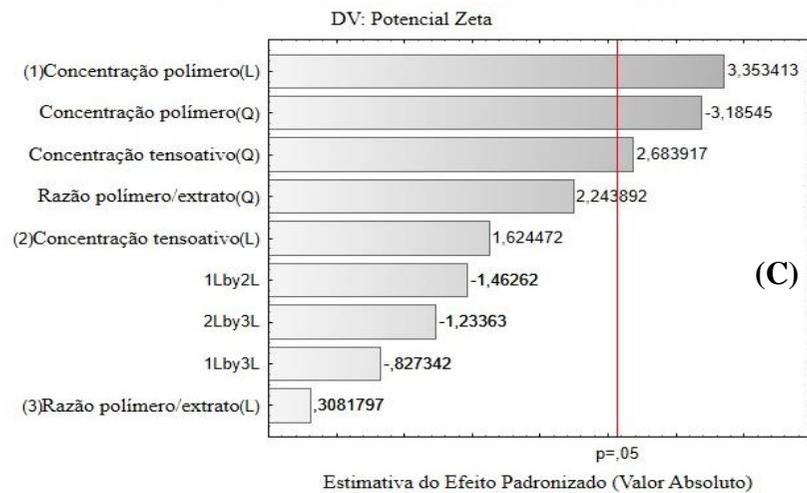
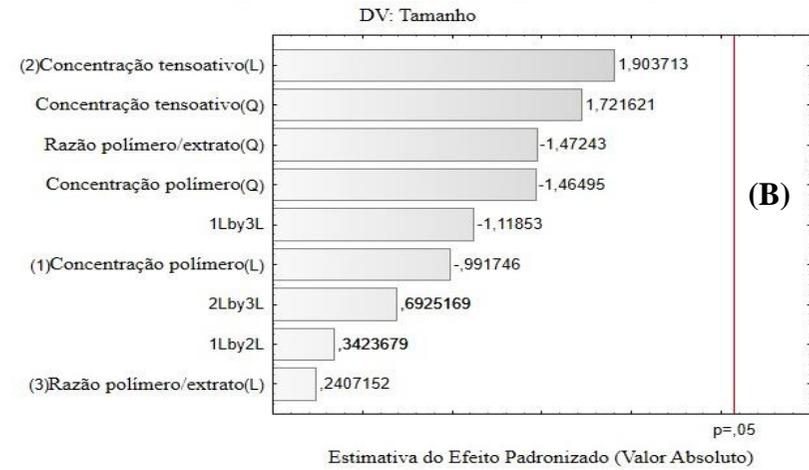
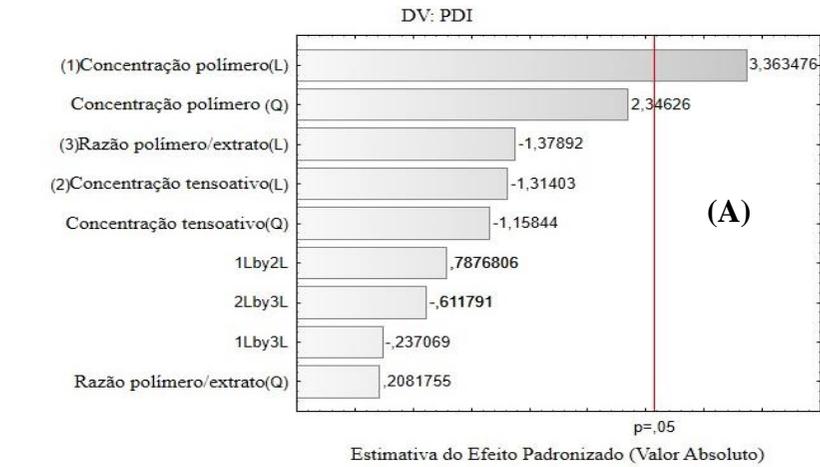
Tabela 32- Resultado da ANOVA de nanopartículas por nanoprecipitação modelo Box-Benhken

Fatores	PDI					Tamanho					Potencial Zeta					Eficiência				
	DF	SS	MS	F	<i>p</i>	DF	SS	MS	F	<i>p</i>	DF	SS	MS	F	<i>p</i>	DF	SS	MS	<i>F</i>	<i>p</i>
X₁	1	0,04	0,04	11,31	0,02	1	649,8	649,80	0,98	0,367	1	515,21	515,205	11,25	0,020	1	678,78	678,78	0,89	0,389
X₂	1	0,00	0,00	1,73	0,24	1	2394,3	2394,32	3,62	0,115	1	120,90	120,901	2,64	0,165	1	896,34	896,34	1,17	0,328
X₃	1	0,00	0,00	1,90	0,22	1	38,3	38,28	0,06	0,819	1	4,35	4,351	0,09	0,770	1	234,04	234,04	0,31	0,604
X₁*X₁	1	0,02	0,02	5,50	0,06	1	1417,8	1417,83	2,15	0,203	1	464,89	464,888	10,15	0,024	1	1546,15	1546,15	2,02	0,214
X₂*X₂	1	0,00	0,00	1,34	0,29	1	1958,2	1958,19	2,96	0,146	1	330,02	330,023	7,20	0,044	1	4,96	4,96	0,01	0,939
X₃*X₃	1	0,00	0,00	0,04	0,84	1	1432,3	1432,34	2,17	0,201	1	230,68	230,680	5,04	0,075	1	681,09	681,09	0,89	0,389
X₁*X₂	1	0,00	0,00	0,62	0,46	1	77,4	77,44	0,12	0,746	1	98,01	98,010	2,14	0,203	1	19,32	19,32	0,03	0,880
X₁*X₃	1	0,00	0,00	0,06	0,82	1	826,6	826,56	1,25	0,314	1	31,36	31,360	0,68	0,446	1	41,73	41,73	0,05	0,825
X₂*X₃	1	0,00	0,00	0,37	0,56	1	316,8	316,84	0,48	0,519	1	69,72	69,723	1,52	0,272	1	768,12	768,12	1,01	0,362
Erro	5	0,02	0,00			5	3303,3	660,66			5	229,07	45,815			0	3821,36	764,27		
Lack of Fit	3	0,01	0,00	0,64	0,658	3	1923,2	641,06	0,93	0,556	3	68,87	22,95	0,29	0,835	3	1927,37	642,4	0,68	0,642
Pure Error	2	0,01	0,005			2	1380,1	690,06			2	160,21	80,10			2	1893,9	946,9	*	*
Total SS	14	0,12				14	12745,1				14	2169,6				14	8869,1			

.X₁= concentração do polímero (m/v %), X₂= concentração do tensoativo (m/v %), X₃= proporção polímero e extrato (m/v). SS = soma dos quadrados, DF= graus de liberdade MS=quadrado médio

Fonte: dados da pesquisa

Figura 44- Gráfico de Pareto planejamento Box-Behnken de nanopartículas por nanoprecipitação



Portanto, devido ao fato de a concentração do polímero apresentar uma forte influência positiva linear, maiores concentrações do polímero, promovem o aumento do potencial zeta, fato este esperado, pois o polímero utilizado (Eudragit® RL100) para a preparação das nanopartículas apresentar-se catiônico. A presença de grupos amônios quaternários na sua estrutura, é responsável por sua carga positiva, como consequência, o aumento da quantidade dentro da formulação, apresentam uma carga superficial fortemente positivo.

Enquanto que a concentração do tensoativo, apresentou uma forte influência quadrática positiva sobre a resposta potencial zeta, significando que as concentrações medianas proporcionam maior aumento no potencial zeta, do que as condições extremas, principalmente as concentrações que tendem a ser menores. Este fato também pode ser explicado, pois surfactantes são adicionados na formulação para estabilizar nanopartículas e evitar aglomerações. A área de superfície crescente gerada por nanopartículas é coberta parcialmente ou completamente por surfactante, isso evita que as nanopartículas se coalesçam, pois são agentes ativos que adsorvem nas interfaces e estabilizam.

No entanto, o surfactante utilizado neste trabalho (Pluronic F-127) é do tipo não iônico, funcionando por impedimento estérico, portanto, são cadeias poliméricas dissolvidos em água que atuam como “molas” empurrando outras gotículas e impedindo-as de coalescer. O papel do estabilizador Pluronic no entanto, é dar estabilidade estérica as NPs, tornando o sistema coloidal menos sensível ao variação da concentração de eletrólitos no meio, portanto o aumento do potencial zeta, devido sua maior concentração, indica mais estabilidade, pois partículas carregadas se repelem, superando a tendencia natural das formulações em formar agregados.

Desta forma, a partir dos dados apresentados. o estudo de pré-formulação foram fixados as concentrações e parâmetros ideias para o desenvolvimento dessas nanopartículas. Uma vez, que as variáveis são transformadas em funções de conveniência são combinadas em uma única função desejabilidade, essa técnica consiste em encontrar os valores dos fatores que otimizem uma ou mais respostas, ou no mínimo as mantenham em faixas desejáveis. Inicialmente, essa função converte cada resposta y_i em uma função individual de desejabilidade d_i que varia de $0 \leq d_i \leq 1$. Através desse método, obtivemos como condições os seguintes parâmetros: concentração do polímero (2,1%), concentração

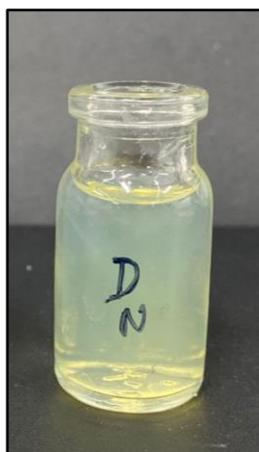
do tensoativo (0,69% m/v) e razão entre a quantidade de polímero/extrato (12:1 m/v) que obteve como resultado da otimização, demonstrados através da tabela 33 e figura 45.

Tabela 33- Resultados da otimização do planejamento Box-Benhken por nanoprecipitação

	Índice de polidispersão	Tamanho (nm)	Potencial zeta (mV)	Eficiência de encapsulação (%)	Desejabilidade composta
Desejabilidade	$0,194 \pm 0,152$	$145,66 \pm 0,04$	$38,4 \pm 0,01$	$59,3 \pm 0,20$	0,539

Fonte: Dados da pesquisa

Figura 45- Nanopartícula obtida pela função de desejabilidade a partir do planejamento Box-Benhken por nanoprecipitação



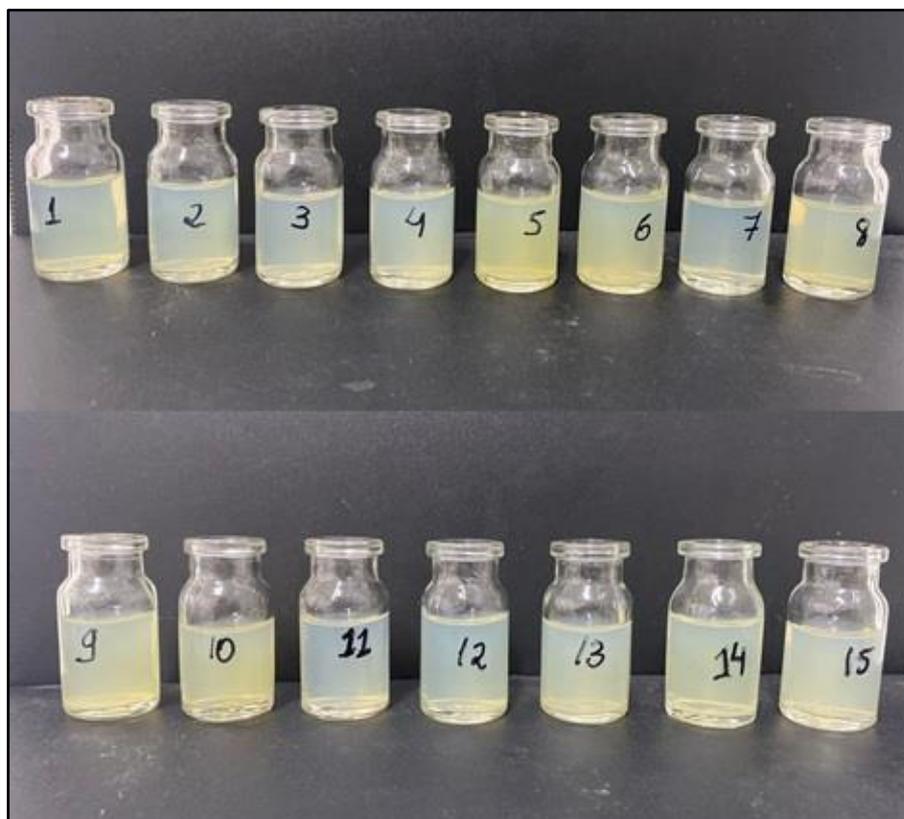
Fonte: Dados da pesquisa

Porém, os resultados esperados a fim de maximizar as respostas através da função de desejabilidade não foram eficazes, principalmente devido ao baixo teor de encapsulação dos compostos fenólicos. Nesse caso, os valores indicaram que algumas das respostas estão abaixo do desejável, enquanto outras estão acima do desejável. Os dados podem ser justificáveis devido a desejabilidade composta obter um valor de 0,5 ou seja, distante de 1, que é mais desejável para uma combinação de valores das variáveis de entrada. Isso significa que a combinação das variáveis de entrada é moderadamente desejável, sendo assim, considerando os dados apresentados anteriormente e os resultados obtidos a partir do planejamento experimental, a amostra que mais se enquadra para maximização dos resultados é o experimento 7, onde a concentração do polímero foi de 0,7% (m/v), concentração de tensoativo 1% (m/v) e proporção polímero/extrato de 13:1.

5.2.3.4.2.2 Otimização e análise estatística de Box Behnken Design pelo método de dupla emulsificação.

No intuito de incorporar o extrato de *Morus nigra* L. em outro tipo de metodologia de obtenção das nanopartículas, foi realizado o planejamento experimental do tipo Box-Behnken com três variáveis independentes (concentração do polímero, concentração do tensoativo e proporção polímero/extrato) e três níveis para cada variável: baixo, médio e alto, utilizando a dupla emulsificação seguido da evaporação do solvente. Utilizado para otimizar e estudar as interações e efeitos, empregando como resposta o tamanho, potencial zeta e eficiência de encapsulação das nanopartículas. Os resultados do planejamento são demonstrados através da tabela 34 e figura 46.

Figura 46- Nanopartículas obtidas por dupla emulsificação a partir do planejamento Box-Behnken



Fonte: Dados da pesquisa

Tabela 34- Matriz de planejamento Box-Behnken e respostas das nanopartículas por dupla emulsificação

Experimentos	Variáveis independentes			Variáveis dependentes			
	X ₁	X ₂	X ₃	Y ₁	Y ₂	Y ₃	Y ₄
1	4,5	0,25	15:1	0,356	288,6	+46,6	90,28
2	5,5	0,25	15:1	0,175	177,8	+50,4	94,2
3	4,5	0,75	15:1	0,228	223,5	+51,1	92,1
4	5,5	0,5	15:1	0,219	203,2	+51,5	86,78
5	4,5	0,5	10:1	0,174	234,4	+47,0	86,73
6	5,5	0,5	10:1	0,365	327,6	+46,6	92,66
7	4,5	0,5	20:1	0,311	243,2	+53,6	95,90
8	5,5	0,5	20:1	0,266	275,4	+47,2	84,48
9	5,0	0,25	10:1	0,444	418,7	+49,2	98,26
10	5,0	0,75	10:1	0,202	252,6	+46,0	99,7
11	5,0	0,25	20:1	0,264	228,9	+46,0	97,84
12	5,0	0,75	20:1	0,226	223,9	+51,1	98,33
13	5,0	0,5	15:1	0,166	234,4	+42,2	98,93
14	5,0	0,5	15:1	0,181	223,5	+49,3	98,50
15	5,0	0,5	15:1	0,168	243,5	+47,8	98,77

X₁= concentração do polímero (m/v %), X₂= concentração do tensoativo (m/v %), X₃= proporção polímero e extrato (m/m); Y₁= PDI, Y₂= tamanho (nm), Y₃= potencial zeta (mV); Y₄=Eficiência de encapsulação

Os resultados da ANOVA, a partir da tabela 35, permitem determinar se existe uma diferença estatisticamente significativa entre as médias das variáveis estudadas. ANOVA fornece o valor de F e o valor de p, que é a probabilidade de que a diferença observada entre as médias das variáveis seja devida apenas ao acaso. Sendo assim, valor de p baixo ($<0,05$) indica que a diferença é estatisticamente significativa, já um valor de p alto ($>0,05$) indica que a diferença não é estatisticamente significativa.

Portanto, de acordo com os dados proposta pela ANOVA e os gráficos de pareto a partir da figura 47, é possível observar que todas as variáveis e interações estudadas a partir da resposta do PDI, com exceção da concentração de polímero de forma linear, foram estatisticamente significativas. Ao observar o gráfico é possível prever, que o efeito da variável independente da proporção da concentração do extrato e polímero adicionado na nanopartícula influencia positivamente na variável resposta, já que o objetivo do estudo é diminuir o PDI, isso significa que o efeito da variável quadrática na resposta PDI é curvilíneo e que o PDI diminui inicialmente com o aumento da variável, mas que aumenta em valores mais altos. Nesse caso, o nível que maximiza a resposta será o ponto médio do intervalo da variação da variável independente.

Já a concentração do tensoativo de forma linear é possível obter menores valores de PDI, ao adicionar maiores concentrações de tensoativo no sistema. Da mesma forma, o PDI diminui com o aumento da concentração do polímero adicionado. Esse fator pode ser atribuído devido a estabilização da interface nas nanopartículas, pois os tensoativos podem adsorver na sua superfície e estabilizar a interface entre as partículas e o meio dispersante, reduzindo a tensão superficial, facilitando a formação de partículas mais uniformes, permitindo uma polidispersão.

Enquanto as interações entre variáveis, foram estatisticamente significativas, sendo assim, a interação entre a concentração do polímero e a proporção entre o polímero/extrato, demonstra que maiores concentrações do polímero ou quando esta fica no nível intermediário do planejamento em relação a maiores proporções entre o polímero e extrato ou concentrações intermediárias são capazes de diminuir o PDI, enquanto que, ao se utilizar menores proporções de polímero/extrato é necessário diminuir a concentração do polímero utilizado na formulação, para minimizar o PDI. Já a interação entre a concentração do polímero e a concentração de tensoativo a minimização do PDI é possível, a partir de concentrações maiores ou intermediárias de tensoativo, com a diminuição na concentração de polímero.

Tabela 35- Resultado da ANOVA de nanopartículas por dupla emulsificação modelo Box-Benhken

Fatores	PDI					Tamanho					Potencial Zeta					Eficiência				
	DF	SS	MS	F	<i>p</i>	DF	SS	MS	F	<i>p</i>	DF	SS	MS	F	<i>p</i>	DF	SS	MS	F	<i>p</i>
X₁	1	0,000	0,000	1,21	0,39	1	22,06	22,06	0,22	0,68	1	1,34	1,34	0,09	0,78	1	8,76	8,76	185,48	0,01
X₂	1	0,006	0,006	91,89	0,01	1	198,25	198,25	1,98	0,29	1	10,81	10,81	0,77	0,47	1	238,76	238,76	5054,94	0,00
X₃	1	0,007	0,007	113,71	0,01	1	2519,18	2519,18	25,12	0,03	1	0,97	0,97	0,06	0,82	1	1,36	1,36	28,89	0,03
X₁*X₁	1	0,006	0,006	102,76	0,01	1	213,59	213,59	2,13	0,28	1	0,70	0,71	0,05	0,84	1	1,09	1,09	23,25	0,04
X₂*X₂	1	0,001	0,002	26,23	0,04	1	8573,95	8573,95	85,51	0,01	1	10,35	10,35	0,73	0,48	1	0,08	0,08	1,69	0,32
X₃*X₃	1	0,014	0,014	216,74	0,00	1	7000,74	7000,74	69,82	0,01	1	0,18	0,18	0,01	0,92	1	0,17	0,17	3,69	0,19
X₁*X₂	1	0,007	0,008	120,28	0,01	1	2353,10	2353,10	23,47	0,04	1	7,75	7,75	0,55	0,53	1	12,24	12,24	259,18	0,00
X₁*X₃	1	0,013	0,013	209,90	0,00	1	930,25	930,25	9,28	0,09	1	9,00	9,00	0,64	0,50	1	75,25	75,25	1593,27	0,00
X₂*X₃	1	0,010	0,010	156,84	0,01	1	6488,30	6488,30	64,71	0,01	1	17,22	17,22	1,23	0,38	1	0,22	0,22	4,77	0,16
Lack of Fit	3	0,022	0,007	112,53	0,001	3	13973,53	4657,84	46,45	0,02	3	23,48	7,82	0,56	0,69	3	15,94	5,31	112,51	0,00
Pure Error	2	0,000	0,000	1,21		2	200,54	100,27			2	28,00	14,00	0,09		2	0,09	0,04	185,48	
Total SS	14	0,100				14	46971,16				14	116,86				14	369,14	8,76		

Legenda: X₁= concentração do polímero (m/v %), X₂= concentração do tensoativo (m/v %), X₃= proporção polímero e extrato (m/v). SS = soma dos quadrados, DF= graus de liberdade MS=quadrado médio

Fonte: Dados da pesquisa

Já a interação entre a concentração de tensoativo e a razão do polímero/extrato, é possível diminuir o PDI quando se utiliza concentrações de tensoativos intermediário com o aumento da concentração do tensoativo ou concentrações do nível intermediário.

Enquanto que para variável resposta tamanho das nanopartículas, a proporção entre a concentração do polímero/extrato adicionado, indicam que menores proporções foram capazes de diminuir o tamanho das nanopartículas. Da mesma forma que para variável resposta PDI, concentrações maiores de tensoativo promovem diminuição de tamanho das nanopartículas. Já a concentração do polímero adicionada, não interferiu estaticamente no tamanho das nanopartículas obtidas pelo método de dupla emulsificação.

Na interação entre os fatores, foi possível observar que concentrações do ponto médio da razão do polímero/extrato induzindo para o nível médio desta variável com o aumento da concentração do polímero, é possível obter menores tamanhos de nanopartículas. Já a interação entre a concentração do polímero e de tensoativos, menores concentrações de polímero com o aumento da concentração do tensoativo, é possível diminuir o tamanho das nanopartículas, uma possível explicação seria a diminuição da tensão superficial das partículas, com uma tensão superficial menor, a energia necessária para dividir as partículas em fragmentos menores também é reduzida, o que pode levar a um tamanho menor das nanopartículas, da mesma forma que menores concentrações de polímero, podem diminuir a viscosidade da solução, facilitando a formação de partículas menores, pois uma solução de polímero de baixa viscosidade pode ser melhor dispersa em meio aquoso externo com tamanho de glóbulo fino do que uma solução de polímero de alta viscosidade (Srikar; Rani, 2019)

Porém, a interação que envolve a quantidade de concentração de polímero e proporção polímero/extrato não foram estatisticamente significativos.

Para variável resposta potencial zeta, nenhuma das variáveis estudadas no planejamento experimental foram capazes de ser estaticamente significativa para interferir no resultado do potencial zeta. Enquanto que para variável resposta eficiência de encapsulação, concentrações do ponto médio do polímero utilizada no planejamento, são indicadas para o aumento da eficiência de encapsulação, devido a variável quadrática ter sido estatisticamente significativa. Enquanto que para concentração do polímero, menores proporções adicionadas são capazes de aumentar a eficiência de encapsulação, da mesma forma que a concentração de tensoativos.

Uma possível explicação para isso é que a redução na concentração de tensoativos e polímeros pode resultar em uma menor interação entre esses componentes e o extrato, o que pode permitir uma maior disponibilidade de extrato para ser encapsulado nas nanopartículas. Além disso, a diminuição na concentração de tensoativos e polímeros pode resultar em uma maior porosidade da matriz polimérica da nanopartícula, permitindo uma maior penetração do extrato na nanopartícula e, portanto, uma maior eficiência de encapsulação.

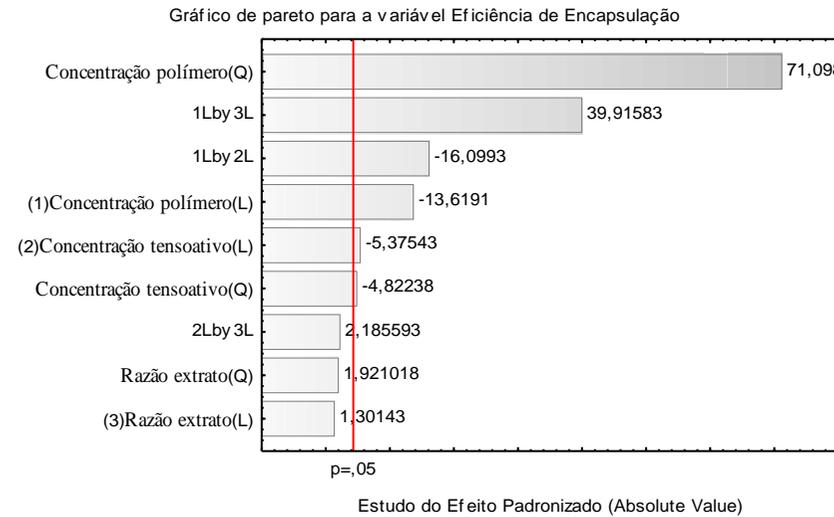
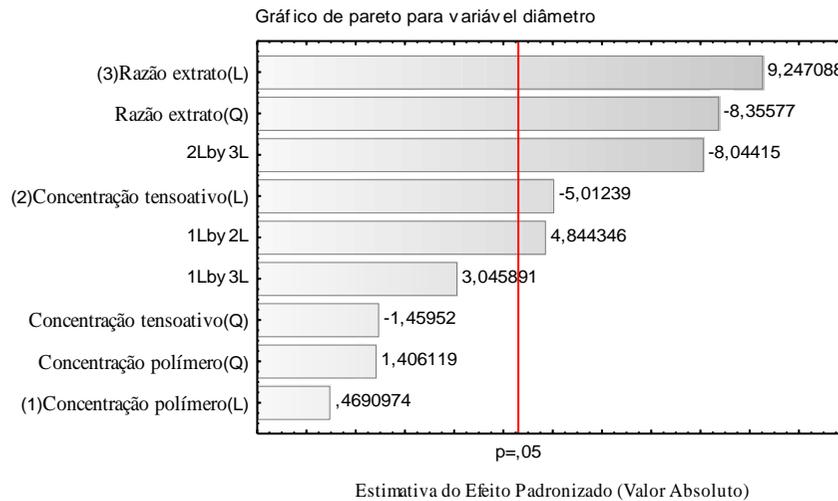
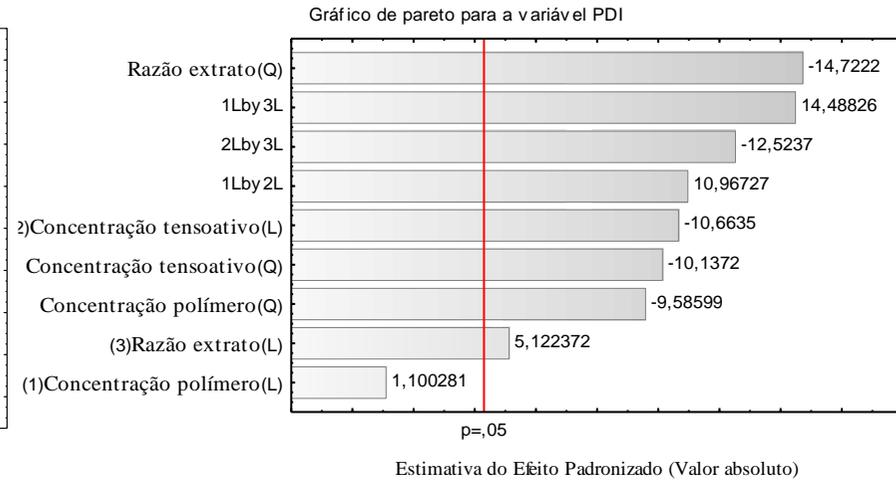
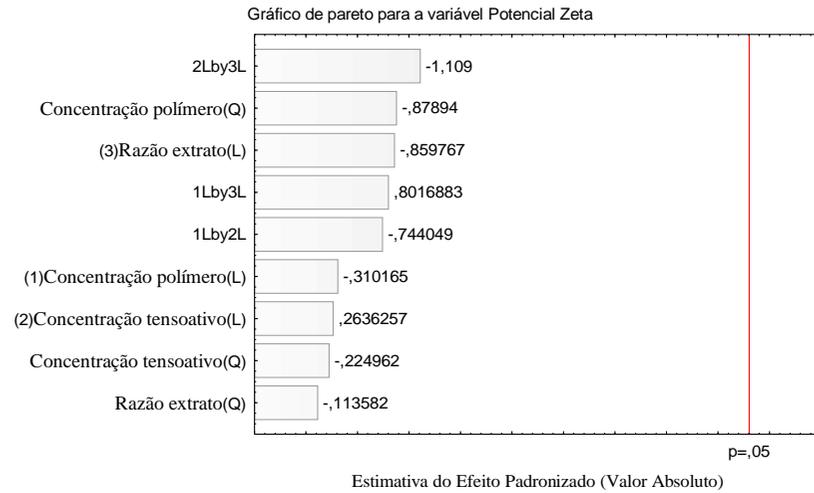
Já as interações entre a proporção polímero/extrato e concentração do polímero explicam que com o aumento da concentração de polímero e da sua razão com o extrato, aumenta-se a eficiência de encapsulação. Essa maior encapsulação, pode ser devido ao tipo de polímero utilizado no desenvolvimento da formulação, Eudragit RL-100, visto que, por se tratar de um polímero hidrofóbico, quanto maior a hidrofobicidade do polímero, maior a resistência para saída do extrato encapsulado para o meio aquoso externo, resultando em maior aprisionamento. (Srikar; Rani, 2019; Szczech; Szczepanowicz, 2020).

A interação por sua vez da quantidade de tensoativo e de polímero adicionada na formulação, é explicada a maximização da eficiência, quando concentrações de ponto médio do polímero do planejamento e o aumento da concentração do tensoativo, foram utilizadas.

Todas explicações abordadas entre as interações dos fatores independentes em função das respostas estudadas no planejamento significativas, são melhores visualizadas a partir dos gráficos de superfície demonstrados a partir das figuras 48. Já a interação entre a concentração de tensoativo e a razão do polímero/extrato, é possível diminuir o PDI quando se utiliza concentrações de tensoativos intermediário com o aumento da concentração do tensoativo ou concentrações do nível intermediário.

Enquanto que para variável resposta tamanho das nanopartículas, a proporção entre a concentração do polímero/extrato adicionado, indicam que menores proporções foram capazes de diminuir o tamanho das nanopartículas. Da mesma forma que para variável resposta PDI, concentrações maiores de tensoativo promovem diminuição de tamanho das nanopartículas. Já a concentração do polímero adicionada, não interferiu estaticamente no tamanho das nanopartículas obtidas pelo método de dupla emulsificação.

Figura 47- Gráfico de Pareto planejamento Box-Behnken de nanopartículas por dupla emulsificação



Na interação entre os fatores, foi possível observar que concentrações do ponto médio da razão do polímero/extrato induzindo para o nível médio desta variável com o aumento da concentração do polímero, é possível obter menores tamanhos de nanopartículas. Já a interação entre a concentração do polímero e de tensoativos, menores concentrações de polímero com o aumento da concentração do tensoativo, é possível diminuir o tamanho das nanopartículas, uma possível explicação seria a diminuição da tensão superficial das partículas, com uma tensão superficial menor, a energia necessária para dividir as partículas em fragmentos menores também é reduzida, o que pode levar a um tamanho menor das nanopartículas, da mesma forma que menores concentrações de polímero, podem diminuir a viscosidade da solução, facilitando a formação de partículas menores, pois uma solução de polímero de baixa viscosidade pode ser melhor dispersa em meio aquoso externo com tamanho de glóbulo fino do que uma solução de polímero de alta viscosidade. (Srikar; Rani, 2019).

Porém, a interação que envolve a quantidade de concentração de polímero e proporção polímero/extrato não foram estatisticamente significativos.

Para variável resposta potencial zeta, nenhuma das variáveis estudadas no planejamento experimental foram capazes de ser estatisticamente significativa para interferir no resultado do potencial zeta. Enquanto que para variável resposta eficiência de encapsulação, concentrações do ponto médio do polímero utilizada no planejamento, são indicadas para o aumento da eficiência de encapsulação, devido a variável quadrática ter sido estatisticamente significativa. Enquanto que para concentração do polímero, menores proporções adicionadas são capazes de aumentar a eficiência de encapsulação, da mesma forma que a concentração de tensoativos.

Uma possível explicação para isso é que a redução na concentração de tensoativos e polímeros pode resultar em uma menor interação entre esses componentes e o extrato, o que pode permitir uma maior disponibilidade de extrato para ser encapsulado nas nanopartículas. Além disso, a diminuição na concentração de tensoativos e polímeros pode resultar em uma maior porosidade da matriz polimérica da nanopartícula, permitindo uma maior penetração do extrato na nanopartícula e, portanto, uma maior eficiência de encapsulação.

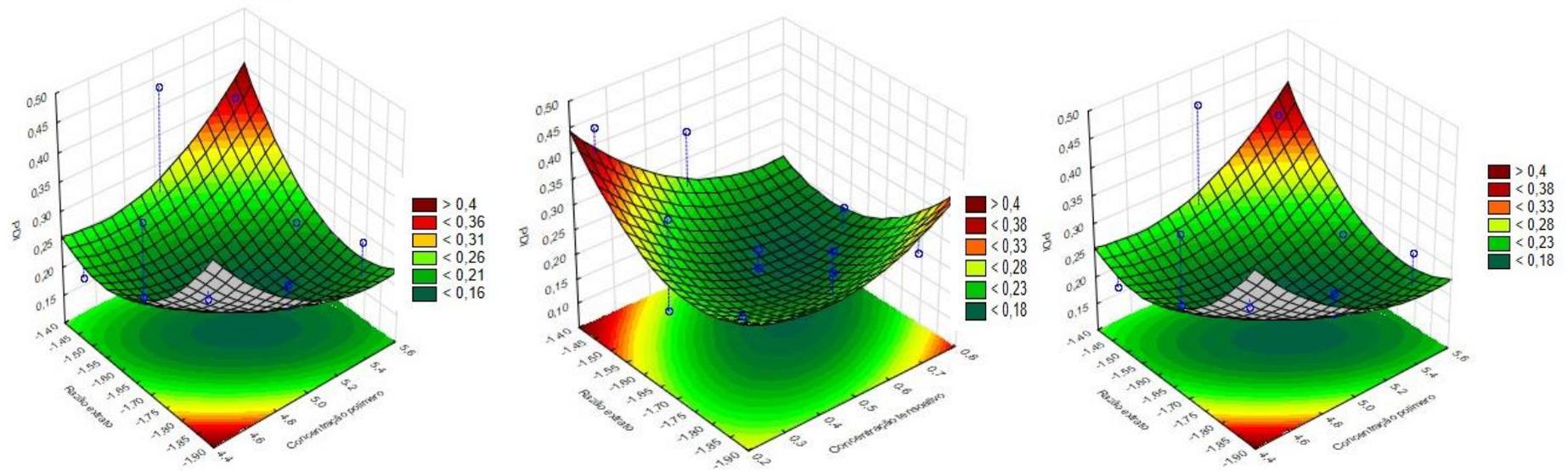
Já as interações entre a proporção polímero/extrato e concentração do polímero explicam que com o aumento da concentração de polímero e da sua razão com o extrato, aumenta-se a eficiência de encapsulação. Essa maior encapsulação, pode ser devido ao

tipo de polímero utilizado no desenvolvimento da formulação, Eudragit RL-100, visto que, por se tratar de um polímero hidrofóbico, quanto maior a hidrofobicidade do polímero, maior a resistência para saída do extrato encapsulado para o meio aquoso externo, resultando em maior aprisionamento.(Laller *et al.*, 2020; Srikar; Rani, 2019).

A interação por sua vez da quantidade de tensoativo e de polímero adicionada na formulação, é explicada a maximização da eficiência, quando concentrações de ponto médio do polímero do planejamento e o aumento da concentração do tensoativo, foram utilizadas.

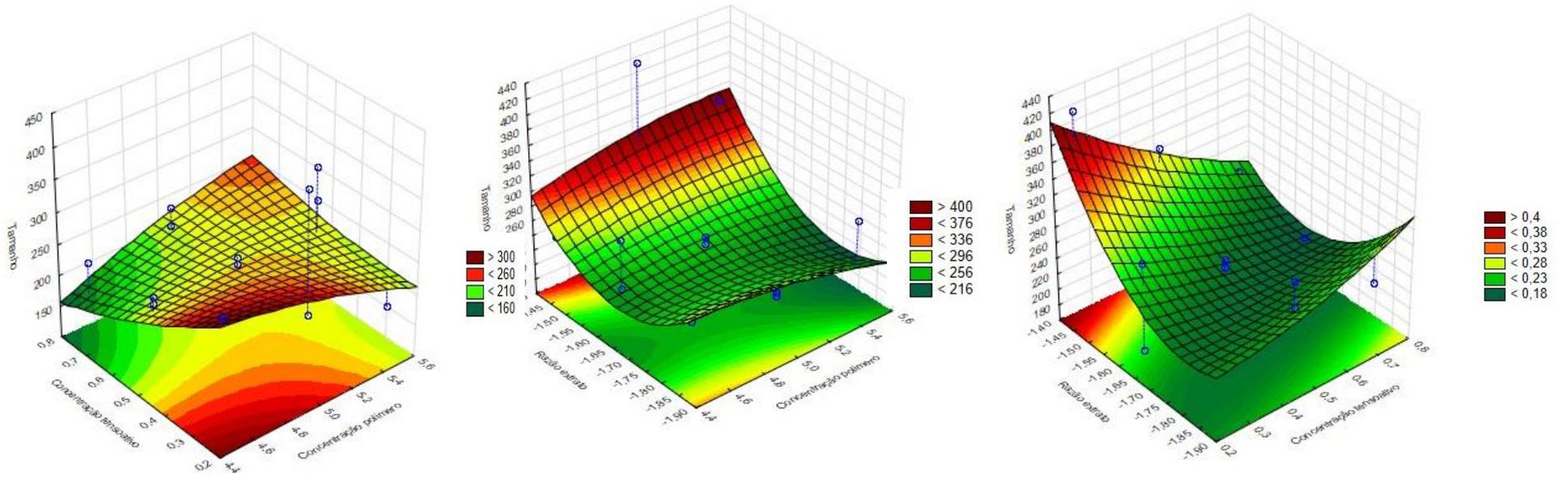
Todas explicações abordadas entre as interações dos fatores independentes em função das respostas estudadas no planejamento significativas, são melhores visualizadas a partir dos gráficos de superfície demonstrados a partir das figuras 48 e 49

Figura 48- Gráficos de superfície das interações entre as variáveis independentes para resposta PDI.



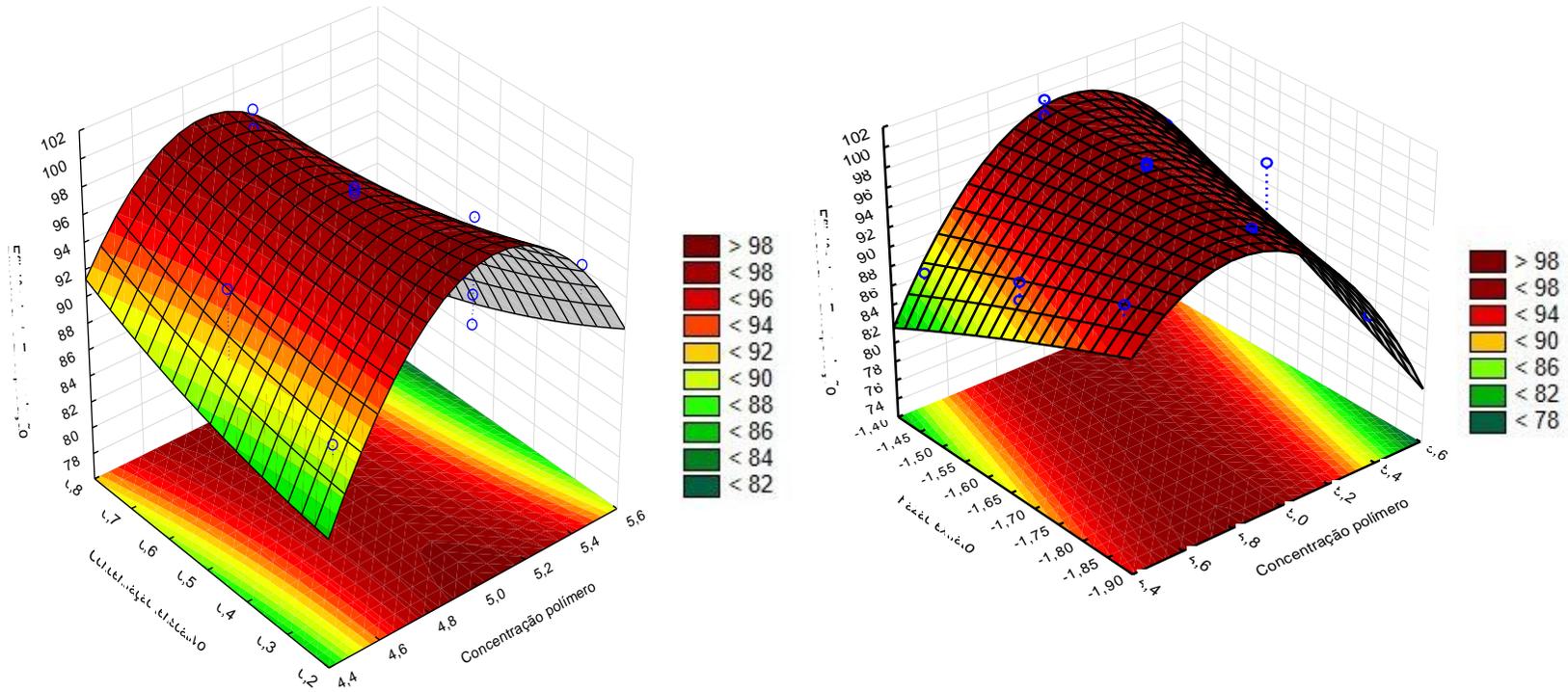
Fonte: Dados da pesquisa

Figura 49- Gráficos de superfície das interações entre as variáveis independentes para resposta tamanho.



Fonte: Dados da pesquisa

Figura 50- Gráficos de superfície das interações entre as variáveis independentes para resposta eficiência de encapsulação



Fonte: Dados da pesquisa

Ao realizar o experimento com vários fatores, como estudado, para otimizar as condições para obtenção de nanopartículas por dupla emulsificação, pode-se desejar a minimização do PDI e tamanho e a maximização do potencial zeta e eficiência de encapsulação. Sendo assim, a análise de desejabilidade permite combinar essas medidas em uma única medida que representa a desejabilidade global da combinação de fatores, levando em consideração todas as características relevantes.

O valor da desejabilidade composta é uma medida que reflete a desejabilidade global de uma combinação de níveis de fatores em um experimento, sendo assim, foi adquirido a otimização da combinação dos fatores estudados a fim de obter melhores condições para aquisição de nanopartículas por dupla emulsificação. Através desse método, obtivemos como condições os seguintes parâmetros: concentração do polímero (4,66% m/v), concentração do tensoativo (0,75% m/v) e razão entre a quantidade de polímero/extrato (16:1 m/m) que obteve como resultado da otimização, demonstrados através da tabela 36 e figura 51.

Tabela 36- Resultados da otimização do planejamento Box-Benhken por dupla emulsificação

	Índice de polidispersão	Tamanho (nm)	Potencial zeta (mV)	Eficiência de encapsulação (%)	Desejabilidade composta
Desejabilidade	0,159 ± 0,03	176,6 ± 0,03	35,2 ± 0,02	93,46	0,89

Fonte: Dados da pesquisa

Figura 51- Nanopartícula obtida pela função de desejabilidade a partir do planejamento Box-Benhken por dupla emulsificação.



Fonte: Dados da pesquisa

A partir dos resultados obtidos, é possível advertir que a combinação desses fatores promove uma desejabilidade composta próxima a 1, indicando uma combinação de fatores totalmente desejável, sendo comprovado através dos valores almejavéis para PDI, tamanho, potencial zeta e eficiência de encapsulação. Sendo assim, será a formulação de escolha para seguir com os próximos experimentos.

5.2.3.4.3. Estabilidade das nanopartículas

Para investigar as variações nas propriedades físico-químicas das nanopartículas ao longo do tempo e em diferentes condições de armazenamento, conduzimos um ensaio de estabilidade, no qual foram determinados o diâmetro médio, o PDI e o potencial zeta ao longo de um período de 60 dias, com armazenamento tanto sob refrigeração quanto em temperatura ambiente. Dessa forma, por meio deste estudo, buscamos avaliar a qualidade das nanopartículas desenvolvidas e estimar uma tendência geral de estabilidade em relação à temperatura, visando a identificação do local ideal de armazenamento.

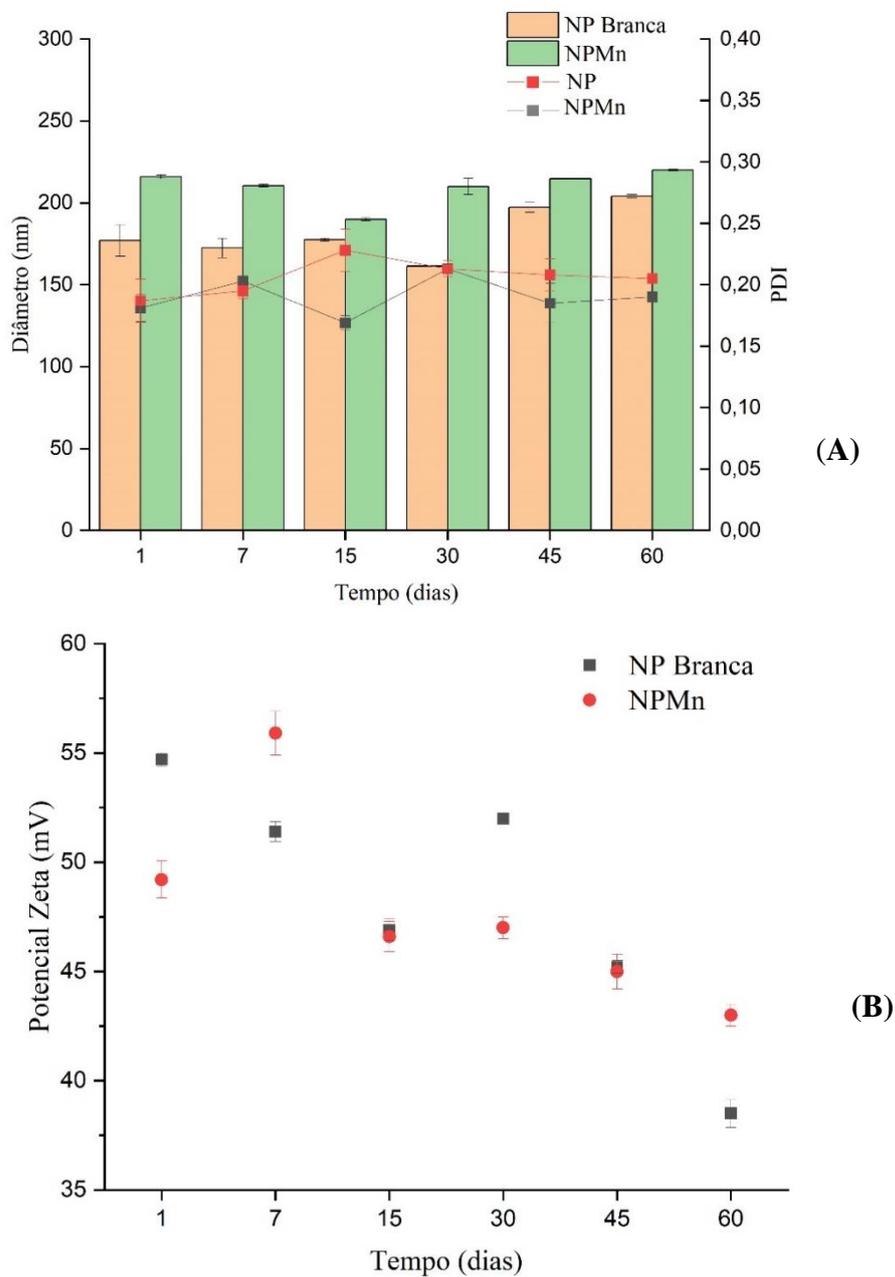
As variações ocorridas durante o período de armazenamento nas diferentes condições de temperatura estão dispostas graficamente na figura 52. Para a nanopartícula sem fármaco as variações de diâmetro médio foram significativas ao longo do período do estudo no 60º dia, saindo de $177,5 \pm 0,02$ nm nos pós preparo para $204,2 \pm 0,24$ sob temperatura ambiente e $200 \pm 0,2$ sob refrigeração. Enquanto que, ao comparar nanopartículas sob temperatura ambiente com o primeiro dia de estudo, o tamanho diminuiu ao longo do tempo, com variações significativas a partir do 15º dia ($p < 0,05$).

O PDI foi de $0,181 \pm 0,001$ no primeiro dia para $0,190 \pm 0,0002$ sob temperatura ambiente, para $0,170 \pm 0,02$ no último dia da amostra congelada. Quando comparadas durante todo o estudo de estabilidade, houve variações significativas no dia 7 ($p < 0,01$), 30 ($p < 0,05$) e 60º ($p < 0,01$) em relação a temperatura divergente, mesmo assim, todas as formulações mantiveram-se dentro do esperado, com $PDI < 0,3$ demonstrando sua homogeneidade. Já quando se compara as nanopartículas após o preparo com a temperatura ambiente ou refrigerada, não houve variações significativas com $p > 0,05$ para o mesmo parâmetro.

Quanto ao potencial zeta a variação ocorreu de $+54,1 \pm 1,5$ mV para $38,5 \pm 0,2$ mV sob temperatura ambiente, para $45 \pm 0,3$ mV sob refrigeração no 60º dia com observado através da figura 53. Entre as temperaturas, o potencial zeta só foi significativo, após 30º dia ($p < 0,01$), da mesma forma quando se compara com a formulação inicial

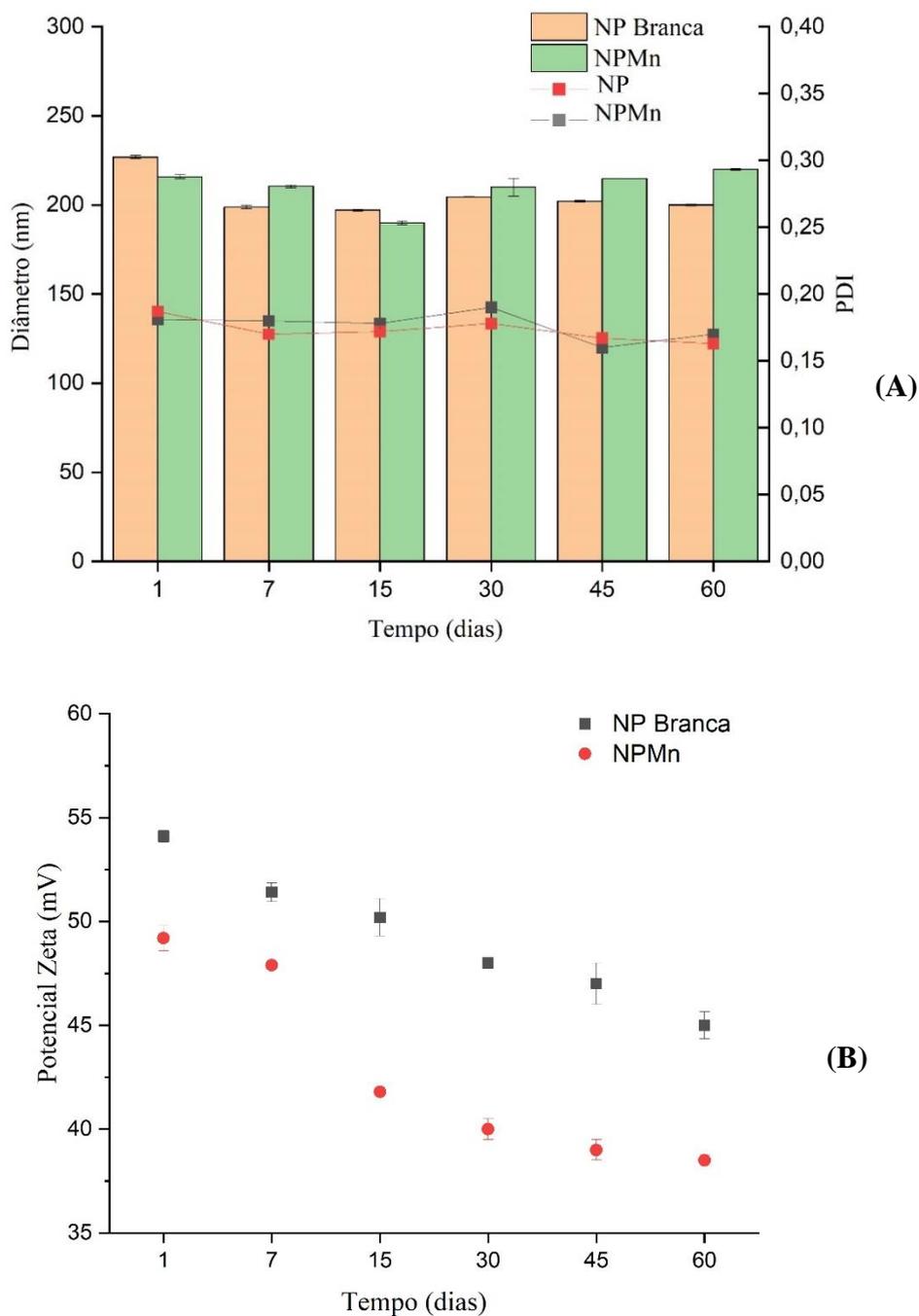
($p < 0,01$ para o 60º dia e $p < 0,05$ para 30º e 45º dia), mesmo assim, o potencial zeta manteve-se acima de 30 mV, promovendo a estabilidade da formulação.

Figura 52-Gráfico das variações de diâmetro médio, PDI (A) e potencial zeta (B) da nanopartícula armazenada sob temperatura ambiente



Fonte: Dados da pesquisa

Figura 53-Gráfico das variações de diâmetro médio, PDI (A) e potencial zeta (B) da nanopartícula armazenada sob refrigeração



Fonte: Dados da pesquisa

Em relação as nanopartículas contendo o extrato, mesmo após 60 dias, as formulações mantiveram-se estáveis com diâmetro médio inicial de $200,4 \pm 3,1$ nm, chegando a $170 \pm 0,8$ sob temperatura ambiente e a $220 \pm 0,5$ nm sob refrigeração, no último dia de análise. Já o PDI iniciou com $0,187 \pm 0,002$ e finalizou com $0,205 \pm 0,002$

sob temperatura ambiente e $0,163 \pm 0,0005$ sob refrigeração. Quanto ao potencial zeta a variação ocorreu de $49,2 \pm 0,85$ mV para $43 \pm 0,5$ mV sob temperatura ambiente e $38,5 \pm 0,25$ mV sob refrigeração. Ao comparar os dados entre as formulações em temperaturas diferentes, os dados demonstraram que relação ao PDI não houve variações significativas nos resultados esperados, entre as temperaturas e os dias do estudo ($p > 0,1$), já o diâmetro médio das nanopartículas foi aumentado quando adicionadas sob refrigeração e com significância a partir de 30° dia de estudo ($p < 0,01$) e comparada com a formulação inicial, houve diminuições de tamanho com alterações significativas ($p < 0,05$) a partir do 30° dia sob temperatura ambiente. Já sob refrigeração apenas o dia 15° obteve tamanhos diferentes significativos comparados ($p < 0,01$). Enquanto o potencial zeta foi diminuído quando adicionadas sob refrigeração e as variações foram significativas a partir do 15° dia de estudo ($p < 0,05$).

Com base nestes dados, podemos afirmar que as nanopartículas contendo o extrato são estáveis quando preferencialmente sob temperatura ambiente e que os tamanhos hidrodinâmicos aumentam principalmente para nanopartículas vazias. A refrigeração pode afetar a estabilidade coloidal das nanopartículas, influenciando o potencial zeta e a tendência de agregação. Mudanças na temperatura podem alterar as interações entre os componentes da formulação e as propriedades da interface das nanopartículas, afetando sua estabilidade ao longo do tempo. De qualquer forma, o estudo de estabilidade demonstrou que a formulação estudada, apresentaram resultados satisfatórios de potencial zeta (acima de 30 mV), tamanho e índice de polidispersão (abaixo de 0,3) indicando que a formulação das nanopartículas poliméricas foi bem-sucedida, mesmo sob condições diferentes de temperatura. Isso sugere que a formulação pode ser robusta o suficiente para resistir a variações de temperatura e permanecer estável, o que é um resultado promissor para aplicações práticas.

5.2.3.4.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

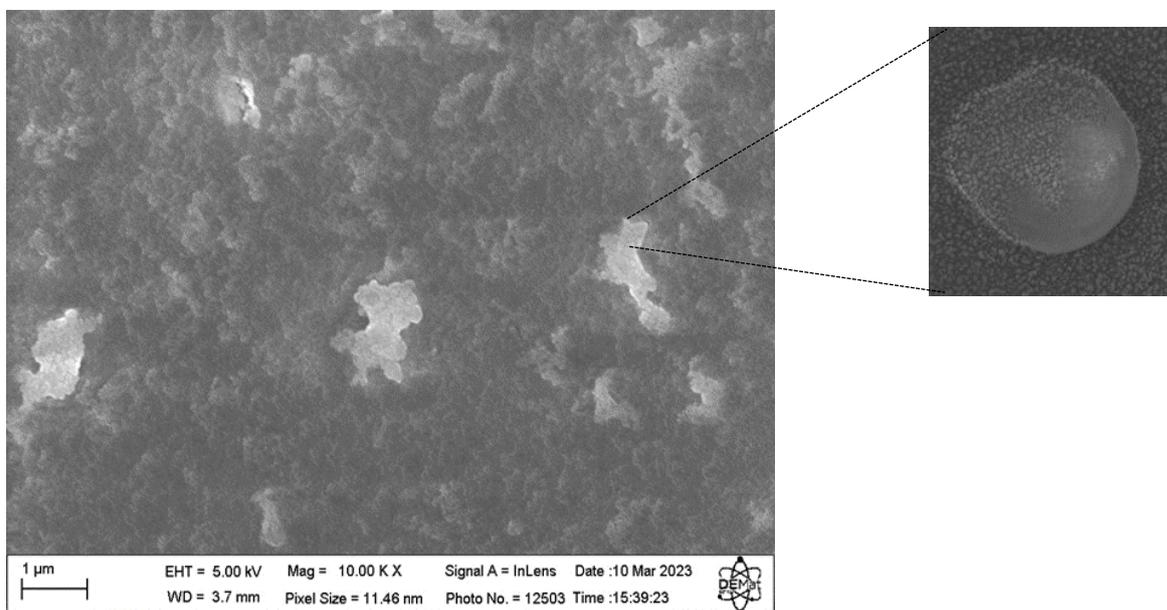
Com o objetivo de avaliar morfologicamente as partículas obtidas nestes ensaios, as amostras foram analisadas pela técnica de MEV. Esta técnica é uma importante ferramenta utilizada na estratégia para caracterização de nanomateriais dos mais diferentes tipos e classes. Uma sonda varre com um feixe de elétrons a superfície da amostra e a interação entre os elétrons e amostra gera diversos tipos de emissão de elétrons secundários retroespalhados, *auger* e absorvidos, assim como de raios X

característicos e de catodoluminescência. A imagem é gerada em tons de cinza representa o mapeamento e a contagem de elétrons secundários e retroespalhados emitidos pelo material analisado (Koniuch *et al.*, 2023).

As nanopartículas encapsuladas com os compostos fenólicos demonstraram que as partículas têm uma forma esférica uniforme com uma superfície lisa e são distribuídas uniformemente conforme figura 54 e 55'. Os tamanhos de partículas visualizados nas imagens confirmam o tamanho obtido pela técnica de espalhamento de luz, anteriormente descrita.

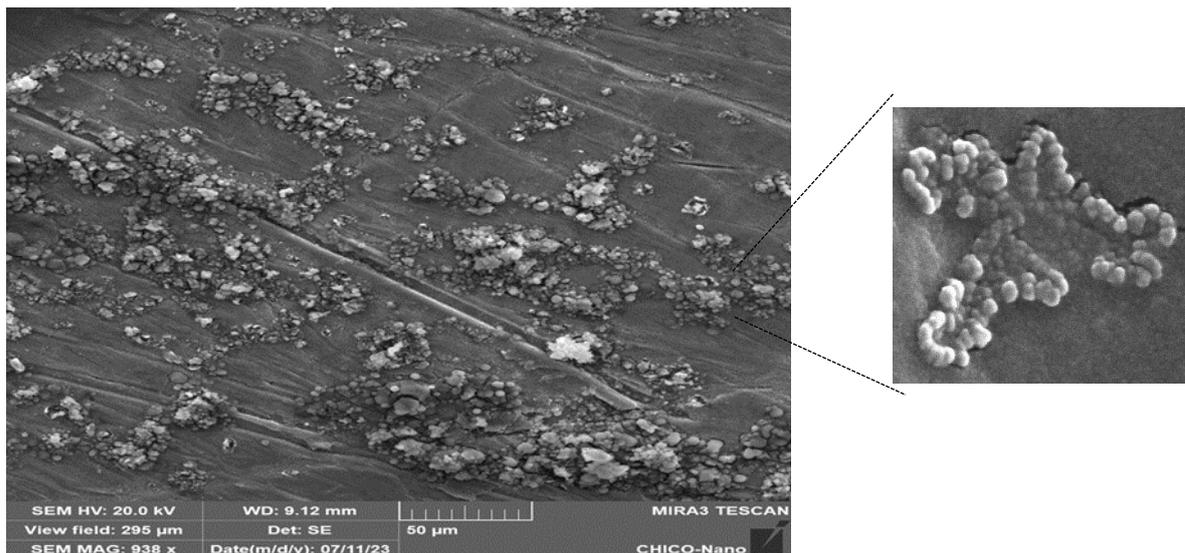
O formato esférico facilita o escoamento do material e os tamanhos variados as partículas menores acomodam-se nos interstícios das maiores, facilitando acomodação das partículas.

Figura 54-Microscopia Eletrônica de Varredura das nanopartículas por dupla emulsificação



Fonte: Dados da pesquisa

Figura 55-Microscopia Eletrônica de Varredura das nanopartículas por nanoprecipitação



Fonte: Dados da pesquisa

5.2.3.4.5. Liofilização das nanopartículas

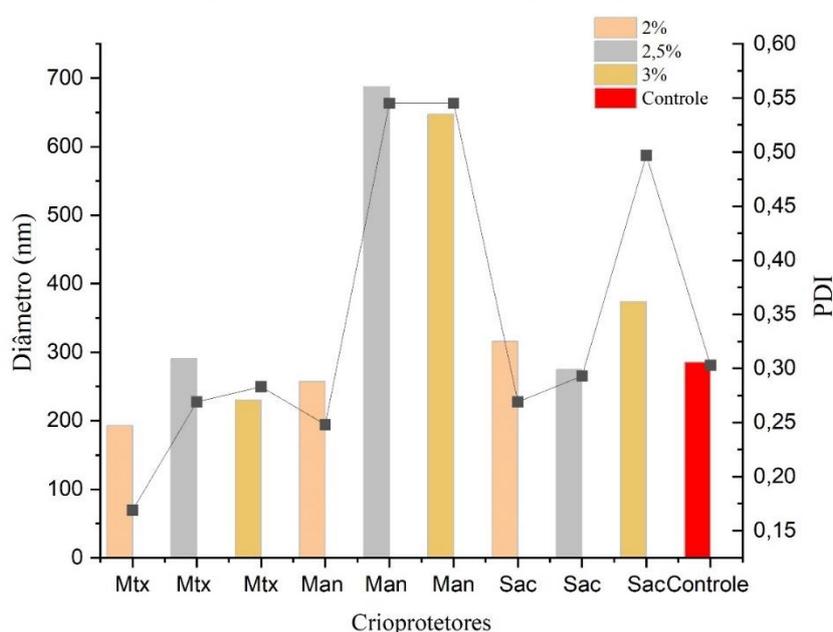
A liofilização é um procedimento industrial comum destinado a retirar a água de sistemas coloidais, incluindo lipossomas, nanopartículas de ouro e nanopartículas poliméricas. Embora a liofilização amplie a vida útil de armazenamento para esses sistemas, a preservação da estrutura das partículas coloidais durante o congelamento e a liofilização requer o uso de crioprotetores devido às várias tensões a que essas partículas são submetidas (Fonte; Reis; Sarmiento, 2016; Mahalingam; Krishnamoorthy, 2015b; Picco *et al.*, 2018; Safaryan *et al.*, 2019)

Os crioprotetores desempenham um papel crucial na minimização dos efeitos adversos associados ao processo de liofilização, sendo os polímeros naturais e de base sintética os mais comumente empregados para esse fim. Dentre os crioprotetores naturais, a trealose, sacarose, maltose, maltodextrina e lactose são os mais amplamente utilizados na crioproteção de nanopartículas à base de polímeros. A eficácia desses açúcares como crioprotetores está diretamente relacionada à sua capacidade de formar um estado vítreo tanto dentro quanto fora das nanopartículas, além de estabelecer ligações de hidrogênio com as porções na superfície das mesmas. Este efeito crioprotetor ou lioprotetor dos açúcares é atribuído à formação de uma matriz amorfa ao redor das nanopartículas, promovendo um espaçamento entre as mesmas, evitando, assim, a agregação durante o congelamento, tornando-as ressuspendíveis

Desta forma, visando melhorar a estabilidade e viabilizar a produção de formas farmacêuticas sólidas para administração oral, as nanopartículas foram submetidas ao processo de liofilização. Devido à influência do tipo e concentração de crioprotetores no efeito de estabilização, realizou-se uma comparação do efeito protetor de três açúcares em diferentes concentrações na formulação final. Durante o processo, observou-se que o tipo e a concentração do crioprotetor influenciaram o tamanho das partículas e o índice de polidispersidade.

Dentre os crioprotetores utilizados, o manitol obteve resultados insatisfatórios, principalmente ao utilizar concentrações maior ou igual a 2,5%, apresentando tamanhos acima de 160 nm (quatro vezes maior) e PDI superior a 0,3, como apresentados na figura 56. Esses achados sugerem uma qualidade inferior no processo quando o manitol é utilizado nessas concentrações.

Figura 56-Diâmetro e índice de polidispersão das nanopartículas liofilizados com crioprotetores em diferentes proporções.



Fonte: Dados da pesquisa

Já quando as nanopartículas foram submetidas a uma concentração menor do crioprotetor (2 %) o PDI se manteve estável, porém obteve o aumento do tamanho em 100 nm.

Uma teoria provável é de que o manitol tenha cristalizado a partir da solução aquosa congelada, promovendo a formação de cristais sólidos dentro da matriz de gelo. Esses cristais de manitol podem crescer e se expandir durante o processo de sublimação,

criando tensões mecânicas nas nanopartículas. Essas tensões podem ser especialmente prejudiciais para sistemas coloidais, como as nanopartículas, pois podem resultar em alterações na estrutura e no tamanho das partículas (Kumar; Mallik; Sarkar, 2017).

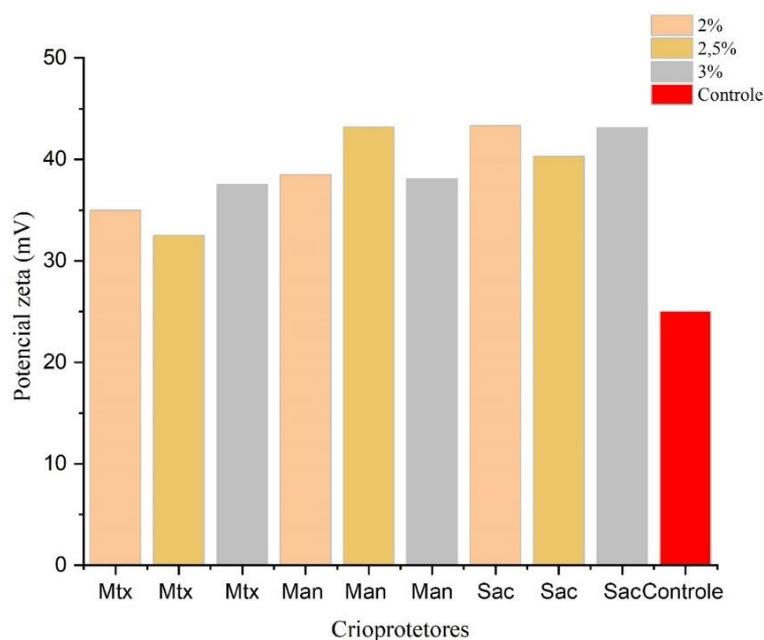
A mesma concentração quando empregada (maior ou igual a 2,5%) com outros crioprotetores (sacarose e maltodextrina) durante a análise da liofilização, também promoveu resultados abaixo do esperado (PDI acima de 0,3 e tamanhos superiores a 200 nm), o que pode ter propiciado a formação incompleta do revestimento vítreo ao redor das nanopartículas, facilitando a agregação e comprometendo a eficácia do processo de secagem.

Já os líófilos preparados com maltodextrina a 2% apresentaram resultados mais próximos as características das nanopartículas em dispersão antes da liofilização (PDI abaixo de 0,3 e tamanho entre 160-200nm) corroborando com dados da literatura que parecem especialmente úteis para este propósito, devido à sua boa solubilidade aquosa, baixa viscosidade e alta temperatura de transição vítrea que fornecem uma matriz vítrea estável. (Al-Qushawi *et al.*, 2016; Degobert; Aydin, 2021; Magri *et al.*, 2019; Soares *et al.*, 2013)

Enquanto ao potencial zeta, independente da concentração e do crioprotetor empregado, as nanopartículas se mantiverem com valores acima de 30 mV, como demonstrado na figura 57. O potencial zeta é uma medida da carga elétrica na superfície das nanopartículas. Um maior potencial zeta indica uma maior estabilidade coloidal, já que as partículas carregadas se repelem, reduzindo a aglomeração.

Isso se deve, pois, os dissacarídeos, como a sacarose, podem estabilizar melhor as nanopartículas devido à sua maior flexibilidade molecular e menor interferência estérica, enquanto os polissacarídeos, como a maltodextrina, podem proporcionar um melhor isolamento das partículas devido à sua maior concentração com base na massa. Essa maior massa molar dos polissacarídeos significa que uma quantidade menor deles será necessária para alcançar uma determinada concentração molar ou osmolaridade em comparação com compostos de menor massa molar, como dissacarídeos, desta forma pode alcançar uma maior concentração com uma quantidade menor de material, o que pode contribuir para um melhor isolamento das partículas durante a liofilização, ajudando a preservar suas propriedades e estrutura (Trenkenschuh; Friess, 2021).

Figura 57- Potencial zeta das nanopartículas liofilizados com crioprotetores em diferentes proporções



Fonte: Dados da pesquisa

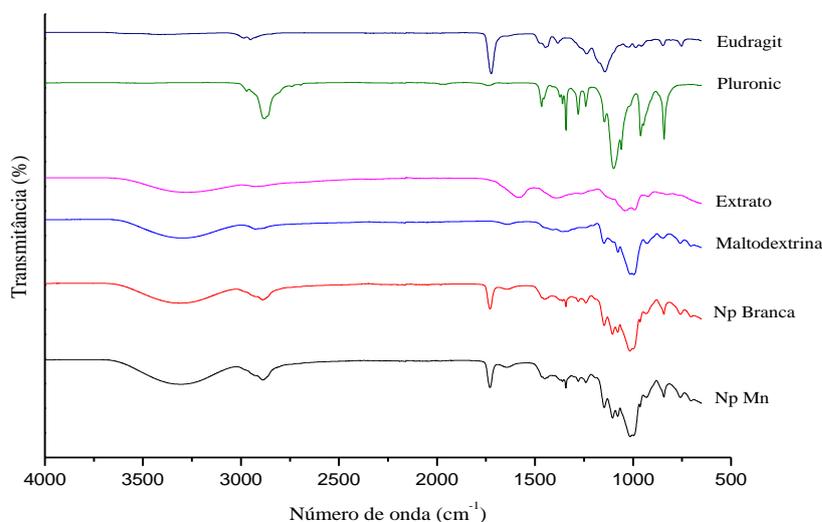
Desta forma, dentre todas as amostras, as que usaram maltodextrina a 2% apresentaram resultados mais próximos as características das nanopartículas em dispersão antes da liofilização. Ao ser comparada com a nanopartícula controle (sem o uso do crioprotetor) estas apresentaram, PDI acima de 0,3, com o tamanho duas vezes maior e potencial zeta abaixo do esperado. Portanto, o liófilo escolhido (crioproteção de maltodextrina a 2%), apresentou diâmetro médio de 190 nm, PDI 0,169 e PZ +35 mV e seguiu com os experimentos posteriores. As nanopartículas possuíram valores de diâmetro, PDI e PZ semelhantes à mesma formulação testada no planejamento experimental, demonstrando sua reprodutibilidade, bem como a EE semelhante em torno de 92,1%.

5.2.3.4.6. Caracterizações das nanopartículas liofilizadas

5.2.3.4.6.1 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada De Fourier (FTIR)

Para confirmação da incorporação do extrato na matriz nas nanopartículas, bem como avaliação de interações e estabilidade físico-química após o processo de liofilização, foi realizado ensaio de espectroscopia no infravermelho, cujos gráficos estão apresentados na Figura 58.

Figura 58- Espectro de infravermelho das substâncias isoladas da liofilização e das nanopartículas brancas (Np Branca) e nanopartículas contendo o extrato (NpMn)



No espectro de FTIR da maltodextrina, observa-se, uma banda que se estende de 3000 a 3500 cm^{-1} , que provavelmente se refere ao alongamento vibracional de ligações O-H, além de um conjunto de bandas na região entre 900 e 1200 cm^{-1} , que se atribui à ligação simétrica C-O-C das ligações de glicose da molécula da maltodextrina. E as bandas de baixa intensidade por volta de 1643 cm^{-1} pode ser atribuídas à vibração de flexão H-O no plano assim como uma banda em 1337 cm^{-1} , que se sugere à ligação simétrica C-O-C das ligações de glicose da molécula da maltodextrina. (Maqsoudlou *et al.*, 2020; Punitha; Uvarani; Panneerselvam, 2014; Sritham; Gunasekaran, 2017)

Já os espectros entre as nanopartículas branca e a nanopartículas com extrato, possuem similaridade nas bandas, isso pode sugerir uma efetiva incorporação do extrato na matriz polimérica da nanopartícula contendo o extrato. Além disso, a maltodextrina utilizada como crioprotetor nas nanopartículas apresentaram bandas adicionais (1419 e 1337 cm^{-1}), sugerindo que a maltodextrina desempenhou seu papel protetor durante esse processo. Também é possível observar o aparecimento em 1733 cm^{-1} nas nanopartículas, que deve estar relacionado ao polímero utilizado. A banda em 1733 cm^{-1} é geralmente associada ao grupo carbônico (C=O), pôr o Eudragit RL 100 ser uma resina acrílica que contém grupos funcionais éster, esses grupos frequentemente apresentam bandas em torno de 1733 cm^{-1} , portanto, a detecção dessa banda fortalece a evidência que o polímero está presente na matriz do material polimérico em questão. Ademais, a manutenção do perfil do espectro dos compostos, sem deslocamentos nem surgimento de novos picos,

também confirmam a estabilidade físico-químicas dos sistemas obtidos. Dados isolados dos componentes foram discutidos no tópico 5.2.3.4.1.1 e podem ser utilizados para proporcionar uma compreensão mais aprofundada.

5.2.3.4.6.2. Estudo de liberação *in vitro*

A liberação *in vitro* é um método utilizado para avaliar e estudar a taxa de liberação de substâncias de uma forma controlada, simulando condições laboratoriais que imitam o ambiente biológico em função do tempo. Além disso, fornece informações sobre a cinética de liberação de substâncias a partir de uma formulação ou material específico.

Essa técnica é útil para avaliar e otimizar a eficácia terapêutica de medicamentos, bem como para entender e controlar a liberação de ingredientes ativos em produtos farmacêuticos. Os resultados obtidos a partir desses estudos podem ser utilizados para ajustar a formulação de medicamentos, determinar a velocidade de absorção de um ingrediente ativo ou avaliar a adequação de um produto para um determinado propósito. Os métodos de diálise para determinar o perfil de liberação de fármacos tem sido amplamente utilizado em sistemas poliméricos, para orientar o desenvolvimento da formulação, facilitando o controle de qualidade e no melhor dos casos, estabelecer a correlação *in vitro-in vivo* da formulação.

A escolha de Eudragit® RL 100 na produção de nanopartículas estabilizantes foi realizada devido à sua capacidade de formar uma forte barreira contra a liberação de compostos fenólicos ao longo do tempo e a sensibilidade do polímero ao pH, o potencial para induzir uma liberação controlada como uma função da localização no trato gastrointestinal. A natureza anfífila do polímero confere características hidrofílicas e hidrofóbicas, resultando em diferentes propriedades de solubilidade em diferentes faixas de pH. Eudragit® RL 100, é composto principalmente por copolímeros de metacrilato de metila, metacrilato de etila e trimetilamônioetil metacrilato de cloreto. Esses copolímeros possuem grupos carboxila (-COOH) que são responsáveis pela resistência ao pH ácido e pela solubilidade em pH alcalino. Em condições de pH ácido, como no estômago, as moléculas do Eudragit® RL 100 apresentam-se na forma de sal insolúvel, devido à interação entre os grupos carboxila e os íons hidrogênio presentes no meio ácido. Essa forma salificada do polímero torna-o praticamente insolúvel em água e impede a liberação do fármaco encapsulado (Dieng *et al.*, 2020; Katara; Majumdar, 2013a; Ubrich *et al.*, 2005).

No entanto, à medida que o pH aumenta, conforme o conteúdo do estômago passa para o intestino delgado, o ambiente torna-se mais alcalino. Nesse pH alcalino, os grupos carboxila do Eudragit® RL 100 se dissociam dos íons hidrogênio, resultando em uma forma neutra do polímero. Essa forma neutra é hidrofílica e solúvel em água, permitindo que o polímero se dissolva e libere o fármaco encapsulado para absorção no intestino delgado (Senarat *et al.*, 2023).

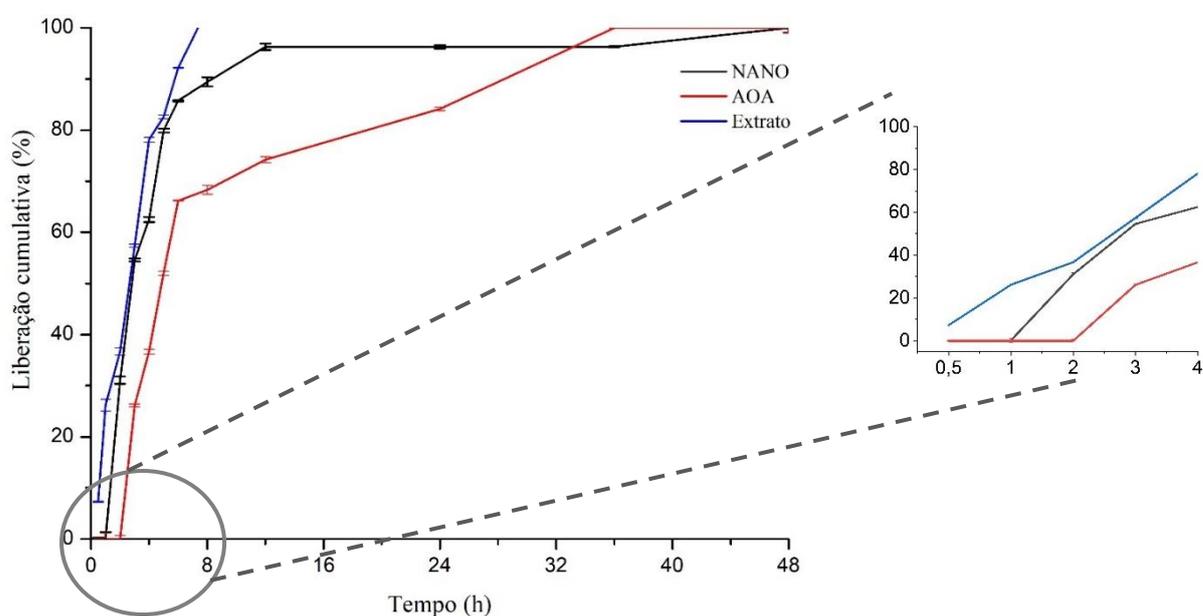
Essa absorção é preferível para os compostos fenólicos, já que em condições ácidos os compostos podem sofrer modificações estruturais devido a exposição do ácido clorídrico presente no suco gástrico. Essas mudanças podem afetar sua solubilidade e estabilidade, tornando-os menos disponíveis para absorção. Além disso, o pH ácido no estômago pode afetar a atividade de enzimas envolvidas na digestão e absorção de compostos fenólicos. Algumas enzimas, como a beta-glicosidase, responsável pela quebra de glicosídeos presentes nos compostos fenólicos, podem ter sua atividade reduzida em pH ácido. Isso pode limitar a liberação e a disponibilidade desses compostos para absorção no intestino delgado (Friedman; Jürgens, 2000; Grgić *et al.*, 2020).

Desta forma, o perfil de liberação das nanopartículas contendo os compostos fenólicos foi avaliada em meio ácido (pH 1,2) por 2h e adicionado em meio básico (pH 6,8) até o tempo final do estudo (48h), simulando o pH estomacal e intestinal respectivamente a uma temperatura de 37°C. Conforme a liberação na figura 59 a liberação dos compostos fenólicos a partir do extrato é geralmente rápida no pH ácido, liberando 36% em 2h. Ao comparar com as nanopartículas, fica claro a estabilização das nanopartículas com Eudragit RL®100, na prolongação significativa dos compostos fenólicos no mesmo período de tempo, com um aumento gradual na taxa de liberação em pH 6,8. Os perfis de liberação *in vitro* revelaram que as nanopartículas por dupla emulsificação desenvolvidas não exibiram liberação de explosão, indicando que os compostos fenólicos foram integrados ao polímero matriz e não apenas adsorvidos na superfície da partícula. Enquanto as nanopartículas obtidas por nanoprecipitação, houve a liberação de fenólicos mesmo em pH inferiores (31,2%), o que pode estar atribuído ao não aprisionamento dos fenólicos adsorvidos na superfície das nanopartículas. Além disso, a liberação do Pluronic F-127 ligado a superfície das moléculas podem ter ocasionado essa liberação inicial, da mesma forma que ao comparar a concentração final do polímero presente no método por nanoprecipitação é 4 vezes menor do que comparada por dupla emulsificação, o que pode ter ocasionado a saturação dos grupos amônios,

proporcionando hidrofiliçidade dos sistemas preparados, o que aumenta a natureza dissolutiva (Friedman; Jürgens, 2000).

Por fim, na última etapa do ensaio, os resultados revelaram que após 12h, a porcentagem cumulativa dos compostos fenólicos liberados foi significativamente menor ($p < 0,05$) das formulações selecionadas do que no extrato aquoso simples. Com 12h de experimento, 68,3% dos fenólicos foram liberados por dupla emulsificação, enquanto por nanoprecipitação 89,42% dos fenólicos já haviam sido liberados. As nanopartículas por dupla emulsificação mantiveram a liberação sustentada, finalizando o ensaio com 99,8% dos compostos liberados em 48h, por nanoprecipitação obteve 99,98% as 36h, enquanto a solução atingiu 100% em 8h.

Figura 59- Estudo de liberação *in vitro* das nanopartículas e do extrato de *Morus nigra* L.



Legenda: NANO=nanopartículas pelo método da nanoprecipitação; AOA= nanopartículas pelo método da dupla emulsificação; Extrato: solução do extrato de *Morus nigra* L.

Então, para avaliar o perfil de liberação dos compostos fenólicos a partir das nanopartículas poliméricas, se houve modulação da liberação, foram testados vários modelos cinéticos para determinar qual corresponde ao perfil apresentado pela nanopartícula e pela solução. Entre todos os modelos testados pelo software (primeira ordem, Higuchi, Korsmeyer–Peppas, Peppas-Sahlim, Hixson Crowell) como demonstrado na tabela 36. O coeficiente de determinação ajustado (R^2), o desvio padrão

dos resíduos (MSE) e o critério de seleção do modelo (MSC) foram utilizados para escolher o melhor modelo que se ajusta os dados. O R^2 foi utilizado para comparar o ajuste dos modelos teóricos com os dados experimentais, quanto mais próximo de 1 for o R^2 , melhor será o ajuste do modelo para os dados. O MSE é uma medida estatística do erro médio quadrático entre os valores observados e os valores previstos pelo modelo. (Freire *et al.*, 2017; Heredia *et al.*, 2022; Moroney; Vynnycky, 2021). É calculado como a média dos quadrados das diferenças entre os valores observados e os valores previstos. Quanto menor o valor do MSE, melhor é o ajuste do modelo aos dados experimentais. Já o MSC é uma medida semelhante ao MSE, mas é calculado considerando as diferenças entre as curvas ajustadas pelo modelo e as curvas correspondentes aos dados experimentais. O MSC é calculado como a média dos quadrados dessas diferenças. Um valor baixo de MSC indica um bom ajuste do modelo às curvas dos dados experimentais.

Segundo os critérios adotados para escolha do modelo a ser empregado, o modelo de primeira ordem com ($R^2 = 0,99$; MSE = 3,24; MSC = 4,33) foi o melhor ajustado para a solução do extrato aquoso de *Morus nigra* L. No contexto de sistemas de liberação, a cinética de primeira ordem descreve a taxa de liberação de uma substância a partir do sistema ao longo do tempo, em que a taxa de liberação diminui exponencialmente. Isso significa que a quantidade de substância liberada por unidade de tempo diminui à medida que o tempo decorre, denotando a ocorrência do mecanismo de transporte por difusão Fickiana, a qual ocorre por um gradiente de concentração entre o meio doador e receptor, tendendo a atingir um equilíbrio, característica de uma difusão normal mais relacionado às Já as nanopartículas a partir da dupla emulsificação ($R^2=0,94$; MSE=8,15; MSC=2,15) e nanoprecipitação ($R^2=0,82$; MSE=11,03; MSC=1,45) apresentaram melhor ajuste para o modelo de Weibull, o que difere do modelo encontrado para a solução com o extrato, indicando que o sistema foi capaz de modificar a cinética de liberação dos compostos fenólicos (Turanlı; Acartürk, 2022a).

O modelo Weibull é um modelo empírico que é usado para descrever a distribuição de fármacos do tipo matriz. Um parâmetro de forma, β , é usado na equação de Weibull para caracterizar a forma da curva de liberação. Os valores de β abaixo de 0,75 indicam que a liberação do fármaco é controlada pelo mecanismo de difusão, enquanto os valores de β na faixa de 0,75 a 1,0 indicam que outro mecanismo contribui para o mecanismo de difusão. Em particular, o parâmetro β também caracteriza a forma da curva, onde $\beta > 1,0$ é um perfil sigmoidal, β igual a 1,0 é um perfil exponencial e $\beta < 1,0$ é uma

curva parabólica. Essa dependência entre o valor β e a forma da curva pode ser útil na aplicação do modelo para descrever as curvas do perfil de liberação e elucidar o mecanismo de liberação.

Na nanoprecipitação, o parâmetro de forma, β , foi menor que 1, o que caracteriza a curva como parabólica, com maior inclinação inicial e depois consistente com a exponencial. Já a dupla emulsificação obteve valores de $\beta > 1,0$, característicos da curva sigmoidal. Isso implica que a distribuição Weibull é um modelo flexível com grande potencial para ser ajustado a uma variedade de padrões de liberação.

Embora Weibull não negligencie a alteração na taxa de liberação entre fases consecutivas de um único padrão de liberação, ele neutraliza o efeito dessas mudanças no modelo calculando seus exponenciais. Esses achados, corroboram com estudos anteriores (Turanlı; Acartürk, 2022a).

Para estabelecer uma correlação entre os valores de β e o mecanismo de liberação aplicada, considerando partículas com morfologia esférica, os valores de 0,56 correspondem liberação fickiana, $0,56 < \beta < 1,08$ transporte anômalo, 1,08 para o transporte de caso I e $\beta > 1,08$ para transporte de super caso II. (Martín-Camacho *et al.*, 2023). Desta forma, considerando os valores apresentados na tabela, para nanoprecipitação foi caracterizado uma liberação anômala ou não-Fickiano, onde ocorre a superposição dos dois fenômenos, com a liberação controlada pela difusão e intumescimento, simultaneamente. Já para dupla emulsificação o mecanismo de liberação obtido foi o transporte de super caso II, no qual ocorre a contribuição simultânea de processos como difusão, intumescimento, relaxação e erosão da matriz polimérica.

Em resumo, as diferenças observadas nos mecanismos de liberação entre a nanoprecipitação e a dupla emulsificação por evaporação do solvente podem ser atribuídas a uma combinação de fatores relacionados à estrutura das nanopartículas, propriedades do polímero e processo de preparação matriz polimérica em uma nanopartícula pode ser afetada por vários fatores, como temperatura, pH, interações poliméricas e forças de empacotamento. Esses fatores podem levar a alterações na estrutura e flexibilidade da matriz polimérica, afetando o relaxamento da matriz e, conseqüentemente, a liberação do fármaco. Quanto à difusão, compostos hidrossolúveis tem tendência em se difundir para fase aquosa externa por afinidade, portanto a difusão pode ocorrer através dos poros ou espaços na matriz polimérica, por difusão intersticial entre as cadeias poliméricas ou por degradação ou erosão controlada (Chokshi; Khatri; Patel, 2018; Patel; Mundada; Sawant, 2019).

Em resumo, as diferenças observadas nos mecanismos de liberação entre a nanoprecipitação e a dupla emulsificação por evaporação do solvente podem ser atribuídas a uma combinação de fatores relacionados à estrutura das nanopartículas, propriedades do polímero e processo de preparação matriz polimérica em uma nanopartícula pode ser afetada por vários fatores, como temperatura, pH, interações poliméricas e forças de empacotamento. Esses fatores podem levar a alterações na estrutura e flexibilidade da matriz polimérica, afetando o relaxamento da matriz e, conseqüentemente, a liberação do fármaco. Quanto à difusão, compostos hidrossolúveis tem tendência em se difundir para fase aquosa externa por afinidade, portanto a difusão pode ocorrer através dos poros ou espaços na matriz polimérica, por difusão intersticial entre as cadeias poliméricas ou por degradação ou erosão controlada (Chokshi; Khatri; Patel, 2018; Patel; Mundada; Sawant, 2019).

Por conseguinte, as nanopartículas obtidas pelo método da dupla emulsificação registraram um maior controle na liberação dos compostos fenólicos, comparada com a nanoprecipitação, principalmente no intervalo entre 2h-24h. Sendo assim, foi a formulação selecionada devido à sua capacidade de proporcionar uma liberação mais regulada dos compostos fenólicos, indicando um controle mais preciso do processo.

Um segundo ensaio, após o processo de liofilização do sistema, foi realizado o ensaio de liberação das nanopartículas obtidas pelo método de dupla emulsificação a partir do líofilo, o qual seguiu as mesmas condições e parâmetros da liberação anterior. A Figura 60 mostra o gráfico de liberação cumulativa do extrato a partir da solução e das nanopartículas liofilizadas.

Tabela 37- Modelos cinéticos obtidos a partir da liberação in vitro

(continua)

<i>Formulação</i>	<i>Modelo cinético</i>	<i>Equação</i>	<i>R²</i>	<i>MSE</i>	<i>MSC</i>	<i>Constantes</i>
Extrato	Primeira Ordem	$F=100*[1-\text{Exp}(k_1*t)]$	0,99	3,24	4,33	$k_1= 0,05$
	Higuchi	$F=k_H*t^{0,5}$	0,96	6,01	3,10	$k_H = 13,20$
	Korsmeyer–Peppas	$F= k_{KP}*t^n$	0,86	11,57	1,71	$k_{KP}= 3,50$ $n= 0,9$
	Peppas-Sahlin	$F=k_1*t^m + k_2*t^{2m}$	0,94	5,76	3,05	$k_1 = 9,69$ $k_2 = 1,33$ $m = 0,45$
	Hixson-Crowell	$F=100*[1-(1k_{HC}*t)^3]$	0,96	5,76	3,05	$K_{HC}=0,013$
	Weibull	$F=100* \{1-\text{Exp}[-(t^\beta)/\alpha]\}$	0,97	5,01	3,05	$\alpha=4,57$ $\beta= 1,13$
	Zero ordem	$F=k_0*t$	0,46	26,00	-0,06	$k_0=2,78$
Nanopartículas por dupla emulsificação	Primeira Ordem	$F=100*[1\text{Exp}(k_1*t)]$	0,80	15,63	0,92	$k_1=0,15$
	Higuchi	$F= k_H*t^{0,5}$	0,84	13,87	1,16	$k_H = 16,60$
	Korsmeyer–Peppas	$F=F_0+k_{KP}*t^n$	0,81	15,37	0,88	$k_{KP}= 15,29$ $n= 0,54$

Legenda: R^2 = coeficiente de correlação; MSE = Desvio padrão dos resíduos; MSC = É o erro médio quadrático entre as curvas ajustadas pelo modelo e as curvas correspondentes aos dados experimentais.; K = são as constantes de difusão características do modelo; t = tempo; n expoente de liberação ou o parâmetro de difusão; m=direcionamento do tipo de difusão. F_0 = é a fração inicial do medicamento na solução resultante de uma liberação de explosão;

Tabela 36- Modelos cinéticos obtidos a partir da liberação *in vitro*.

(continuação)

Formulação	Modelo cinético	Equação	R²	MSE	MSC	Constantes
Nanopartículas por dupla emulsificação	Peppas-Sahlin	$F=k_1*t^m + k_2*t^{2m}$	0,77	16,84	0,63	$k_1 = 22,30$ $k_2 = -0,71$ $m = 0,45$
	Hixson-Crowell	$F=100*[1-(1k_{HC}*t)^3]$	0,92	9,75	1,87	$K_{HC} = 0,03$
	Weibull	$F=100*\{1-Exp[-(t^\beta)/\alpha]\}$	0,94	8,15	2,15	$\alpha=14,6$ $\beta= 1,18$
Nanopartículas por nanoprecipitação	Primeira Ordem	$F=100*[1-Exp(k_1*t)]$	0,79	11,82	1,40	$k_1=0,34$
	Higuchi	$F= k_H*t^{0,5}$	-0,24	29,42	-0,41	$k_H = 21,74$
	Korsmeyer–Peppas	$F=F_0+k_{KP}*t^n$	0,64	15,70	0,75	$k_{KP}= 41,72$ $n= 0,34$
	Hixson-Crowell	$F=100*[1-(1k_{HC}*t)^3]$	0,14	24,4	-0,04	$K_{HC} = 0,075$

Legenda: R² = coeficiente de correlação; MSE = Desvio padrão dos resíduos; MSC = É o erro médio quadrático entre as curvas ajustadas pelo modelo e as curvas correspondentes aos dados experimentais.; K = são as constantes de difusão características do modelo; t = tempo; n expoente de liberação ou o parâmetro de difusão; m=direcionamento do tipo de difusão. F₀ = é a fração inicial do medicamento na solução resultante de uma liberação de explosão;

Fonte: dados da pesquisa

Tabela 36- Modelos cinéticos obtidos a partir da liberação *in vitro*.

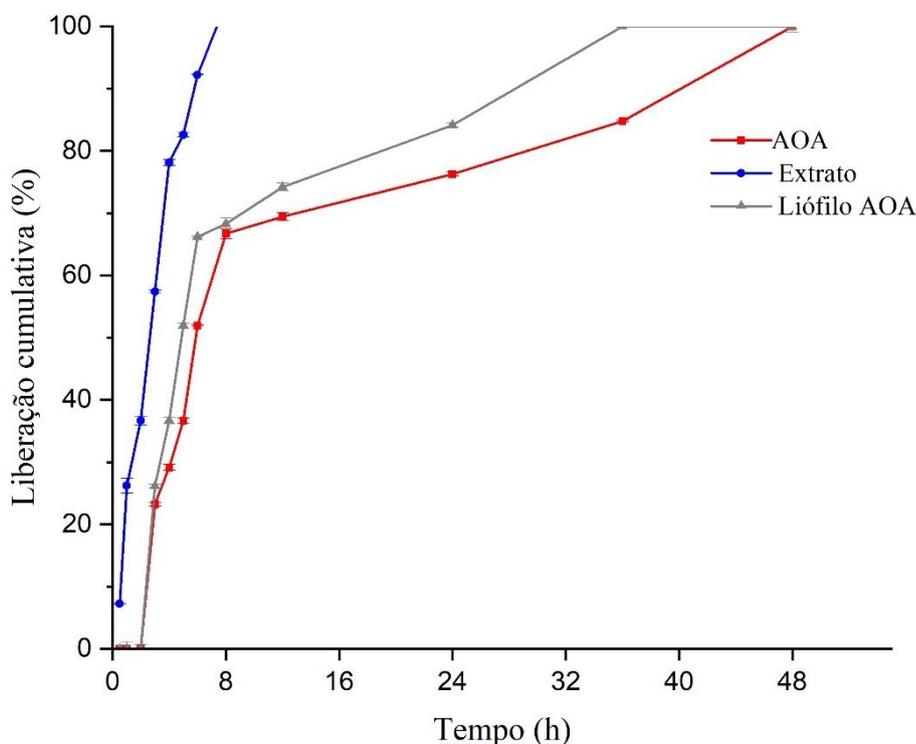
(conclusão)

<i>Formulação</i>	<i>Modelo cinético</i>	<i>Equação</i>	<i>R²</i>	<i>MSE</i>	<i>MSC</i>	<i>Constantes</i>
Nanopartículas por nanoprecipitação	Peppas-Sahlin	$F=k_1 \cdot tm + k_2 \cdot t^2m$	0,78	12,12	1,20	k1 = 52,21 k2 = -6,65 m = 0,45
	Weibull	$F=100 \cdot \{1 - \text{Exp}[-(t^\beta)/\alpha]\}$	0,82	11,03	1,45	$\alpha=1,99$ $\beta=0,82$
Nanopartículas liofilizadas	Primeira ordem	$F=100 \cdot [1 - \text{Exp}(k_1 \cdot t)]$	0,82	14,93	0,98	k1 = 0,15
	Higuchi	$F= k_H \cdot t^{0,5}$	0,84	13,88	1,13	k _H = 16,67
	Korsmeyer–Peppas	$F=F_0+k_{KP} \cdot tn$	0,81	15,15	0,88	k _{KP} = 16,88 n = 0,51
	Peppas-Sahlin	$F=k_1 \cdot tm + k_2 \cdot t^2m$	0,77	16,83	0,61	k1 = 23,15 k2 = -0,87 m = 0,45
	Hixson-Crowell	$F=100 \cdot [1 - (1 - k_{HC} \cdot t)^3]$	0,92	9,5	1,89	K _{HC} = 0,03
	Weibull	$F=100 \cdot \{1 - \text{Exp}[-(t^\beta)/\alpha]\}$	0,94	8,05	2,14	$\alpha=13,08$ $\beta=1,15$

Legenda: R² = coeficiente de correlação; MSE = Desvio padrão dos resíduos; MSC = É o erro médio quadrático entre as curvas ajustadas pelo modelo e as curvas correspondentes aos dados experimentais.; K = são as constantes de difusão características do modelo; t = tempo; n expoente de liberação ou o parâmetro de difusão; m = direcionamento do tipo de difusão. F₀ = é a fração inicial do medicamento na solução resultante de uma liberação de explosão;

Através do gráfico pode-se perceber que as nanopartículas liofilizadas demonstraram um comportamento semelhante NPMn em dispersão, embora o carreador liofilizado tem alcançado uma liberação de quantidade maiores dos compostos fenólicos ao longo do estudo. Durante o estágio em meio gástrico simulado (pH 1,2), onde ao final de 2h a quantidade de compostos fenólicos liberada pela solução foi de 36,69%, enquanto a quantidade liberada pelo líófilo foi de 0%. Resultado já era esperado e converge com a liberação do ensaio anterior. Na etapa em meio intestinal simulado, houve uma liberação mais lenta e sustentada dos compostos fenólicos do líófilo, sendo liberado apenas 29% durante as 4h de duração, alcançando um total de 99,98% de fenólicos liberados, em contraste com a solução que liberou 78% nesse intervalo, alcançando 100% de liberação ao final de 8h.

Figura 60- Estudo de liberação *in vitro* das nanopartículas liofilizadas e do extrato de *Morus nigra* L



Fonte: Dados da pesquisa

Após esse período, observou-se um aumento na liberação dos compostos comparado ao de dispersão. Esse fenômeno pode ser atribuído à presença do crioprotetor nas nanopartículas. O crioprotetor é adicionado com o objetivo de proteger a estrutura das

nanopartículas durante o processo de liofilização. Sua característica hidrofílica confere-lhe afinidade pela água. Ao ser adicionado à formulação das nanopartículas, o crioprotetor se distribui ao redor das partículas, formando uma camada protetora. Essa camada atua como uma barreira, impedindo a formação de grandes cristais de gelo que poderiam danificar as nanopartículas. Porém, a presença do crioprotetor nas interfaces das nanopartículas facilita a difusão do fármaco contido dentro delas para o meio circundante. Ainda assim, a liofilização ainda manteve um perfil de liberação prolongado, de pelo menos 48h.

Além disso, a partir do estudo do modelo cinético aplicado as nanopartículas liofilizadas foi possível observar que mesmo na presença do crioprotetor, o modelo cinético de liberação das nanopartículas liofilizadas permanece inalterado (Weibull) em comparação com as nanopartículas não liofilizadas, denotando valores de $\alpha=13,08$ e $\beta=1,15$, promovendo a liberação através do transporte de super caso II.

Weibull é utilizado para a investigação de dados de liberação imediata e prolongada, pois é um modelo empírico. Muitos estudos demonstraram experimentalmente que os dados de liberação de nanopartículas poliméricas se ajustam melhor ao modelo Weibull, dentre elas, nanopartículas produzidas pelo mesmo tipo polímero (Eudragit® RL100). Desta forma, a consistência dos dados e a validade do método adotado, corrobora com os achados prévios na literatura (Ashrafi; Azadi, 2016; Jafari-Aghdam *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2015; Turanlı; Acartürk, 2022b).

5.2.3.4.6.3 Citotoxicidade *in vitro*

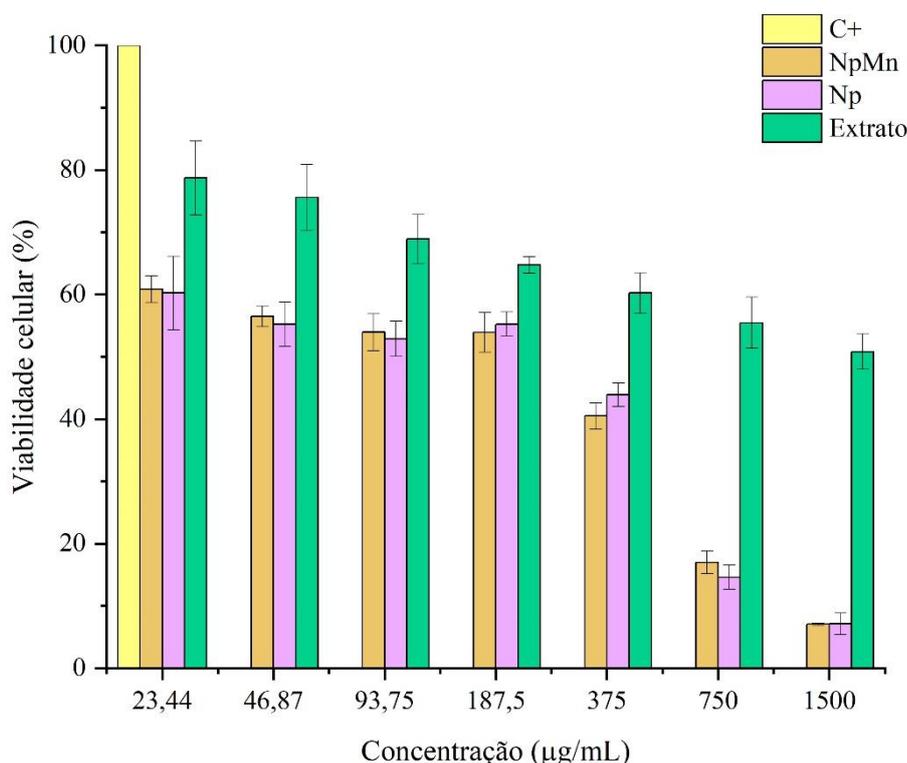
Ao desenvolver novas formulações, é essencial realizar testes para avaliar a biocompatibilidade e a segurança. Seguindo as normas da Organização Internacional de Normalização (ISO), os ensaios *in vitro* são a fase inicial na determinação da biocompatibilidade de um material (Iso, 2009). Assim, foi conduzido um ensaio de citotoxicidade por meio de cultura celular, escolhido pela sua reprodutibilidade, rapidez, sensibilidade e custo acessível.

Desta forma, a viabilidade foi expressa em porcentagem em comparação com o controle não tratado no ensaio MTT. E o CC50 dos isolados foram obtidos utilizando curva de regressão não-linear. Os resultados demonstraram que a viabilidade não foi alterada de maneira significativa ($p>0,05$) quando estes foram expostos ao aumento da concentração do extrato, porém mantendo-se percentuais de viabilidade celular acima de

50%, mesmo na maior concentração (1500 $\mu\text{g/mL}$). As nanopartículas apresentaram CC50 de 180,16 $\mu\text{g/mL}$ para a nanopartícula com extrato (NPMn) e 145,78 $\mu\text{g/mL}$ para as nanopartículas brancas (NP branca). A figura 61 mostra as variações de citotoxicidade dos compostos nas diferentes concentrações testadas.

De acordo com a ISO 10993-5, é determinado como citotóxico um produto que iniba o crescimento celular em mais de 30% (Iso, 2009). Sendo assim, os resultados demonstraram que o extrato em solução é citotóxico para as células endoteliais até 93,75 $\mu\text{g/mL}$

Figura 61- Gráfico de viabilidade celular em HUVEC do extrato e das nanopartículas.



Legenda: C+= controle positivo; NpMn= nanopartícula com o extrato; Np= nanopartícula sem o extrato

Enquanto as nanopartículas foram consideradas citotóxicas em todas as concentrações, sendo o NPMn menos citotóxico, ou seja, a presença do extrato nas nanopartículas teve um efeito positivo nas células HUVEC, já que a CC50 aumentou de 145,78 para 180,16 $\mu\text{g/mL}$. Isso sugere uma maior concentração necessária para causar efeitos citotóxicos, indicando um possível benefício para viabilidade celular com a incorporação do extrato.

Esse aumento citotóxico das NP brancas pode ter facilitado a internalização e a sua interação com as células devido seu tamanho, reduzido e alta área superficial, característica essa já conhecida das nanopartículas. Da mesma forma, devido a presença do tensoativo Pluronic F-127 na formulação, pode ser uma justificativa para o aparecimento da citotoxicidade das nanopartículas em concentrações mais altas, visto que já se tem relatos na literatura que ele atua inibindo diretamente as bombas de efluxo de fármacos e a de glicoproteína P por incorporação nas membranas celulares e translocação nas células, influenciando a respiração celular, produção de ATP, transdução de sinais apoptóticos e expressão gênica.

Comparados com outras pesquisas que estudaram os perfis de viabilidade celular de nanopartículas também foi observado que nanopartículas carregadas positivamente têm maior eficiência na absorção celular, como demonstrado por maior citotoxicidade em células HUVEC comparadas às partículas com carga negativa. A carga superficial das nanopartículas desempenha um papel crítico, afetando interações com proteínas séricas e reduzindo toxicidade através do "efeito corona" (Harush-Frenkel *et al.*, 2007; Hühn *et al.*, 2013; Wigner *et al.*, 2021).

Entretanto, esses resultados sugerem um potencial de segurança e destacam a possibilidade de usar concentrações mais baixas para aplicações que requerem menor toxicidade em células HUVEC.

5.2.4 Considerações Finais

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que o planejamento experimental foi bem-sucedido, levando ao desenvolvimento de NPs com características físico-químicas adequadas. A análise revelou que essas nanopartículas possuem um tamanho e distribuição homogêneos, um potencial zeta e pH adequados para serem utilizados como nanocarreadores para administração oral.

Além disso, outras técnicas de caracterização confirmaram a incorporação eficiente do fármaco na estrutura das nanopartículas, garantindo um bom encapsulamento de compostos fenólicos e reduzindo o extravasamento do fármaco ao longo do período de armazenamento. Essas características são fundamentais para garantir a estabilidade e eficácia do sistema de entrega oral.

Uma descoberta importante foi a capacidade das nanopartículas de proporcionar uma liberação prolongada dos compostos fenólicos em ensaios simulando a

administração oral, com uma duração de pelo menos 48 horas, em contraste com o extrato puro que apresentou apenas 8 horas de liberação, mesmo quando liofilizadas com o crioprotetor de escolha (maltodextrina). Essa liberação prolongada é extremamente promissora, pois permitiria uma melhor absorção e aproveitamento dos compostos fenólicos pelo organismo. De acordo com nossas descobertas, a formulação pode inibir a liberação intensa no estômago, promovendo liberação prolongada no pH mais básico.

Além disso, o aumento da CC50 quando essa formulação foi submetida as células HUVEC, foram menos afetadas pelo extrato quando este estava encapsulado em nanopartículas, em comparação com a forma livre do extrato.

Diante desses resultados, pode-se inferir que as nanopartículas produzidas têm potencial para serem utilizadas como um sistema de entrega oral de liberação prolongada. No entanto, é necessário realizar estudos de farmacocinética *in vivo* para comprovar a possibilidade de melhoria da permeabilidade intestinal e absorção oral quando administradas em animais ou humanos.

A próxima etapa seria incorporar essas nanopartículas em formas farmacêuticas sólidas orais, para testar sua atividade e toxicidade em modelos experimentais. Somente após esses estudos adicionais, será possível avaliar plenamente o potencial terapêutico e a segurança dessas nanopartículas como um sistema de entrega oral eficaz para compostos fenólicos. Em última análise, essas descobertas podem abrir novas perspectivas para o tratamento de doenças e aprimorar a eficácia dos compostos fenólicos como princípios ativos farmacêuticos.

6. CONCLUSÃO

A partir dos resultados é possível inferir que o planejamento experimental utilizado para selecionar a matéria prima vegetal que seria utilizada, a partir da maximização dos compostos majoritários, foi realizado com sucesso. Utilizando o planejamento fatorial fracionado, foi possível determinar as condições ótimas de extração, sendo assim, os extratos da Paraíba apresentaram uma maior concentração de compostos fenólicos totais e uma maior atividade antioxidante em comparação ao extrato de Pernambuco, sugerindo que a planta utilizada na Paraíba possui uma composição química mais rica em compostos fenólicos com propriedades antioxidantes significativas.

A determinação cuidadosa das condições de extração e a seleção criteriosa da matéria-prima não só influenciou na composição química, mas também garantiu a consistência e a uniformidade do produto final, principalmente quando incorporado a formulações nanométricas. O tamanho, a distribuição homogênea, potencial zeta e eficiência de encapsulação mostraram-se adequados para nanopartículas que visam administração oral. Outras técnicas de caracterização evidenciaram a efetiva incorporação do fármaco nas nanopartículas, validando a obtenção de nanopartícula com matriz polimérica. Esta matriz favoreceu o adequado encapsulamento dos compostos fenólicos, proporcionando uma menor propensão ao extravasamento do fármaco ao longo do período de 48 horas.

De fato, a matriz demonstrou uma notável capacidade de manter os parâmetros físico-químicos da formulação consistentes ao longo do tempo, mantendo suas características mesmo após a liofilização com o crioprotetor maltodextrina. O ensaio de viabilidade celular permitiu conhecer concentrações citotóxicas da formulação e do extrato. E devido ao fato das nanopartículas propiciarem uma liberação controlada do extrato, pode ter reduzido sua toxicidade quando estas incorporadas ao extrato e aumentando sua segurança para possíveis aplicações terapêuticas.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

- Realização de ensaios de toxicidade aguda *in vivo* em camundongos;
- Realização de ensaio de atividade *in vitro*;
- Realização de ensaio de farmacocinética *in vivo* em ratos para avaliação de biodisponibilidade relativa
- Obter formas farmacêuticas sólidas orais;
- Determinar a estabilidade acelerada e de longa duração.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, Nazar *et al.* Targeted delivery of aspirin and metformin to colorectal cancer using disulfide bridged nanoparticles of thiolated pectin and thiolated Eudragit RL100. **Materials Today Communications**, [s. l.], v. 35, n. February, p. 105586, 2023.
- ABDEL BAR, Fatma M. *et al.* Antiproliferative activity of stilbene derivatives and other constituents from the stem bark of *Morus nigra* L. **Natural Product Research**, [s. l.], v. 0, n. 0, p. 1–8, 2019.
- ABDEL GHAFAR, Muhammad Tarek. An overview of the classical and tissue-derived renin-angiotensin-aldosterone system and its genetic polymorphisms in essential hypertension. **Steroids**, [s. l.], v. 163, n. February, p. 108701, 2020.
- ABI-KHATTAR, Anna-Maria *et al.* Intensification of Polyphenol Extraction from Olive Leaves Using Ired-Irrad®, an Environmentally- Friendly Innovative Technology Anna-Maria. **antioxidants Article**, [s. l.], v. 8, p. 1–16, 2020.
- ABU BAKAR, Izza Nadira *et al.* Characterization of asiaticoside concentration, total phenolic compounds, and antioxidant activity of different varieties of *Centella asiatica* (L.) and essential oil extraction using hydro-distillation with enzyme assisted. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, [s. l.], v. 44, n. June, p. 102474, 2022.
- ADAN, Aysun; KIRAZ, Yağmur; BARAN, Yusuf. Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Current Biotechnology Pharmaceutical**, [s. l.], v. 17, n. 14, p. 1873–4316, 2016.
- ADIANA, M. A.; MAZURA, M. P. Study on *Senna alata* and its different extracts by Fourier transform infrared spectroscopy and two-dimensional correlation infrared spectroscopy. **Journal of Molecular Structure**, [s. l.], v. 991, n. 1–3, p. 84–91, 2011.
- AHMED A *et al.* Anticancer activity of *Morus nigra* on human breast cancer cell line (MCF-7): the role of fresh and dry fruit extracts. **Journal of Bioscience and Applied Research**, [s. l.], v. 2, n. 6, p. 2356–9174, 2016.
- AKHLAQ, Anam *et al.* The Prokinetic, Laxative, and Antidiarrheal Effects of *Morus nigra*: Possible Muscarinic, Ca²⁺ Channel Blocking, and Antimuscarinic Mechanisms. **Phytotherapy Research**, [s. l.], v. 30, n. 8, p. 1362–1376, 2016.
- AKKOL, Esra Küpeli *et al.* Bioassay-Guided Isolation and Characterization of Wound Healer Compounds from *Morus nigra* L. (Moraceae). **Records of Natural Products**, [s. l.], v. 9, n. 4, p. 484–495, 2015.
- ALAM, Tausif *et al.* Nanocarriers as treatment modalities for hypertension. **Drug Delivery**, [s. l.], v. 24, n. 1, p. 358–369, 2017.
- ALAMGIR, A. N.M. Biotechnology, in vitro production of natural bioactive compounds, herbal preparation, and disease management (treatment and prevention). **Progress in Drug Research**, [s. l.], v. 74, p. 585–664, 2018.

ALENAZI, Ahmed S.M. *et al.* Design of polymeric nanoparticles for oral delivery of capreomycin peptide using double emulsion technique: Impact of stress conditions. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, [s. l.], v. 71, n. April, p. 103326, 2022.

AL-QUSHAWI, Alwan *et al.* **Preparation and Characterization of Three Tilmicosin-loaded Lipid Nanoparticles: Physicochemical Properties and in-vitro Antibacterial Activities** Shaheed Beheshti University of Medical Sciences and Health Services **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**. [S. l.: s. n.], 2016.

ALSEEKH, Saleh *et al.* The style and substance of plant flavonoid decoration; towards defining both structure and function. **Phytochemistry**, [s. l.], v. 174, n. July 2019, 2020.

ANDREANI, Tatiana *et al.* Effect of cryoprotectants on the reconstitution of silica nanoparticles produced by sol-gel technology. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, [s. l.], v. 120, n. 1, p. 1001–1007, 2015.

ANGHEL, Ion *et al.* Magnetite nanoparticles for functionalized textile dressing to prevent fungal biofilms development. **Nanoscale Research Letters**, [s. l.], v. 7, 2012.

ARAUJO, Carolina Morais *et al.* Morus nigra leaf extract improves glycemic response and redox profile in the liver of diabetic rats. **Food and Function**, [s. l.], v. 6, n. 11, p. 3490–3499, 2015.

ARNOLD, W. P. *et al.* Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 74, n. 8, p. 3203–3207, 1977.

ARULSELVAN, Palanisamy *et al.* Role of Antioxidants and Natural Products in Inflammation. **Oxidative medicine and cellular longevity**, [s. l.], v. 2016, p. 5276130, 2016.

ARVANITI, Olga S *et al.* Review on fresh and dried figs: Chemical analysis and occurrence of phytochemical compounds, antioxidant capacity and health effects. **Food Research International**, [s. l.], v. 119, n. January, p. 244–267, 2019.

ASHRAFI, Hajar; AZADI, Amir. Chitosan-based hydrogel nanoparticle amazing behaviors during transmission electron microscopy. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 84, p. 31–34, 2016.

ASMAT, Ullah; ABAD, Khan; ISMAIL, Khan. Diabetes mellitus and oxidative stress—A concise review. **Saudi Pharmaceutical Journal**, [s. l.], v. 24, n. 5, p. 547–553, 2016.

ATANU, Francis O. *et al.* Evaluation of chemical composition, in vitro antioxidant, and antidiabetic activities of solvent extracts of Irvingia gabonensis leaves. **Heliyon**, [s. l.], v. 8, n. 7, p. e09922, 2022.

AULIFA, Diah Lia *et al.* Phytochemical screening, antibacterial activity, and mode of action on morus nigra. **Pharmacognosy Journal**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 167–171, 2018.

AYDIN, Sevinç; YILMAZ, Ökkeş; GÖKÇE, Zehra. Protective Effect of *Morus nigra* L. (Mulberry) Fruit Extract on the Liver Fatty Acid Profile of Wistar Rats. **Pakistan Journal of Zoology**, [s. l.], v. 47, n. 1, p. 255–261, 2015.

BACCARIN, Thaisa *et al.* Análise morfoanatômica das partes aéreas de *Wedelia paludosa* DC. (*Acmela brasiliensis*, *Sphagneticola trilobata*), Asteraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s. l.], v. 19, n. May 2008, p. 612–616, 2009.

BADAWY, Mohamed E.I. *et al.* Optimization and characterization of the formation of oil-in-water diazinon nanoemulsions: Modeling and influence of the oil phase, surfactant and sonication. **Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, [s. l.], v. 52, n. 12, p. 896–911, 2017.

BANIK, Brittany L.; FATTAHI, Pouria; BROWN, Justin L. Polymeric nanoparticles: The future of nanomedicine. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, [s. l.], v. 8, n. 2, p. 271–299, 2016.

BASTOGNE, Thierry. Quality-by-design of nanopharmaceuticals – a state of the art. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, [s. l.], v. 13, n. 7, p. 2151–2157, 2017.

BATISTA, Marcos Adriano Carlos *et al.* Salt-dependent hypertension and inflammation: targeting the gut–brain axis and the immune system with Brazilian green propolis. **Inflammopharmacology**, [s. l.], v. 28, n. 5, p. 1163–1182, 2020.

BATTAGLIA, Luigi; GALLARATE, Marina. Lipid nanoparticles: State of the art, new preparation methods and challenges in drug delivery. **Expert Opinion on Drug Delivery**, [s. l.], v. 9, n. 5, p. 497–508, 2012.

BELAY, Abebe; GHOLAP, a. V. Characterization and determination of chlorogenic acids (CGA) in coffee beans by UV-Vis spectroscopy. **African Journal of Pure and Applied Chemistry**, [s. l.], v. 3, n. 11, p. 234–240, 2009.

BELWAL, Tarun *et al.* A critical analysis of extraction techniques used for botanicals: Trends, priorities, industrial uses and optimization strategies. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 100, p. 82–102, 2018.

BERNAL-CHÁVEZ, Sergio A. *et al.* Insights into terminal sterilization processes of nanoparticles for biomedical applications. **Molecules**, [s. l.], v. 26, n. 7, p. 1–20, 2021.

BHATTACHARJEE, Sourav. DLS and zeta potential - What they are and what they are not?. **Journal of Controlled Release**, [s. l.], v. 235, p. 337–351, 2016.

BIAN, Ka; MURAD, Ferid. What is next in nitric oxide research? from cardiovascular system to cancer biology. **Nitric Oxide - Biology and Chemistry**, [s. l.], v. 43, p. 3–7, 2014.

BILATI, Ugo; ALLÉMANN, Eric; DOELKER, Eric. Development of a nanoprecipitation method intended for the entrapment of hydrophilic drugs into nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 24, n. 1, p. 67–75, 2005.

BINDES, Marlon Menezes Maciel *et al.* Maximisation of the polyphenols extraction yield from green tea leaves and sequential clarification. **Journal of Food Engineering**, [s. l.], v. 241, n. May 2018, p. 97–104, 2019.

BISWAS, Subrata Kumar. Does the Interdependence between Oxidative Stress and Inflammation Explain the Antioxidant Paradox?. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [s. l.], v. 2016, p. 5698931, 2016.

BOHREY, Sarvesh; CHOURASIYA, Vibha; PANDEY, Archana. Polymeric nanoparticles containing diazepam: Preparation, optimization, characterization, in-vitro drug release and release kinetic study. **Nano Convergence**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 3–9, 2016.

BOLÍVAR, Juan J. Essential hypertension: An approach to its etiology and neurogenic pathophysiology. **International Journal of Hypertension**, [s. l.], v. 2013, 2013.

BORGO, Jackson *et al.* Influência dos processos de secagem sobre o teor de flavonoides e na atividade antioxidante dos extratos de *Baccharis articulata* (Lam.) Pers., Asteraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 12–17, 2010.

BORISOV, Roman; KANATEVA, Anastasiia; ZHILYAEV, Dmitry. Recent Advances in Combinations of TLC With MALDI and Other Desorption/Ionization Mass-Spectrometry Techniques. **Frontiers in Chemistry**, [s. l.], v. 9, n. December, p. 1–12, 2021.

BOURQUE, Gabrielle; HIREMATH, Swapnil. Rethinking Resistant Hypertension. **Journal of Clinical Medicine**, [s. l.], v. 11, n. 5, 2022.

BRAR, Satinder K.; VERMA, M. Measurement of nanoparticles by light-scattering techniques. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, [s. l.], v. 30, n. 1, p. 4–17, 2011.

BRASIL. Farmacopeia Brasileira. **Farmacopeia Brasileira, 5ª edição**, [s. l.], v. 1, p. 1–523, 2023.

BROMFIELD, Samantha; MUNTNER, Paul. High blood pressure: The leading global burden of disease risk factor and the need for worldwide prevention programs. **Current Hypertension Reports**, [s. l.], v. 15, n. 3, p. 134–136, 2013.

BUDIMAN, Arif *et al.* Antibacterial and antioxidant activity of black mulberry (*Morus nigra* L.) extract for acne treatment. **Pharmacognosy Journal**, [s. l.], v. 9, n. 5, p. 611–614, 2017.

BUDIMAN, Arif *et al.* The formulation of lozenge using black mulberries (*Morus nigra* L.) leaf extract as an α -glucosidase inhibitor. **Journal of Pharmacy And Bioallied Sciences**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. 171, 2020.

BURGER, Dylan *et al.* Endothelial microparticle formation by angiotensin II is mediated via ang II receptor type I/NADPH Oxidase/rho kinase pathways targeted to lipid rafts. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, [s. l.], v. 31, n. 8, p. 1898–1907, 2011.

CAICEDO CHACON, Wilson Daniel *et al.* The mechanism, biopolymers and active compounds for the production of nanoparticles by anti-solvent precipitation: A review. **Food Research International**, [s. l.], v. 168, n. September 2022, 2023.

CARABAJAL, Maira *et al.* Applications of liquid-phase microextraction procedures to complex samples assisted by response surface methodology for optimization. **Microchemical Journal**, [s. l.], v. 152, n. August, p. 104436, 2020.

CARBONE, C. *et al.* Repurposing itraconazole to the benefit of skin cancer treatment: A combined azole-DDAB nanoencapsulation strategy. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], v. 167, p. 337–344, 2018.

CARVALHO, Patrícia M. *et al.* Application of light scattering techniques to nanoparticle characterization and development. **Frontiers in Chemistry**, [s. l.], v. 6, n. June, p. 1–17, 2018.

CHADHA, Renu; BHANDARI, Swati. Drug-excipient compatibility screening–Role of thermoanalytical and spectroscopic techniques. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [s. l.], v. 87, p. 82–97, 2014.

CHAVES, Jaísa Oliveira *et al.* Extraction of Flavonoids From Natural Sources Using Modern Techniques. **Frontiers in Chemistry**, [s. l.], v. 8, n. September, 2020.

CHEN, Hu *et al.* Anti-Inflammatory and Antinociceptive Properties of Flavonoids from the Fruits of Black Mulberry (*Morus nigra* L.). **PLOS ONE**, [s. l.], v. 11, n. 4, p. e0153080, 2016.

CHEN, Hu *et al.* Antinociceptive and antibacterial properties of anthocyanins and flavonols from fruits of black and non-black mulberries. **Molecules**, [s. l.], v. 23, n. 1, 2018.

CHEN, Liang Yu; CHENG, Chien Wei; LIANG, Ji Yuan. Effect of esterification condensation on the Folin-Ciocalteu method for the quantitative measurement of total phenols. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 170, p. 10–15, 2015.

CHIDAMBARAM, Moorthi; KRISHNASAMY, Kathiresan. Modifications to the conventional nanoprecipitation technique: An approach to fabricate narrow sized polymeric Nanoparticles. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, [s. l.], v. 4, n. 2, p. 205–208, 2014.

CHIU, Hock Ing *et al.* Cytotoxicity of targeted PLGA nanoparticles: a systematic review. **RSC Advances**, [s. l.], v. 11, n. 16, p. 9433–9449, 2021.

CHOKSHI, Nimitt V.; KHATRI, Hiren N.; PATEL, Mayur M. Formulation, optimization, and characterization of rifampicin-loaded solid lipid nanoparticles for the treatment of tuberculosis. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, [s. l.], v. 44, n. 12, p. 1975–1989, 2018.

CHRUSCINSKI, Andrzej J. *et al.* Targeted disruption of the β 2 adrenergic receptor gene. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 274, n. 24, p. 16694–16700, 1999.

CHUNG, Hye In *et al.* Acute intake of mulberry leaf aqueous extract affects postprandial glucose response after maltose loading: Randomized double-blind placebo-controlled pilot study. **Journal of Functional Foods**, [s. l.], v. 5, n. 3, p. 1502–1506, 2013.

COPUR, Sidar *et al.* A new immune disease: systemic hypertension. **Clinical Kidney Journal**, [s. l.], v. 0, n. 0, p. 1–17, 2023.

CRUCHO, Carina I.C.; BARROS, Maria Teresa. Polymeric nanoparticles: A study on the preparation variables and characterization methods. **Materials Science and Engineering C**, [s. l.], v. 80, p. 771–784, 2017.

DA CUNHA NASCIMENTO, Dahan *et al.* Blood pressure response to resistance training in hypertensive and normotensive older women. **Clinical Interventions in Aging**, [s. l.], v. 13, p. 541–553, 2018.

DALMAGRO, Ana Paula *et al.* Involvement of PI3K/Akt/GSK-3 β signaling pathway in the antidepressant-like and neuroprotective effects of *Morus nigra* and its major phenolic, syringic acid. **Chemico-Biological Interactions**, [s. l.], v. 314, n. August, p. 108843, 2019.

DALMAGRO, Ana Paula *et al.* Seasonal variation in the antioxidant phytochemicals production from the *Morus nigra* leaves. **Industrial Crops and Products**, [s. l.], v. 123, p. 323–330, 2018.

DALMAGRO, Ana Paula; CAMARGO, Anderson; ZENI, Ana Lúcia Bertarello. *Morus nigra* and its major phenolic, syringic acid, have antidepressant-like and neuroprotective effects in mice. **Metabolic Brain Disease**, [s. l.], v. 32, n. 6, p. 1963–1973, 2017a.

DALMAGRO, Ana Paula; CAMARGO, Anderson; ZENI, Ana Lúcia Bertarello. *Morus nigra* and its major phenolic, syringic acid, have antidepressant-like and neuroprotective effects in mice. **Metabolic Brain Disease**, [s. l.], v. 32, n. 6, p. 1963–1973, 2017b.

DANAIEI, M. *et al.* Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. **Pharmaceutics**, [s. l.], v. 10, n. 2, p. 1–17, 2018.

DAR, M. Junaid; DIN, Fakhar Ud; KHAN, Gul Majid. Sodium stibogluconate loaded nano-deformable liposomes for topical treatment of leishmaniasis: Macrophage as a target cell. **Drug Delivery**, [s. l.], v. 25, n. 1, p. 1595–1606, 2018.

DAS, Swarnali; SURESH, Preeti K.; DESMUKH, Rohitas. Design of Eudragit RL 100 nanoparticles by nanoprecipitation method for ocular drug delivery. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, [s. l.], v. 6, n. 2, p. 318–323, 2010.

DASGUPTA, A. *et al.* Soluble guanylate cyclase: A new therapeutic target for pulmonary arterial hypertension and chronic thromboembolic pulmonary hypertension. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, [s. l.], v. 97, n. 1, p. 88–102, 2015.

DAWOUD, Marwa H.S. *et al.* Insulin Mucoadhesive Liposomal Gel for Wound Healing: a Formulation with Sustained Release and Extended Stability Using Quality by Design Approach. **AAPS PharmSciTech**, [s. l.], v. 20, n. 4, p. 1–15, 2019.

DE CONTO, Daniela *et al.* Swelling of biodegradable polymers for the production of nanocapsules and films with the incorporation of essential oils. **Polymer Bulletin**, [s. l.], 2020.

DE FREITAS, Marcela Medeiros *et al.* Extracts of *Morus nigra* L. Leaves Standardized in Chlorogenic Acid, Rutin and Isoquercitrin: Tyrosinase Inhibition and Cytotoxicity. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 11, n. 9, p. e0163130, 2016.

DE MELO, Rafaela Santos *et al.* Phytocosmetic Emulsion Containing Extract of *Morus nigra* L. (Moraceae): Development, Stability Study, Antioxidant and Antibacterial Activities. **Cosmetics**, [s. l.], v. 9, n. 2, p. 1–12, 2022a.

DE MELO, Rafaela Santos *et al.* Phytocosmetic Emulsion Containing Extract of *Morus nigra* L. (Moraceae): Development, Stability Study, Antioxidant and Antibacterial Activities. **Cosmetics**, [s. l.], v. 9, n. 2, p. 1–12, 2022b.

DE OLIVEIRA, Thaisa Cardoso *et al.* Eco-friendly synthesis of phthalate anigo gum towards nanoparticles engineering using Quality by Design (QbD) approach. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 190, n. April, p. 801–809, 2021.

DE OLIVEIRA, Mariana Gonçalves; NADRUZ, Wilson; MÓNICA, Fabiola Zakia. Endothelial and vascular smooth muscle dysfunction in hypertension. **Biochemical Pharmacology**, [s. l.], v. 205, n. September, 2022a.

DE OLIVEIRA, Mariana Gonçalves; NADRUZ, Wilson; MÓNICA, Fabiola Zakia. Endothelial and vascular smooth muscle dysfunction in hypertension. **Biochemical Pharmacology**, [s. l.], v. 205, n. September, 2022b.

DE PÁDUA LÚCIO, Karine *et al.* Anti-inflammatory and antioxidant properties of black mulberry (*Morus nigra* L.) in a Model of LPS-Induced Sepsis. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [s. l.], v. 2018, 2018.

DE QUEIROZ, Graziela Tonioni *et al.* Efficacy of *Morus nigra* L. on reproduction in female Wistar rats. **Food and Chemical Toxicology**, [s. l.], v. 50, n. 3–4, p. 816–822, 2012.

DEGOBERT, Ghania; AYDIN, Dunya. **Lyophilization of nanocapsules: Instability sources, formulation and process parameters**. [S. l.]: MDPI AG, 2021.

DELALIO, Leon J.; SVED, Alan F.; STOCKER, Sean D. Sympathetic Nervous System Contributions to Hypertension: Updates and Therapeutic Relevance. **Canadian Journal of Cardiology**, [s. l.], v. 36, n. 5, p. 712–720, 2020a.

DELALIO, Leon J.; SVED, Alan F.; STOCKER, Sean D. Sympathetic Nervous System Contributions to Hypertension: Updates and Therapeutic Relevance. **Canadian Journal of Cardiology**, [s. l.], v. 36, n. 5, p. 712–720, 2020b.

DIAB, Kawthar A *et al.* Inhibitory activity of black mulberry (*Morus nigra*) extract against testicular, liver and kidney toxicity induced by paracetamol in mice. **Molecular Biology Reports**, [s. l.], n. 0123456789, 2020.

DIAB, Kawthar A. *et al.* Inhibitory activity of black mulberry (*Morus nigra*) extract against testicular, liver and kidney toxicity induced by paracetamol in mice. **Molecular Biology Reports**, [s. l.], v. 47, n. 3, p. 1733–1749, 2020.

DIAS, Sávia Francisca Lopes *et al.* Acetylated cashew gum-based nanoparticles for transdermal delivery of diclofenac diethyl amine. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 143, p. 254–261, 2016.

DIENG, Sidy Mouhamed *et al.* Pickering nano-emulsions stabilized by Eudragit RL100 nanoparticles as oral drug delivery system for poorly soluble drugs. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], v. 191, n. March, p. 111010, 2020.

DILLEN, Kathleen *et al.* Evaluation of ciprofloxacin-loaded Eudragit® RS100 or RL100/PLGA nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 314, n. 1, p. 72–82, 2006.

DINCER, Cuneyt; TONTUL, Ismail; TOPUZ, Ayhan. A comparative study of black mulberry juice concentrates by thermal evaporation and osmotic distillation as influenced by storage. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, [s. l.], v. 38, p. 57–64, 2016.

DO ROSARIO, Vinicius A. *et al.* Association between flavonoid intake and risk of hypertension in two cohorts of Australian women: a longitudinal study. **European Journal of Nutrition**, [s. l.], v. 60, n. 5, p. 2507–2519, 2021.

DONATO, M. Teresa; TOLOSA, Laia. Stem-cell derived hepatocyte-like cells for the assessment of drug-induced liver injury. **Differentiation**, [s. l.], v. 106, n. November 2018, p. 15–22, 2019.

DOWSETT, Laura *et al.* ADMA : A key. **Laura Dowsett**, [s. l.], 2020.

DRAPER, N.R. Response Surface Methodology : Process and Product Optimization Using Designed Experiments Book Reviews. [s. l.], v. 59, n. 1, p. 1–4, 1997.

D'URSO, Gilda *et al.* Identification of bioactive phytochemicals in mulberries. **Metabolites**, [s. l.], v. 10, n. 1, 2020.

EKOR, Martins. The growing use of herbal medicines: Issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. **Frontiers in Neurology**, [s. l.], v. 4 JAN, n. January, p. 1–10, 2014.

ERCISLI, Sezai; ORHAN, Emine. Chemical composition of white (*Morus alba*), red (*Morus rubra*) and black (*Morus nigra*) mulberry fruits. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 103, n. 4, p. 1380–1384, 2007.

ERDEN, Yavuz. Sour black mulberry (*Morus nigra* L.) causes cell death by decreasing mutant p53 expression in HT-29 human colon cancer cells. **Food Bioscience**, [s. l.], v. 42, n. May, p. 101113, 2021.

ERUYGUR, Nuraniye; DURAL, Emrah. Determination of 1-Deoxynojirimycin by a developed and validated HPLC-FLD method and assessment of In-vitro antioxidant, α -

Amylase and α -Glucosidase inhibitory activity in mulberry varieties from Turkey. **Phytomedicine**, [s. l.], v. 53, p. 234–242, 2019.

ETTEHAD, Dena *et al.* Blood pressure lowering for prevention of cardiovascular disease and death: A systematic review and meta-analysis. **The Lancet**, [s. l.], v. 387, n. 10022, p. 957–967, 2016.

FAGUNDES, Pâmela *et al.* Encapsulation of Nerol Oil in Polycaprolactone Polymer and Stability Evaluation. **Journal of Polymers and the Environment**, [s. l.], 2021.

FAN, Lujie *et al.* Dietary supplementation of *Morus nigra* L. leaves decrease fat mass partially through elevating leptin-stimulated lipolysis in pig model. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], v. 249, p. 112416, 2020.

FENG, Wenguang; DELL'ITALIA, Louis J.; SANDERS, Paul W. Novel paradigms of salt and hypertension. **Journal of the American Society of Nephrology**, [s. l.], v. 28, n. 5, p. 1362–1369, 2017.

FERRARIO, Carlos M. *et al.* Intracrine angiotensin ii functions originate from noncanonical pathways in the human heart. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, [s. l.], v. 311, n. 2, p. H404–H414, 2016.

FERREIRA, Camila Duarte; NUNES, Itaciara Larroza. Oil nanoencapsulation: development, application, and incorporation into the food market. **Nanoscale Research Letters**, [s. l.], v. 14, 2019a.

FERREIRA, Camila Duarte; NUNES, Itaciara Larroza. Oil nanoencapsulation: development, application, and incorporation into the food market. **Nanoscale Research Letters**, [s. l.], v. 14, 2019b.

FIGUEREDO, Kassia Caroline *et al.* Safety assessment of *Morus nigra* L. leaves: Acute and subacute oral toxicity studies in Wistar rats. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], v. 224, n. July 2017, p. 290–296, 2018.

FONTE, Pedro; REIS, Salette; SARMENTO, Bruno. **Facts and evidences on the lyophilization of polymeric nanoparticles for drug delivery**. [S. l.]: Elsevier B.V., 2016.

FOROUZANFAR, Mohammad H. *et al.* Global burden of hypertension and systolic blood pressure of at least 110 to 115mmHg, 1990-2015. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, [s. l.], v. 317, n. 2, p. 165–182, 2017.

FREIRE, Marjorie Caroline Liberato Cavalcanti *et al.* Understanding drug release data through thermodynamic analysis. **Materials**, [s. l.], v. 10, n. 6, p. 1–18, 2017.

FRIEBE, Andreas; SANDNER, Peter; SCHMIDTKO, Achim. cGMP: a unique 2nd messenger molecule – recent developments in cGMP research and development. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, [s. l.], v. 393, n. 2, p. 287–302, 2020.

- FRIEDMAN, Mendel; JÜRGENS, Hella S. Effect of pH on the stability of plant phenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 48, n. 6, p. 2101–2110, 2000.
- FULLERTON, James N.; GILROY, Derek W. Resolution of inflammation: A new therapeutic frontier. **Nature Reviews Drug Discovery**, [s. l.], v. 15, n. 8, p. 551–567, 2016.
- GALI, Lynda *et al.* Formulation and characterization of zein/gum arabic nanoparticles for the encapsulation of a rutin-rich extract from *Ruta chalepensis* L. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 367, p. 129982, 2022.
- GANDHI, Arijit; JANA, Sougata; SEN, Kalyan Kumar. In-vitro release of acyclovir loaded Eudragit RLPO® nanoparticles for sustained drug delivery. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 67, p. 478–482, 2014.
- GANGWISCH, James E. A review of evidence for the link between sleep duration and hypertension. **American Journal of Hypertension**, [s. l.], v. 27, n. 10, p. 1235–1242, 2014.
- GARJÓN, Javier *et al.* First-line combination therapy versus first-line monotherapy for primary hypertension. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, [s. l.], v. 2020, n. 2, 2020.
- GEISZT, Miklós *et al.* Identification of Renox, an NAD(P)H oxidase in kidney. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 97, n. 14, p. 8010–8014, 2000.
- GHASEMNEZHAD TARGHI, Reza *et al.* Radio protective effect of black mulberry extract on radiation-induced damage in bone marrow cells and liver in the rat. **Radiation Physics and Chemistry**, [s. l.], v. 130, p. 297–302, 2017.
- GOBBO-NETO, Leonardo; LOPES, Norberto P. Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, [s. l.], v. 30, n. 2, p. 374–381, 2007.
- GODOS, Justyna *et al.* Dietary phytoestrogen intake is inversely associated with hypertension in a cohort of adults living in the mediterranean area. **Molecules**, [s. l.], v. 23, n. 2, 2018.
- GORDILLO-GALEANO, Aldemar; MORA-HUERTAS, Claudia Elizabeth. Hydrodynamic diameter and zeta potential of nanostructured lipid carriers: Emphasizing some parameters for correct measurements. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, [s. l.], v. 620, n. April, p. 126610, 2021.
- GOSWAMI, Ankita *et al.* Lycopene loaded polymeric nanoparticles for prostate cancer treatment: Formulation, optimization using Box-behnken design and cytotoxicity studies. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, [s. l.], v. 67, n. October 2021, p. 102930, 2022.

- GRASSI, Guido; RAM, Venkata S. Evidence for a critical role of the sympathetic nervous system in hypertension. **Journal of the American Society of Hypertension**, [s. l.], v. 10, n. 5, p. 457–466, 2016.
- GRGIĆ, Josipa *et al.* Role of the encapsulation in bioavailability of phenolic compounds. **Antioxidants**, [s. l.], v. 9, n. 10, p. 1–36, 2020.
- GUIZZO, Pedro Luis *et al.* Controle de Qualidade e triagem fitoquímica da droga vegetal das folhas de *Morus nigra* L. (MORACEAE). **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences Rev Ciênc Farm Básica Apl**, [s. l.], v. 36, n. 2, p. 259–265, 2015.
- GUPTA, Deeksha *et al.* Simultaneous spectrophotometric determination of drug components from their dosage formulations. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, [s. l.], v. 270, p. 120819, 2022.
- GUTERRES, Sílvia S.; ALVES, Marta P.; POHLMANN, Adriana R. Polymeric Nanoparticles, Nanospheres and Nanocapsules, for Cutaneous Applications. **Drug Target Insights**, [s. l.], v. 2, p. 117739280700200, 2007.
- GUYENET, Patrice G. The sympathetic control of blood pressure. **Nature Reviews Neuroscience**, [s. l.], v. 7, n. 5, p. 335–346, 2006.
- HAMI, Zahra. A Brief Review on Advantages of Nano-based Drug Delivery Systems. **Annals of Military and Health Sciences Research**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 1–7, 2021.
- HAO, Junyu *et al.* Phytochemicals, Pharmacological Effects and Molecular Mechanisms of Mulberry. **Foods**, [s. l.], v. 11, n. 8, p. 1–19, 2022.
- HARDIANSYAH, Andri *et al.* Magnetic Graphene-Based Nanosheets with Pluronic F127-Chitosan Biopolymers Encapsulated α -Mangosteen Drugs for Breast Cancer Cells Therapy. **Polymers**, [s. l.], v. 14, n. 15, 2022.
- HARUSH-FRENKEL, Oshrat *et al.* Targeting of nanoparticles to the clathrin-mediated endocytic pathway. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s. l.], v. 353, n. 1, p. 26–32, 2007.
- HARVEY, Adam P. *et al.* Vascular dysfunction and fibrosis in stroke-prone spontaneously hypertensive rats: The aldosterone-mineralocorticoid receptor-Nox1 axis. **Life Sciences**, [s. l.], v. 179, p. 110–119, 2017.
- HASSANALILOU, Tohid *et al.* The protective effects of *Morus nigra* L. leaves on the kidney function tests and kidney and liver histological structures in streptozotocin-induced diabetic rats. **Biomedical Research**, [s. l.], v. 28, n. 14, p. 6113–6118, 2017.
- HEREDIA, Nathaly S. *et al.* Comparative statistical analysis of the release kinetics models for nanoprecipitated drug delivery systems based on poly(lactic-co-glycolic acid). **PLoS ONE**, [s. l.], v. 17, n. 3 March, p. 1–28, 2022.
- HERNÁNDEZ-GIOTTONINI, Karol Yesenia *et al.* PLGA nanoparticle preparations by emulsification and nanoprecipitation techniques: Effects of formulation parameters. **RSC Advances**, [s. l.], v. 10, n. 8, p. 4218–4231, 2020.

HOFFMAN F.L. Higiene. Factores limitantes à proliferação de microorganismos no alimentos. **BRASIL ALIMENTOS - n° 9** -, [s. l.], v. 5, p. 30, 2001.

HONARY, S; ZAHIR, F. Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems - A Review (Part 1). **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. 255–264, 2013.

HOSSEN, Sarwar *et al.* **Smart nanocarrier-based drug delivery systems for cancer therapy and toxicity studies: A review**. [S. l.]: Cairo University, 2019-. ISSN 20901232.v. 15

HT-, Cell Line *et al.* The Role of Morus Nigra Extract and Its Active Compounds as Drug Candidate on Human Colorectal Adenocarcinoma. **International Journal of Clinical Oncology and Cancer Research**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 10–14, 2017.

HU, Yaxi *et al.* Determination of antioxidant capacity and phenolic content of chocolate by attenuated total reflectance-Fourier transformed-infrared spectroscopy. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 202, p. 254–261, 2016.

HÜHN, Dominik *et al.* Polymer-coated nanoparticles interacting with proteins and cells: Focusing on the sign of the net charge. **ACS Nano**, [s. l.], v. 7, n. 4, p. 3253–3263, 2013.

HUNYADI, A. *et al.* Metabolic effects of mulberry leaves: Exploring potential benefits in type 2 diabetes and hyperuricemia. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, [s. l.], v. 2013, 2013.

HURR, Chansol; YOUNG, Colin N. Neural Control of Non-vasomotor Organs in Hypertension. **Current Hypertension Reports**, [s. l.], v. 18, n. 4, 2016.

HUSSAIN, Tarique *et al.* Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us?. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [s. l.], v. 2016, p. 7432797, 2016.

HYUNMI, Kim *et al.* Inhibitory effects of fruit juices on CYP3A activity. **Drug Metabolism and Disposition**, [s. l.], v. 34, n. 4, p. 521–523, 2006.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. 1ª Edição Digital. **Métodos físicos-químicos para análise de Alimentos**, [s. l.], 2008.

IQBAL, Mohammad S. *et al.* Thermal analysis of some natural polysaccharide materials by isoconversional method. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 140, n. 1–2, p. 178–182, 2013.

ISSA, Najlaa; ABD-ALJABAR, Rihan. Phytochemical Analysis, Antioxidant (Dna Nicking Assay) and Antibacterial Activities of Morus Nigra L. Fruits Secondary Metabolites. **Science Journal of University of Zakho**, [s. l.], v. 5, n. 2 SE-Science Journal of University of Zakho, 2017.

JAFARI-AGHDAM, Nazila *et al.* Methylprednisolone acetate-Eudragit® RS100 electrospuns: Preparation and physicochemical characterization. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**, [s. l.], v. 44, n. 2, p. 497–503, 2016.

JAMES, Paul A. *et al.* 2014 Evidence-based guideline for the management of high blood pressure in adults: Report from the panel members appointed to the Eighth Joint National Committee (JNC 8). **Jama**, [s. l.], v. 311, n. 5, p. 507–520, 2014.

JAN, Bisma *et al.* Nutritional constituents of mulberry and their potential applications in food and pharmaceuticals: A review. **Saudi Journal of Biological Sciences**, [s. l.], v. 28, n. 7, p. 3909–3921, 2021.

JAVED, Shamama *et al.* Nanostructured lipid carrier system: A compendium of their formulation development approaches, optimization strategies by quality by design, and recent applications in drug delivery. **Nanotechnology Reviews**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 1744–1777, 2022.

JAWAHAR, Natarajan; MEYYANATHAN, SN. Polymeric nanoparticles for drug delivery and targeting: A comprehensive review. **International Journal of Health & Allied Sciences**, [s. l.], v. 1, n. 4, p. 217, 2012.

JEEVAHAN, Jeya; CHANDRASEKARAN, M. Nanoedible films for food packaging: a review. **Journal of Materials Science**, [s. l.], v. 54, n. 19, p. 12290–12318, 2019.

JIANG, Yan *et al.* Effects of the ethanol extract of black mulberry (*Morus nigra* L.) fruit on experimental atherosclerosis in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], v. 200, p. 228–235, 2017.

JOVANOVIĆ, Aleksandra A. *et al.* Freeze vs. spray drying for dry wild thyme (*Thymus serpyllum* L.) extract formulations: The impact of gelatin as a coating material. **Molecules**, [s. l.], v. 26, n. 13, 2021.

KAROLEWICZ, Bozena *et al.* Thermal, spectroscopic, and dissolution studies of ketoconazole-Pluronic F127 system. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, [s. l.], v. 115, n. 3, p. 2487–2493, 2014.

KATARA, Rajesh; MAJUMDAR, Dipak K. Eudragit RL 100-based nanoparticulate system of aceclofenac for ocular delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], v. 103, p. 455–462, 2013a.

KATARA, Rajesh; MAJUMDAR, Dipak K. Eudragit RL 100-based nanoparticulate system of aceclofenac for ocular delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], v. 103, p. 455–462, 2013b.

KATATA-SERU, Lebogang *et al.* Nanoformulated Eudragit lopinavir and preliminary release of its loaded suppositories. **Heliyon**, [s. l.], v. 6, n. 5, p. e03890, 2020.

KATHURIA, Ajay *et al.* Environmentally benign bioderived, biocompatible, thermally stable MOFs suitable for food contact applications. **Trends in Food Science and Technology**, [s. l.], v. 138, n. March, p. 323–338, 2023.

KAUR, Bhupinder; THAKUR, Nishant; GOSWAMI, Manish. FTIR spectroscopy based identification and compatibility studies of Gamma Oryzanol with various polymers. **Materials Today: Proceedings**, [s. l.], n. xxxx, p. 1–7, 2023.

KEARNEY, Patricia M *et al.* Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. **The Lancet**, [s. l.], v. 365, n. 9455, p. 217–223, 2005.

KEBAL, Leila *et al.* HPLC-DAD profile of phenolic compounds and In vitro antioxidant activity of *Ficus carica* L. fruits from two Algerian varieties. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, [s. l.], v. 155, n. June, p. 113738, 2022a.

KEBAL, Leila *et al.* HPLC-DAD profile of phenolic compounds and In vitro antioxidant activity of *Ficus carica* L. fruits from two Algerian varieties. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, [s. l.], v. 155, n. September, p. 113738, 2022b.

KHAN, Husain Yar *et al.* Plant polyphenol induced cell death in human cancer cells involves mobilization of intracellular copper ions and reactive oxygen species generation: A mechanism for cancer chemopreventive action. **Molecular Nutrition and Food Research**, [s. l.], v. 58, n. 3, p. 437–446, 2014.

KHAN, Muhammad Moneeb *et al.* Statistical optimization of co-loaded rifampicin and pentamidine polymeric nanoparticles for the treatment of cutaneous leishmaniasis. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, [s. l.], v. 79, n. September 2022, p. 104005, 2023a.

KHAN, Muhammad Moneeb *et al.* Statistical optimization of co-loaded rifampicin and pentamidine polymeric nanoparticles for the treatment of cutaneous leishmaniasis. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, [s. l.], v. 79, n. September 2022, p. 104005, 2023b.

KHATTAK, Khanzadi Fatima; RHMAN, Taj-ur. Effect of geographical distributions on the nutrient composition, phytochemical profile and antioxidant activity of *Morus nigra*. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Science**, [s. l.], v. 28, n. 5, p. 1671–1678, 2015.

KIM, Jin Won *et al.* Determination of 1-deoxynojirimycin in *Morus alba* L. leaves by derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate followed by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, [s. l.], v. 1002, n. 1–2, p. 93–99, 2003.

KIM, Seong Ah; JOUNG, Hyojee; SHIN, Sangah. Dietary pattern, dietary total antioxidant capacity, and dyslipidemia in Korean adults. **Nutrition Journal**, [s. l.], v. 18, n. 1, 2019.

KOHAN, Donald E.; BARTON, Matthias. Endothelin and endothelin antagonists in chronic kidney disease. **Kidney International**, [s. l.], v. 86, n. 5, p. 896–904, 2014.

KOKOSKA, Ladislav *et al.* Plant-Derived Products as Antibacterial and Antifungal Agents in Human Health Care. **Current Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 26, n. 29, p. 5501–5541, 2018.

KONIUCH, Natalia *et al.* Structure of polymeric nanoparticles encapsulating a drug – pamoic acid ion pair by scanning transmission electron microscopy. **Heliyon**, [s. l.], v. 9, n. 6, p. e16959, 2023.

KORZENIOWSKA, Karolina; ŁĘSKA, Bogusława; PAWEŁ, Piotr. Isolation and determination of phenolic compounds from freshwater *Cladophora glomerata*. **Algal Research**, [s. l.], v. 48, n. January, p. 101912, 2020.

KOYU, Halil *et al.* Optimization of microwave assisted extraction of *Morus nigra* L. fruits maximizing tyrosinase inhibitory activity with isolation of bioactive constituents. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 248, p. 183–191, 2018.

KOYU, Halil *et al.* Optimizing subcritical water extraction of *Morus nigra* L. fruits for maximization of tyrosinase inhibitory activity. **Journal of Supercritical Fluids**, [s. l.], v. 127, p. 15–22, 2017.

KOZIOLEK, Mirko *et al.* The mechanisms of pharmacokinetic food-drug interactions – A perspective from the UNGAP group. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 134, n. January, p. 31–59, 2019.

KRAISIT, Pakorn. Impact of hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) type and concentration on the swelling and release properties of propranolol hydrochloride matrix tablets using a simplex centroid design. **International Journal of Applied Pharmaceutics**, [s. l.], v. 11, n. 2, p. 143–151, 2019.

KRAISIT, Pakorn *et al.* Preparation and characterization of hydroxypropyl methylcellulose/polycarbophil mucoadhesive blend films using a mixture design approach. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, [s. l.], v. 65, n. 3, p. 284–294, 2017.

KRAISIT, Pakorn; SARISUTA, Narong. Development of triamcinolone acetonide-loaded nanostructured lipid carriers (NLCs) for buccal drug delivery using the box-behken design. **Molecules**, [s. l.], v. 23, n. 4, p. 6–8, 2018.

KREUTER, Jörg. Drug delivery to the central nervous system by polymeric nanoparticles: What do we know?. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s. l.], v. 71, p. 2–14, 2014.

KUCZERISZKA, Marta; WĄSOWICZ, Krzysztof. Animal models of hypertension: The status of nitric oxide and oxidative stress and the role of the renal medulla. **Nitric Oxide - Biology and Chemistry**, [s. l.], v. 125–126, n. October 2021, p. 40–46, 2022.

KUMAR, B. Ramesh. Application of HPLC and ESI-MS techniques in the analysis of phenolic acids and flavonoids from green leafy vegetables (GLVs). **Journal of Pharmaceutical Analysis**, [s. l.], v. 7, n. 6, p. 349–364, 2017.

KUMAR, Amit *et al.* Cannabimimetic plants: are they new cannabinoidergic modulators?. **Planta**, [s. l.], 2019.

KUMAR, Sandeep *et al.* Nanotechnology as Emerging Tool for Enhancing Solubility of Poorly Water-Soluble Drugs. **BioNanoScience**, [s. l.], v. 2, n. 4, p. 227–250, 2012.

KUMAR, Naresh; GOEL, Nidhi. Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. **Biotechnology Reports**, [s. l.], v. 24, p. e00370, 2019.

- KUMAR, Krishna N.; MALLIK, Sanku; SARKAR, Kausik. Role of freeze-drying in the presence of mannitol on the echogenicity of echogenic liposomes. **The Journal of the Acoustical Society of America**, [s. l.], v. 142, n. 6, p. 3670–3676, 2017.
- LALLER, Sanjeev *et al.* Nano drug delivery system: An insight with review. **Santosh University Journal of Health Sciences**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 1–4, 2020.
- LEAL, Juan H. *et al.* Impacts of Inorganic Material (Total Ash) on Surface Energy, Wettability, and Cohesion of Corn Stover. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, [s. l.], v. 8, n. 4, p. 2061–2072, 2020.
- LEE, Hanall *et al.* Repetitive transcranial magnetic stimulation improves cardiovascular autonomic nervous system control: A meta-analysis. **Journal of Affective Disorders**, [s. l.], v. 339, n. June, p. 443–453, 2023.
- LEMOS, Iara Lopes *et al.* Phytochemical prospecting of aqueous infusions of blackberry branches and leaves (*Morus nigra* L.) using a central rotational composite design. **Research, Society and Development**, [s. l.], v. 8, n. 75, p. 147–154, 2020.
- LI, Xiao Chun *et al.* Intratubular, Intracellular, and Mitochondrial Angiotensin II/AT1 (AT1a) Receptor/NHE3 Signaling Plays a Critical Role in Angiotensin II-Induced Hypertension and Kidney Injury. **Frontiers in Physiology**, [s. l.], v. 12, n. August, 2021.
- LI, Xiaojing *et al.* Size-controlled starch nanoparticles prepared by self-assembly with different green surfactant: The effect of electrostatic repulsion or steric hindrance. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 199, p. 356–363, 2016.
- LI, Jing; QIAO, Yanjiang; WU, Zhisheng. Nanosystem trends in drug delivery using quality-by-design concept. **Journal of Controlled Release**, [s. l.], v. 256, p. 9–18, 2017.
- LIEBEL, Matz *et al.* Simultaneous Sizing and Refractive Index Analysis of Heterogeneous Nanoparticle Suspensions. **ACS Nano**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 221–229, 2023.
- LIM, Sung Ho; CHOI, Chang Ik. Pharmacological properties of morus nigra L. (Black Mulberry) as a promising nutraceutical resource. **Nutrients**, [s. l.], v. 11, n. 2, p. 1–18, 2019.
- LIM, Keemi; HAMID, Zuratul A.A. **Polymer nanoparticle carriers in drug delivery systems: Research trend**. [S. l.]: Elsevier Inc., 2018.
- LIMA, Bruno S. *et al.* Development of standardized extractive solution from *Lippia sidoides* by factorial design and their redox active profile. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s. l.], v. 25, n. 3, p. 301–306, 2015.
- LIU, Changkun *et al.* Preparation of acetylsalicylic acid-acylated chitosan as a novel polymeric drug for drug controlled release. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 78, p. 189–194, 2015.
- LONGHINI, Renata *et al.* Obtenção de extratos de própolis sob diferentes condições e avaliação de sua atividade antifúngica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s. l.], v. 17, n. 3, p. 388–395, 2007.

LORCA-PONCE, Javier *et al.* Silver nanoparticle's size and morphology relationship with their electrocatalysis and detection properties. **Applied Surface Science**, [s. l.], v. 617, n. January, p. 156584, 2023.

MA, Xueling *et al.* The Pathogenesis of Diabetes Mellitus by Oxidative Stress and Inflammation: Its Inhibition by Berberine. **Frontiers in Pharmacology**, [s. l.], v. 9, p. 782, 2018.

MAGNABOSCO, Patricia *et al.* Comparative analysis of non-adherence to medication treatment for systemic arterial hypertension in urban and rural populations. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, [s. l.], v. 23, n. 1, p. 20–27, 2015.

MAGRI, Giulia *et al.* Maltodextrins as drying auxiliary agent for the preparation of easily resuspendable nanoparticles. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, [s. l.], v. 50, p. 181–187, 2019.

MAHAJAN, Shiwani *et al.* Hemodynamic Phenotypes of Hypertension Based on Cardiac Output and Systemic Vascular Resistance. **American Journal of Medicine**, [s. l.], v. 133, n. 4, p. e127–e139, 2020.

MAHALINGAM, Manikandan; KRISHNAMOORTHY, Kannan. Selection of a suitable method for the preparation of polymeric nanoparticles: Multi-criteria decision making approach. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 57–67, 2015a.

MAHALINGAM, Manikandan; KRISHNAMOORTHY, Kannan. Selection of a suitable method for the preparation of polymeric nanoparticles: Multi-criteria decision making approach. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 57–67, 2015b.

MAITY, Subhajit; ACHARYYA, Arghya; SANKAR CHAKRABORTI, Abhay. Flavonoid-based polymeric nanoparticles: A promising approach for cancer and diabetes treatment. **European Polymer Journal**, [s. l.], v. 177, n. February, p. 111455, 2022.

MAKADIA, Hirenkumar K.; SIEGEL, Steven J. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier. **Polymers**, [s. l.], v. 3, n. 3, p. 1377–1397, 2011.

MAKANJUOLA, Solomon A. Influence of particle size and extraction solvent on antioxidant properties of extracts of tea, ginger, and tea–ginger blend. **Food Science and Nutrition**, [s. l.], v. 5, n. 6, p. 1179–1185, 2017.

MALACRIDA, Cassia R.; MOTTA, Silvana da. Compostos fenólicos totais e antocianinas em suco de uva. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, [s. l.], v. 25, n. 4, p. 659–664, 2005.

MALLHI, Tauqeer Hussain *et al.* Hepatoprotective activity of methanolic extract of *Malva parviflora* against paracetamol-induced hepatotoxicity in mice. **Bangladesh Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 9, n. 3, p. 342–346, 2014.

MALLHI, Tauqeer Hussain; QADIR, Muhammad Imran; KHAN, Yusra Habib. Determination of phytoconstituents of n-hexane extract of leaves of *Morus nigra* and evaluation of their effects on biochemical and histopathological parameters in

paracetamol intoxicated mice liver. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 54, n. 3, p. 1–9, 2018.

MANCIA, Giuseppe *et al.* 2013 ESH/ESC guidelines for the management of arterial hypertension. **Blood Pressure**, [s. l.], v. 22, n. 4, p. 193–278, 2013.

MAQSOU DLOU, Atefe *et al.* Stability and structural properties of bee pollen protein hydrolysate microencapsulated using maltodextrin and whey protein concentrate. **Heliyon**, [s. l.], v. 6, n. 5, 2020.

MARCONDES, Sisi *et al.* Cyclic GMP-independent mechanisms contribute to the inhibition of platelet adhesion by nitric oxide donor: A role for α -actinin nitration. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 103, n. 9, p. 3434–3439, 2006.

MARKMAN, Brivaldo *et al.* Diretrizes Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial – 2020 Diretrizes. [s. l.], v. 116, n. 3, p. 516–658, 2021.

MARONEZE, Mariana Manzoni *et al.* Validação de método analítico e de extração do malation em água e solo após nebulização de combate ao *Aedes aegypti*. **Revista Ambiente e Agua**, [s. l.], v. 9, n. 3, p. 445–458, 2014.

MARQUES, Graziella S. *et al.* Comparative evaluation of UV/VIS and HPLC analytical methodologies applied for quantification of flavonoids from leaves of *Bauhinia forficata*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s. l.], v. 23, n. 1, p. 51–57, 2013.

MARTÍ, Raúl; ROSELLÓ, Salvador; CEBOLLA-CORNEJO, Jaime. Tomato as a Source of Carotenoids and Polyphenols Targeted to Cancer Prevention. **Cancers (Basel)**, [s. l.], v. 8, n. 6, p. 58, 2016.

MARTÍN-CAMACHO, Ubaldo de Jesús *et al.* Weibull β value for the discernment of drug release mechanism of PLGA particles. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 640, n. April, 2023.

MASCARELLO, Alessandra *et al.* Naturally occurring Diels-Alder-type adducts from *Morus nigra* as potent inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* protein tyrosine phosphatase B. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 144, p. 277–288, 2018.

MASSELLA, Daniele *et al.* Overcoming the limits of flash nanoprecipitation: Effective loading of hydrophilic drug into polymeric nanoparticles with controlled structure. **Polymers**, [s. l.], v. 10, n. 10, 2018.

MAYET, Jamil; HUGHES, Alun. Cardiac and vascular pathophysiology in hypertension. **Heart**, [s. l.], v. 89, n. 9, p. 1104–1109, 2003.

MAZIMBA, Ofentse; MAJINDA, Runner R.T.; MOTLHANKA, Daniel. Antioxidant and antibacterial constituents from *Morus nigra*. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, [s. l.], v. 5, n. 6, p. 751–754, 2011.

MEHMOOD ABBASI, Arshad *et al.* Comparison of Nutritional Value, Antioxidant Potential, and Risk Assessment of the Mulberry (*Morus*) Fruits. **International Journal of Fruit Science**, [s. l.], v. 16, n. 2, p. 113–134, 2016.

MIGANEH WAISS, Idriss *et al.* Total phenolic content, antioxidant activity, shelf-life and reconstitutability of okra seeds powder: influence of milling and sieving processes. **International Journal of Food Science and Technology**, [s. l.], v. 56, n. 10, p. 5139–5149, 2021.

MILEO, Ana Maria; MICCADEI, Stefania. Polyphenols as Modulator of Oxidative Stress in Cancer Disease: New Therapeutic Strategies. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [s. l.], p. 17, 2015.

MIRANDA, Mariza Abreu *et al.* Uso etnomedicinal do chá de *Morus nigra* L. no tratamento dos sintomas do climatério de mulheres de Muriaé, Minas Gerais, Brasil. **HU Revista**, [s. l.], v. 36, n. 1, p. 61–68, 2010.

MOMIN, R K; KADAM, V B. Determination of ash values of some medicinal plants of genus *Sesbania* of marathwada region in maharashtra. **Journal of Phytology**, [s. l.], v. 3, n. 12, p. 52–54, 2011.

MONTENOTE, Michelly Cristina *et al.* Antioxidant effect of *Morus nigra* on Chagas disease progression. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, [s. l.], v. 59, 2017.

MORLOCK, Gertrud E. *et al.* Effect-directed profiling of 17 different fortified plant extracts by high-performance thin-layer chromatography combined with six planar assays and high-resolution mass spectrometry. **Molecules**, [s. l.], v. 26, n. 5, 2021.

MORONEY, Kevin M.; VYNNYCKY, Michael. Mathematical modelling of drug release from a porous granule. **Applied Mathematical Modelling**, [s. l.], v. 100, p. 432–452, 2021.

MULDER, E. G. *et al.* Cardiac output and peripheral vascular resistance during normotensive and hypertensive pregnancy – a systematic review and meta-analysis. **BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology**, [s. l.], v. 129, n. 5, p. 696–707, 2022.

MUSUNURU, Kiran. **Atherogenic dyslipidemia: Cardiovascular risk and dietary intervention**. [S. l.]: Springer, 2010.

NADE, V. S. *et al.* Cardioprotective and antihypertensive potential of *Morus alba* L. in isoproterenol induced myocardial infarction and renal artery ligation-induced hypertension. **Journal of Natural Remedies**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 54–67, 2013.

NALAWADE, Pravin B.; GAJJAR, Anuradha K. Microencapsulation of lutein extracted from marigold flowers (*Tagetes erecta* L.) using full factorial design. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, [s. l.], v. 33, p. 75–87, 2016a.

- NALAWADE, Pravin B.; GAJJAR, Anuradha K. Microencapsulation of lutein extracted from marigold flowers (*Tagetes erecta* L.) using full factorial design. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, [s. l.], v. 33, p. 75–87, 2016b.
- NAOWABOOT, Jarinyaporn *et al.* Mulberry leaf extract restores arterial pressure in streptozotocin-induced chronic diabetic rats. **Nutrition Research**, [s. l.], v. 29, n. 8, p. 602–608, 2009.
- NEGRO, Carmine *et al.* Nutraceutical Properties of Mulberries Grown in Southern Italy (Apulia). **Antioxidants**, [s. l.], v. 8, n. 7, p. 223, 2019.
- NEMEN, Daiane; LEMOS-SENNA, Elenara. Preparação E Caracterização De Suspensões Coloidais De Nanocarreadores Lipídicos Contendo Resveratrol Destinados À Administração Cutânea Preparation and Characterization of Resveratrol-Loaded Lipid-Based Nanocarriers for Cutaneous Administration. **Quim. Nova**, [s. l.], v. 34, n. 3, p. 408–413, 2011.
- NESELLO, Luciane Angela Nottar *et al.* Gastroprotective Value of Berries: Evidences from Methanolic Extracts of *Morus nigra* and *Rubus niveus* Fruits. **Gastroenterology Research and Practice**, [s. l.], v. 2017, p. 7089697, 2017.
- NEVES, Kedima Danuza; CARVALHO, Prof Ricardo. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. [s. l.], v. 13, p. 47–56, 2012.
- NGUYEN, Dinh Trung *et al.* Dual interactions of amphiphilic gelatin copolymer and nanocurcumin improving the delivery efficiency of the nanogels. **Polymers**, [s. l.], v. 11, n. 5, 2019.
- NILE, Shivraj Hariram *et al.* Nanotechnologies in Food Science: Applications, Recent Trends, and Future Perspectives. **Nano-Micro Letters**, [s. l.], v. 12, n. 1, 2020a.
- NILE, Shivraj Hariram *et al.* Nanotechnologies in Food Science: Applications, Recent Trends, and Future Perspectives. **Nano-Micro Letters**, [s. l.], v. 12, n. 1, 2020b.
- NILE, Shivraj Hariram *et al.* Nanotechnologies in Food Science: Applications, Recent Trends, and Future Perspectives. **Nano-Micro Letters**, [s. l.], v. 12, n. 1, 2020c.
- OFOKANSI, Kenneth Chibuzor; KENECHUKWU, Franklin Chimaobi. Formulation Development and Evaluation of Drug Release Kinetics from Colon-Targeted Ibuprofen Tablets Based on Eudragit RL 100-Chitosan Interpolyelectrolyte Complexes. **ISRN Pharmaceutics**, [s. l.], v. 2013, p. 1–8, 2013.
- OLIVEIRA, A. C.B. *et al.* Avaliação toxicológica pré-clínica do chá das folhas de *Morus nigra* L. (Moraceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, [s. l.], v. 15, n. 2, p. 244–249, 2013.
- OLIVEIRA, Antônia Carla de Jesus *et al.* Microwave-initiated rapid synthesis of phthalated cashew gum for drug delivery systems. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 254, n. 20, 2021.
- PADILHA, Marina M. *et al.* Antiinflammatory properties of *Morus nigra* leaves. **Phytotherapy Research**, [s. l.], v. 24, n. 10, p. 1496–1500, 2010.

PALEM, Chinna Reddy *et al.* Oral transmucosal delivery of domperidone from immediate release films produced via hot-melt extrusion technology. **Pharmaceutical Development and Technology**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 186–195, 2013.

PARASHAR, P; RAMRAKHIANI, M; DATT, S C. **Mechanical strength of blends of Eudragit RL 100 and poly(methyl methacrylate)** **Polymer Testing**. [S. l.: s. n.], 1999.

PARK, Se Jin *et al.* Quality by design: Screening of critical variables and formulation optimization of Eudragit e nanoparticles containing dutasteride. **Archives of Pharmacal Research**, [s. l.], v. 36, n. 5, p. 593–601, 2013.

PATEL, Mitali; MUNDADA, Veenu; SAWANT, Krutika. Enhanced intestinal absorption of asenapine maleate by fabricating solid lipid nanoparticles using TPGS: elucidation of transport mechanism, permeability across Caco-2 cell line and in vivo pharmacokinetic studies. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**, [s. l.], v. 47, n. 1, p. 144–153, 2019.

PATRA, Ch. Niranjan *et al.* Pharmaceutical significance of Eudragit: A review. **Future Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 33–45, 2017.

PEDRITA, Alves Sampaio *et al.* Development and validation of a high performance liquid chromatography-diode array detection (HPLC-DAD) method for the quantification of rutin and isoquercetin in *Morus nigra* L. (Moraceae). **African Journal of Biotechnology**, [s. l.], v. 17, n. 34, p. 1048–1056, 2018.

PEI, Sheng Li; KAN, Fang; YUE, Chun Jiang. Anti-hypertensive effect of *Morus alba* L extract in rats. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, [s. l.], v. 20, n. 6, p. 1205–1209, 2021.

PEREIRA-ROCHE, Nayade *et al.* Oxidative damage, antioxidant defense and DNA repair capacity in patients with Primary Dyslipidemia. **Free Radical Biology and Medicine**, [s. l.], v. 108, p. S25, 2017.

PÉREZ-GREGORIO, M. R. *et al.* Influence of alcoholic fermentation process on antioxidant activity and phenolic levels from mulberries (*Morus nigra* L.). **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], v. 44, n. 8, p. 1793–1801, 2011.

PICCO, Agustin S. *et al.* Freeze-drying of silica nanoparticles: Redispersibility toward nanomedicine applications. **Nanomedicine**, [s. l.], v. 13, n. 2, p. 179–190, 2018.

PIGNATELLO, Rosario *et al.* **Preparation, characterisation and photosensitivity studies of solid dispersions of diflunisal and Eudragit RS100 ® and RL100 ®** **International Journal of Pharmaceutics**. [S. l.: s. n.], 2001. Disponível em: www.elsevier.com/locate/ijpharm. .

PINHEIRO, Rúben G.R. *et al.* Nanoparticles for targeted brain drug delivery: What do we know?. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 22, n. 21, 2021.

PIRES, Felipe Q. *et al.* Use of mixture design in drug-excipient compatibility determinations: Thymol nanoparticles case study. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [s. l.], v. 137, p. 196–203, 2017.

PISOSCHI, Aurelia Magdalena *et al.* **An overview of natural antimicrobials role in food.** [S. l.]: Elsevier Masson SAS, 2018.

POLITIS, Stavros N. *et al.* Design of experiments (DoE) in pharmaceutical development. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, [s. l.], v. 43, n. 6, p. 889–901, 2017.

POLUMACKANYCZ, Milena; WESOŁOWSKI, Marek; VIAPIANA, Agnieszka. *Morus alba* L. and *Morus nigra* L. Leaves as a Promising Food Source of Phenolic Compounds with Antioxidant Activity. **Plant Foods for Human Nutrition**, [s. l.], v. 76, n. 4, p. 458–465, 2021.

POTULSKI, Daniele Cristina *et al.* Influência da incorporação de celulose microfibrilada nas propriedades de resistência mecânicas do papel. **Scientia Forestalis/Forest Sciences**, [s. l.], v. 40, n. 103, p. 345–351, 2014.

POWELL, Pamela C. *et al.* Chymase uptake by cardiomyocytes results in myosin degradation in cardiac volume overload. **Heliyon**, [s. l.], v. 5, n. 4, p. e01397, 2019.

POZNYAK, Anastasia V. *et al.* NADPH Oxidases and Their Role in Atherosclerosis. **Biomedicines**, [s. l.], v. 8, n. 7, p. 1–13, 2020.

PUNITHA, S; UVARANI, R; PANNEERSELVAM, A. **Acoustical and Spectroscopic studies in aqueous solutions of polymer and dextrin's binary complex formation** *International Journal of ChemTech Research CODEN*. [S. l.: s. n.], 2014.

RAD, Abbas Afrasiabi *et al.* The application of nanomaterials in cardiovascular diseases: A review on drugs and devices. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 22, p. 501–515, 2019.

RADOJKOVIĆ, Marija *et al.* Biological activities and chemical composition of *Morus* leaves extracts obtained by maceration and supercritical fluid extraction. **Journal of Supercritical Fluids**, [s. l.], v. 117, p. 50–58, 2016.

RADOJKOVIĆ, Marija *et al.* Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from *Morus nigra* leaves: optimization and characterization of the antioxidant activity and phenolic composition. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, [s. l.], v. 93, n. 6, p. 1684–1693, 2018.

RAHIMI-MADISEH, Mohammad *et al.* Renal biochemical and histopathological alterations of diabetic rats under treatment with hydro alcoholic *Morus nigra* extract. **Journal of Renal Injury Prevention**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 56–60, 2017.

RAHMAN, Ziyaur; ZIDAN, Ahmed S.; KHAN, Mansoor A. Non-destructive methods of characterization of risperidone solid lipid nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [s. l.], v. 76, n. 1, p. 127–137, 2010.

RAJPUT, Amarjitsing P.; BUTANI, Shital B. Resveratrol anchored nanostructured lipid carrier loaded in situ gel via nasal route: Formulation, optimization and in vivo characterization. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, [s. l.], v. 51, n. February, p. 214–223, 2019.

- RAMACHANDRAN, Swaroopini *et al.* Recent developments in chitosan-based nanocomposites. **Bio-based Polymers and Nanocomposites: Preparation, Processing, Properties & Performance**, [s. l.], p. 183–215, 2019.
- RASUL, Azhar *et al.* Nature-Inspired Drugs: Expanding Horizons of. **Advances in Pharmacological Sciences**, [s. l.], v. 2019, 2019.
- RIBANI, Marcelo *et al.* Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, [s. l.], v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.
- RIBEIRO, Anita Eugênia Alencar Santos *et al.* Inhibitory effects of *Morus nigra* L. (Moraceae) against local paw edema and mechanical hypernociception induced by *Bothrops jararacussu* snake venom in mice. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, [s. l.], v. 111, p. 1046–1056, 2019.
- RICE, Gillian I. *et al.* Evaluation of angiotensin-converting enzyme (ACE), its homologue ACE2 and neprilysin in angiotensin peptide metabolism. **Biochemical Journal**, [s. l.], v. 383, n. 1, p. 45–51, 2004.
- RILEY, R; CHAPMAN, V. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. [s. l.], 1958.
- ROBLES-GARCÍA, Miguel Ángel *et al.* Nanofibers of cellulose bagasse from Agave tequilana Weber var. azul by electrospinning: preparation and characterization. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 192, n. January, p. 69–74, 2018.
- RODRÍGUEZ DE LUNA, Sara Luisa; RAMÍREZ-GARZA, R. E.; SERNA SALDÍVAR, Sergio O. Environmentally Friendly Methods for Flavonoid Extraction from Plant Material: Impact of Their Operating Conditions on Yield and Antioxidant Properties. **Scientific World Journal**, [s. l.], v. 2020, 2020.
- ROKOSH, D. Gregg; SIMPSON, Paul C. Knockout of the $\alpha 1A/C$ -adrenergic receptor subtype: The $\alpha 1A/C$ is expressed in resistance arteries and is required to maintain arterial blood pressure. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 99, n. 14, p. 9474–9479, 2002.
- RONGTHONG, Thitiphorn *et al.* Eudragit RL-based film coatings: How to minimize sticking and adjust drug release using MAS. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [s. l.], v. 148, p. 126–133, 2020.
- ROSA, Reginaldo Cruz Alves *et al.* Triagem fitoquímica dos extratos aquosos de *Bauhinia candicans*, *Foeniculum vulgare*, *Mentha pulegium* e *Morus nigra*. **Conexão Ciência (Online)**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 44–51, 2016.
- ROUSH, George C.; HOLFORD, Theodore R.; GUDDATI, Achuta K. Chlorthalidone compared with hydrochlorothiazide in reducing cardiovascular events: Systematic review and network meta-analyses. **Hypertension**, [s. l.], v. 59, n. 6, p. 1110–1117, 2012.
- RUBIO, Camila Peres *et al.* Spectrophotometric assays for total antioxidant capacity (TAC) in dog serum: An update. **BMC Veterinary Research**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 1–7, 2016a.

RUBIO, Camila Peres *et al.* Spectrophotometric assays for total antioxidant capacity (TAC) in dog serum: An update. **BMC Veterinary Research**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 1–7, 2016b.

RUSSWURM, Michael *et al.* Functional properties of a naturally occurring isoform of soluble guanylyl cyclase. **Biochemical Journal**, [s. l.], v. 335, n. 1, p. 125–130, 1998.

SAFARYAN, Abeer H.M. *et al.* Optimisation of the preservation conditions for molecularly imprinted polymer nanoparticles specific for trypsin. **Nanoscale Advances**, [s. l.], v. 1, n. 9, p. 3709–3714, 2019.

SALATIN, Sara *et al.* Development of a nanoprecipitation method for the entrapment of a very water soluble drug into Eudragit RL nanoparticles. **Research in Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 1–14, 2017.

SALEH, Maysoun M. *et al.* Applications of Plant-Derived Nanomaterials in Mitigation of Crop Abiotic Stress. **Nanobiotechnology**, [s. l.], p. 201–238, 2021.

SAMPAIO, Pedrita Alves *et al.* Development and validation of a high performance liquid chromatography-diode array detection (HPLC-DAD) method for the quantification of rutin and isoquercetin in *Morus nigra* L. (Moraceae). **African Journal of Biotechnology**, [s. l.], v. 17, n. 34, p. 1048–1056, 2018.

SÁNCHEZ-LÓPEZ, Elena *et al.* Memantine loaded PLGA PEGylated nanoparticles for Alzheimer's disease: In vitro and in vivo characterization. **Journal of Nanobiotechnology**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 1–16, 2018.

SÁNCHEZ-LÓPEZ, E. *et al.* PEGylated PLGA nanospheres optimized by design of experiments for ocular administration of dexibuprofen-in vitro, ex vivo and in vivo characterization. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], v. 145, p. 241–250, 2016.

SÁNCHEZ-SALCEDO, Eva M. *et al.* Phytochemical evaluation of white (*Morus alba* L.) and black (*Morus nigra* L.) mulberry fruits, a starting point for the assessment of their beneficial properties. **Journal of Functional Foods**, [s. l.], v. 12, p. 399–408, 2015a.

SÁNCHEZ-SALCEDO, Eva M. *et al.* (Poly)phenolic compounds and antioxidant activity of white (*Morus alba*) and black (*Morus nigra*) mulberry leaves: Their potential for new products rich in phytochemicals. **Journal of Functional Foods**, [s. l.], v. 18, p. 1039–1046, 2015b.

SÁNCHEZ-SALCEDO, Eva Ma *et al.* (Poly)phenolic fingerprint and chemometric analysis of white (*Morus alba* L.) and black (*Morus nigra* L.) mulberry leaves by using a non-targeted UHPLC-MS approach. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 212, p. 250–255, 2016.

SCALBERT, Augustin; WILLIAMSON, Gary. Chocolate: Modern Science Investigates an Ancient Medicine Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols 1. **J. Nutr**, [s. l.], v. 130, n. May, p. 2073–2085, 2000.

SCHAFRANSKI, Kathlyn *et al.* AVALIAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DE FOLHAS DE AMOREIRA

PRETA (*Morus nigra* L.) UTILIZANDO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL EVALUATION OF BIOACTIVE COMPOUNDS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF EXTRACTS OF BLACK MULBERRY. **Quim. Nova**, [s. l.], v. 00, p. 1–9, 2022.

SCHAFRANSKI, Kathlyn *et al.* Evaluation of bioactive compounds and antioxidant activity of extracts of black mulberry leaves (*Morus nigra* L.) using experimental design. **Quimica Nova**, [s. l.], v. 42, n. 7, p. 736–744, 2019.

SCHULZ, Eberhard; GORI, Tommaso; MÜNZEL, Thomas. Oxidative stress and endothelial dysfunction in hypertension. **Hypertension Research**, [s. l.], v. 34, n. 6, p. 665–673, 2011.

SENARAT, Setthapong *et al.* Antisolvent Eudragit® polymers based in situ forming gel for periodontal controlled drug delivery. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, [s. l.], v. 82, n. December 2022, p. 104361, 2023.

SEUFI, Alaa Eddeen M. *et al.* Protective effects of the aqueous extract of black mulberry leaves, *Morus nigra*, on chlorpyrifos toxicity in male albino rats. **Jordan Journal of Biological Sciences**, [s. l.], v. 12, n. 4, p. 385–393, 2019.

SHAIKH, Muhammad Vaseem; KALA, Manika; NIVSARKAR, Manish. Formulation and optimization of doxorubicin loaded polymeric nanoparticles using Box-Behnken design: ex-vivo stability and in-vitro activity. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 100, p. 262–272, 2017.

SHARANGI, Amit Baran; DATTA, Suchand. Value addition of horticultural crops: Recent trends and future directions. **Value Addition of Horticultural Crops: Recent Trends and Future Directions**, [s. l.], p. 1–342, 2015.

SHEIKH, Abu Baker *et al.* Blood Pressure Variability in Clinical Practice: Past, Present and the Future. **Journal of the American Heart Association**, [s. l.], v. 12, n. 9, p. 1–16, 2023.

SHIMOJO, A M; FERNANDES, Ana Rita V; FERREIRA, Nuno R E. Evaluation of the Influence of Process Parameters on the Properties of Resveratrol-Loaded NLC Using 2 2 Full Factorial Design. [s. l.],

SIDDIQUI, Shahida Anusha *et al.* Application of micro/nano-fluidics for encapsulation of food bioactive compounds - principles, applications, and challenges. **Trends in Food Science and Technology**, [s. l.], v. 136, n. January, p. 64–75, 2023.

SILVA, Dionísio Henrique Amaral da *et al.* Hexane fraction from Brazilian *Morus nigra* leaves improved oral carbohydrate tolerance and inhibits α -amylase and α -glucosidase activities in diabetic mice. **Natural Product Research**, [s. l.], v. 0, n. 0, p. 1–4, 2020.

SILVA, Jéssica Thaís do Prado *et al.* Analytical validation of an ultraviolet–visible procedure for determining lutein concentration and application to lutein-loaded nanoparticles. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 230, p. 336–342, 2017.

SILVA, Dionísio Henrique Amaral da *et al.* Hexane fraction from Brazilian *Morus nigra* leaves improved oral carbohydrate tolerance and inhibits α -amylase and α -glucosidase

activities in diabetic mice. **Natural Product Research**, [s. l.], v. 35, n. 22, p. 4785–4788, 2021.

SILVA, JAEVESON DA; SILVA, ELIVÂNIA SOARES DA; SILVA, PAULO SÉRGIO LIMA E. Determinação da qualidade e do teor de sólidos solúveis nas diferentes partes do fruto da pinheira (*Annona squamosa* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, [s. l.], v. 24, n. 2, p. 562–564, 2002.

SILVEIRA, Patrícia Fernandes; MAIA, Sandra Sely Silveira; COELHO, Maria de Fátima Barbosa. Potencial alelopático do extrato aquoso de cascas de Jurema Preta no desenvolvimento inicial de alface. **Revista Caatinga**, [s. l.], v. 25, n. 1, p. 20–27, 2012.

SINDLER, Amy L. *et al.* Nitrite supplementation reverses vascular endothelial dysfunction and large elastic artery stiffness with aging. **Aging Cell**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. 429–437, 2011.

SINGH, Gurinder; PAI, Roopa S. Atazanavir-loaded Eudragit RL 100 nanoparticles to improve oral bioavailability: Optimization and in vitro/in vivo appraisal. **Drug Delivery**, [s. l.], v. 23, n. 2, p. 532–539, 2016.

SINGH, Karuna; SRIVASTAVA, Neelabh. Recent trends in human and animal mycology. **Recent Trends in Human and Animal Mycology**, [s. l.], p. 1–280, 2019.

SOARES, Sandra *et al.* Effect of freeze-drying, cryoprotectants and storage conditions on the stability of secondary structure of insulin-loaded solid lipid nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 456, n. 2, p. 370–381, 2013.

SONG, Huaxin *et al.* Phenolic acid profiles of common food and estimated natural intake with different structures and forms in five regions of China. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 321, n. October 2018, 2020.

SOOD, Sumeet; JAIN, Kunal; GOWTHAMARAJAN, K. Optimization of curcumin nanoemulsion for intranasal delivery using design of experiment and its toxicity assessment. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], v. 113, p. 330–337, 2014.

SOSA-HERNÁNDEZ, Juan Eduardo *et al.* State-of-the-art extraction methodologies for bioactive compounds from algal biome to meet bio-economy challenges and opportunities. **Molecules**, [s. l.], v. 23, n. 11, 2018.

SOUTO, Eliana B. *et al.* Nanoparticle delivery systems in the treatment of diabetes complications. **Molecules**, [s. l.], v. 24, n. 23, p. 1–29, 2019.

SOUTO, Eliana B.; SEVERINO, Patrícia; SANTANA, Maria Helena A. Preparação de Nanopartículas Poliméricas a partir de Polímeros Pré-formados - Parte II. **Polímeros**, [s. l.], v. 22, n. 1, p. 101–106, 2012.

SOUZA, G. R. *et al.* Assessment of the antibacterial, cytotoxic and antioxidant activities of *Morus nigra* L. (Moraceae). **Brazilian Journal of Biology**, [s. l.], v. 78, n. 2, p. 248–254, 2018.

SOUZA, GR *et al.* Atividade antinociceptiva do extrato etanólico das folhas de *Morus nigra* L. (Moraceae). **Revista Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, [s. l.], v. 36, n. 1, 2015.

SOUZA, C. R.F. *et al.* Influência do processo de secagem e condição de armazenamento de extratos secos de bauhinia forficata e passiflora alata sobre seu perfil de dissolução. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 67–75, 2015.

SOUZA, Angela Vacaro de; VIEIRA, Marcos Ribeiro da Silva; PUTTI, Fernando Ferrari. Correlações entre compostos fenólicos e atividade antioxidante em casca e polpa de variedades de uva de mesa. **Brazilian Journal of Food Technology**, [s. l.], v. 21, n. 0, 2018.

SOWMYA SHREE, G. *et al.* β -carotene at physiologically attainable concentration induces apoptosis and down-regulates cell survival and antioxidant markers in human breast cancer (MCF-7) cells. **Molecular and Cellular Biochemistry**, [s. l.], v. 436, n. 1–2, p. 1–12, 2017.

SRIKAR, Grandhi; RANI, Avula Prameela. Study on influence of polymer and surfactant on in vitro performance of biodegradable aqueous-core nanocapsules of tenofovir disoproxil fumarate by response surface methodology. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 55, p. 1–11, 2019.

SRITHAM, Eakasit; GUNASEKARAN, Sundaram. FTIR spectroscopic evaluation of sucrose-maltodextrin-sodium citrate bioglass. **Food Hydrocolloids**, [s. l.], v. 70, p. 371–382, 2017.

SU, Hao *et al.* The role of critical micellization concentration in efficacy and toxicity of supramolecular polymers. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 117, n. 9, p. 4518–4526, 2020.

SZCZĘCH, Marta; SZCZEPANOWICZ, Krzysztof. Polymeric core-shell nanoparticles prepared by spontaneous emulsification solvent evaporation and functionalized by the layer-by-layer method. **Nanomaterials**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. 5–8, 2020.

TAG, Hend M. Hepatoprotective effect of mulberry (*Morus nigra*) leaves extract against methotrexate induced hepatotoxicity in male albino rat. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, [s. l.], v. 15, n. 1, 2015.

TAIN, You Lin; HSU, Chien Ning. Oxidative Stress-Induced Hypertension of Developmental Origins: Preventive Aspects of Antioxidant Therapy. **Antioxidants**, [s. l.], v. 11, n. 3, p. 1–20, 2022.

TAIN, You Lin; HSU, Chien Ning. Toxic dimethylarginines: Asymmetric dimethylarginine (ADMA) and symmetric dimethylarginine (SDMA). **Toxins**, [s. l.], v. 9, n. 3, 2017.

TALO YILDIRIM, Tuba *et al.* The effects of morus nigra on the alveolar bone loss in experimentally-induced periodontitis. **European Oral Research**, [s. l.], v. 53, n. 3, p. 99–105, 2019.

TANG, Hongjin *et al.* Interaction mechanism of flavonoids on bovine serum albumin: Insights from molecular property-binding affinity relationship. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, [s. l.], v. 239, p. 118519, 2020.

TANG, Qing *et al.* Synthesis and characterization of zinc oxide nanoparticles from *Morus nigra* and its anticancer activity of AGS gastric cancer cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, [s. l.], v. 202, p. 111698, 2020.

TASNEEM, Shumaila *et al.* Molecular pharmacology of inflammation: Medicinal plants as anti-inflammatory agents. **Pharmacological Research**, [s. l.], v. 139, p. 126–140, 2019.

TAVARES LUIZ, Marcela *et al.* Design of experiments (DoE) to develop and to optimize nanoparticles as drug delivery systems. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [s. l.], v. 165, n. July 2020, p. 127–148, 2021.

THOMAS, Riju K.; SUKUMARAN, Surya; SUDARSANAKUMAR, C. **Photobehaviour and in vitro binding strategy of natural drug, chlorogenic acid with DNA: A case of groove binding**. [S. l.]: Elsevier B.V., 2019-. ISSN 00222860.v. 1178

TJELLE, Torunn Elisabeth *et al.* Polyphenol-rich juices reduce blood pressure measures in a randomised controlled trial in high normal and hypertensive volunteers. **British Journal of Nutrition**, [s. l.], v. 114, n. 7, p. 1054–1063, 2015.

TOMAS, Merve *et al.* The effects of juice processing on black mulberry antioxidants. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 186, p. 277–284, 2015.

TORRES-FLORES, Gabriela; NAZENDE, Günday Türeli; EMRE, Türeli Akif. Preparation of Fenofibrate loaded Eudragit L100 nanoparticles by nanoprecipitation method. **Materials Today: Proceedings**, [s. l.], v. 13, p. 428–435, 2019.

TRENKENSCHUH, Eduard; FRIESS, Wolfgang. Freeze-drying of nanoparticles: How to overcome colloidal instability by formulation and process optimization. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [s. l.], v. 165, p. 345–360, 2021.

TURAN, Ibrahim *et al.* Antiproliferative and apoptotic effect of *Morus nigra* extract on human prostate cancer cells. **Saudi Pharmaceutical Journal**, [s. l.], v. 25, n. 2, p. 241–248, 2017.

TURANLI, Yasin; ACARTÜRK, Füsün. Preparation and characterization of colon-targeted pH/Time-dependent nanoparticles using anionic and cationic polymethacrylate polymers. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 171, p. 106122, 2022a.

TURANLI, Yasin; ACARTÜRK, Füsün. Preparation and characterization of colon-targeted pH/Time-dependent nanoparticles using anionic and cationic polymethacrylate polymers. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 171, 2022b.

TURGUT, Nergiz Hacer *et al.* Effect of black mulberry (*Morus nigra*) extract treatment on cognitive impairment and oxidative stress status of D-galactose-induced aging mice. **Pharmaceutical Biology**, [s. l.], v. 54, n. 6, p. 1052–1064, 2016.

- UBRICH, N. *et al.* Oral evaluation in rabbits of cyclosporin-loaded Eudragit RS or RL nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 288, n. 1, p. 169–175, 2005.
- V. PRUSOV, Evgeny. Natural Product-Based Antibiotics: Synthesis and SAR-Studies. **Current Pharmaceutical Design**, [s. l.], v. 22, n. 12, p. 1730–1755, 2016.
- VAN POPPEL, G; GOLDBOHN, RA. Epidemiologic evidence for beta-carotene and cancer prevention. **The American Journal of clinical nutrition**, [s. l.], n. 6suppl, p. 1393s–1402s, 1995.
- VÁZQUEZ, Cecilia Velázquez *et al.* Total phenolic compounds in milk from different species. Design of an extraction technique for quantification using the Folin-Ciocalteu method. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 176, p. 480–486, 2015.
- VAZQUEZ, Zoë G.S.; KLINGER, James R. Guidelines for the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension. **Lung**, [s. l.], v. 198, n. 4, p. 581–596, 2020.
- VENUGOPAL, Vijayan *et al.* Optimization and in-vivo evaluation of isradipine nanoparticles using Box-Behnken design surface response methodology. **OpenNano**, [s. l.], v. 1, p. 1–15, 2016.
- VIJAYAN, K.; SARATCHANDRA, B.; TEIXEIRA DA SILVA, Jaime A. Germplasm conservation in mulberry (*Morus* spp.). **Scientia Horticulturae**, [s. l.], v. 128, n. 4, p. 371–379, 2011.
- VYAS, Kunj; RATHOD, Maharshsinh; PATEL, Mayur M. Insight on nano drug delivery systems with targeted therapy in treatment of oral cancer. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, [s. l.], v. 49, p. 102662, 2023.
- WALKOWIAK-BRÓDKA, Agata *et al.* Analysis of White Mulberry Leaves and Dietary Supplements, ATR-FTIR Combined with Chemometrics for the Rapid Determination of 1-Deoxynojirimycin. **Nutrients**, [s. l.], v. 14, n. 24, p. 1–14, 2022.
- WANG, Meng *et al.* An evolving technology that integrates classical methods with continuous technological developments: Thin-layer chromatography bioautography. **Molecules**, [s. l.], v. 26, n. 15, 2021.
- WANG, Wei *et al.* Extraction of polysaccharides from black mulberry fruit and their effect on enhancing antioxidant activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 120, p. 1420–1429, 2018.
- WANG, Yichao *et al.* Manufacturing techniques and surface engineering of polymer based nanoparticles for targeted drug delivery to cancer. **Nanomaterials**, [s. l.], v. 6, n. 2, p. 1–18, 2016.
- WATKINSON, Adam C. *et al.* Nanoparticles do not penetrate human skin - A theoretical perspective. **Pharmaceutical Research**, [s. l.], v. 30, n. 8, p. 1943–1946, 2013.
- WIGNER, Paulina *et al.* Disturbance of cellular homeostasis as a molecular risk evaluation of human endothelial cells exposed to nanoparticles. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 11, n. 1, 2021.

WILCK, Nicola *et al.* Salt-responsive gut commensal modulates TH17 axis and disease. **Nature**, [s. l.], v. 551, n. 7682, p. 585–589, 2017.

WITTENBORN, Elizabeth C.; MARLETTA, Michael A. Structural perspectives on the mechanism of soluble guanylate cyclase activation. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 22, n. 11, 2021.

WU, Hao *et al.* Preparation, characterization and long-term antibacterial activity of nisin anchored magnetic cellulose beads. **Cellulose**, [s. l.], v. 27, n. 1, p. 357–367, 2020.

XU, Liangjin *et al.* Chiral separation, absolute configuration, and bioactivity of two pairs of flavonoid enantiomers from *Morus nigra*. **Phytochemistry**, [s. l.], v. 163, n. 94, p. 33–37, 2019.

XU, Jiang *et al.* Development of hydrophilic drug encapsulation and controlled release using a modified nanoprecipitation method. **Processes**, [s. l.], v. 7, n. 6, 2019.

YABRÉ, Moussa *et al.* Greening Reversed-Phase Liquid Chromatography Pharmaceutical Analysis. **Molecules: A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Products Chemistry**, [s. l.], v. 23, 2018.

YANG, Nae Cherng; JHOU, Kun Yan; TSENG, Chin Yin. Antihypertensive effect of mulberry leaf aqueous extract containing γ -aminobutyric acid in spontaneously hypertensive rats. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 132, n. 4, p. 1796–1801, 2012.

YAXLEY, JulianP; THAMBAR, SamV. Resistant hypertension: an approach to management in primary care. **Journal of Family Medicine and Primary Care**, [s. l.], v. 4, n. 2, p. 193, 2015.

YILMAZ, Serkan; UÇAR, Asli; GÖKTAŞ, Bayram. Genotoxic and genoprotective potential of black mulberry (*Morus nigra*) fruit. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, [s. l.], v. 91, n. 4, 2019.

YOO, Hyuk Sang; CHOI, Hoo Kyun; PARK, Tae Gwan. Protein-fatty acid complex for enhanced loading and stability within biodegradable nanoparticles. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 90, n. 2, p. 194–201, 2001.

ZAGALO, Daniela M.; SOUSA, João; SIMÕES, Sérgio. Quality by design (QbD) approach in marketing authorization procedures of Non-Biological Complex Drugs: A critical evaluation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [s. l.], v. 178, n. July, p. 1–24, 2022.

ZAWIAH, Mohammed *et al.* Food-drug interactions: Knowledge among pharmacists in Jordan. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 15, n. 6, p. 1–12, 2020.

ZENI, Ana Lúcia Bertarello *et al.* Evaluation of phenolic compounds and lipid-lowering effect of *Morus nigra* leaves extract. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, [s. l.], v. 89, n. 4, p. 2805–2815, 2017.

ZHANG, Yuanyuan *et al.* Comparison of non-covalent binding interactions between three whey proteins and chlorogenic acid: Spectroscopic analysis and molecular docking. **Food Bioscience**, [s. l.], v. 41, n. February, p. 101035, 2021.

ZHANG, Weisen *et al.* Development of Polymeric Nanoparticles for Blood–Brain Barrier Transfer—Strategies and Challenges. **Advanced Science**, [s. l.], v. 8, n. 10, p. 1–32, 2021.

ZHANG, Yunyue *et al.* Interaction of phenolic acids and their derivatives with human serum albumin: Structure–affinity relationships and effects on antioxidant activity. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 240, n. July 2017, p. 1072–1080, 2018.

ZHOU, R *et al.* Evaluation of anti-inflammatory, antimicrobial and wound healing activity of *Morus nigra*. **South African Journal of Botany**, [s. l.], v. 124, p. 540–545, 2019.

ZHOU, Bin *et al.* Worldwide trends in blood pressure from 1975 to 2015: a pooled analysis of 1479 population-based measurement studies with 19·1 million participants. **The Lancet**, [s. l.], v. 389, n. 10064, p. 37–55, 2017.

ZIELINSKA, Aleksandra *et al.* Alpha-Pinene-loaded solid lipid nanoparticles dispersion analysis. **Molecules**, [s. l.], v. 24, p. 2683, 2019.

ZOOFISHAN, Zoofishan *et al.* Antispasmodic Activity of Prenylated Phenolic Compounds from the Root Bark of *Morus nigra*. **Molecules**, [s. l.], v. 24, n. 13, p. 2497, 2019.

ZOOFISHAN, Zoofishan; HOHMANN, Judit; HUNYADI, Attila. Phenolic antioxidants of *Morus nigra* roots, and antitumor potential of morusin. **Phytochemistry Reviews**, [s. l.], v. 17, n. 5, p. 1031–1045, 2018.

ZORZI, Michael *et al.* Identification of Polyphenolic Compounds in Edible Wild Fruits Grown in the North-West of Italy by Means of HPLC-DAD-ESI HRMS. **Plant Foods for Human Nutrition**, [s. l.], v. 75, n. 3, p. 420–426, 2020.

APÊNDICE A -DISTRIBUIÇÃO DE DIÂMETRO

Figura 1- Gráfico de distribuição de diâmetro obtido por DLS a partir da desejabilidade por nanoprecipitação

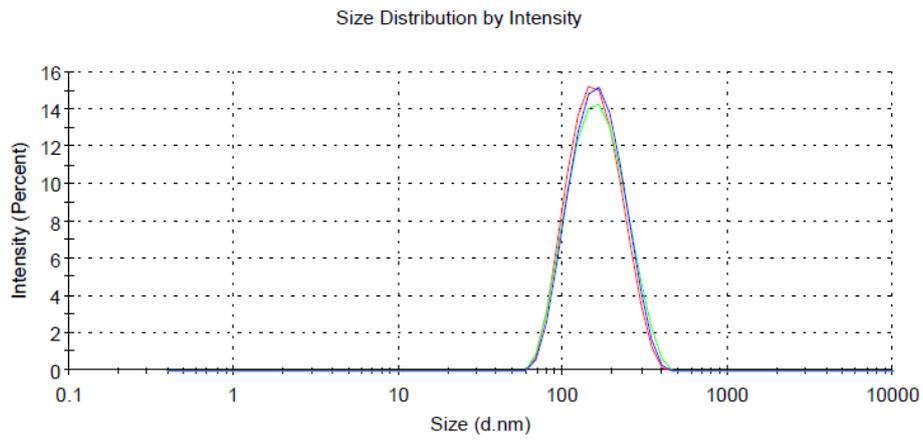
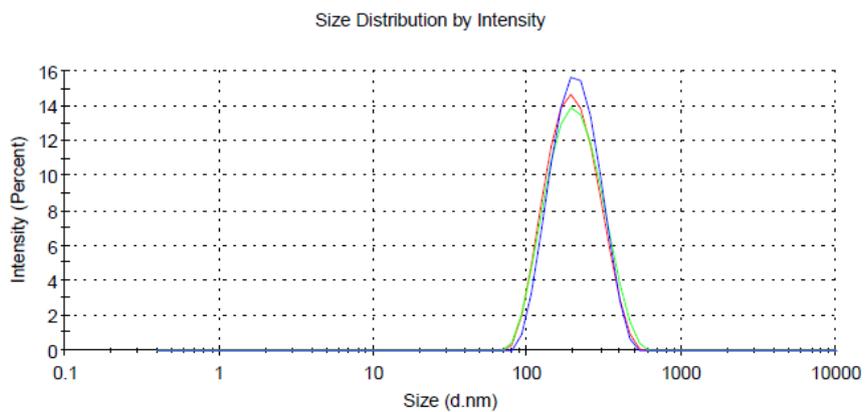


Figura 2- Gráfico de distribuição de diâmetro obtido por DLS a partir da desejabilidade por dupla emulsificação



ANEXO A – PRODUÇÕES

Imagem 1- Artigo publicado

Send Orders for Reprints to reprints@benthamscience.net

The Natural Products Journal, XXXX, XX, 1-33

1

SYSTEMATIC REVIEW ARTICLE

Phytochemical, Pharmacological, and Toxicological Prospecion of *Morus nigra* L.: A Systematic ReviewLarissa Pereira Alves^{1,2,*}, Widson Michael dos Santos¹, Myla Lôbo de Souza¹, Larissa Araújo Rolim² and Pedro José Rolim-Neto¹¹Laboratory of Drug Technology, Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pernambuco. Av. Prof. Artur de Sá - Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brazil; ²Drug, Medicine and Food Analytical Center; College of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Vale do São Francisco. Av. José de Sá Maniçoba, Petrolina, Pernambuco**Abstract:** *Introduction:* *Morus nigra* L. has industrial relevance due to the presence of specialized metabolites, which possess pharmaceutical potential in various parts and preparations. This review presents updated information on traditional, phytochemical, and pharmacological applications, as well as toxicity data, pertaining to different parts of *Morus nigra* L.**Method:** Phytochemical research and ethnobotanical studies were conducted using reviewed databases. Mulberry leaves have demonstrated several biological activities, attributed to the presence of phenolic acids, flavonoids, and fatty acids. Stems and roots contain additional compounds such as stilbenes and benzofurans. *Morus nigra* L. exhibits various biological activities, including hepatoprotective, hypolipidemic, anti-inflammatory, antioxidant, antimicrobial, neuroprotective, hypoglycemic, skin whitening, cytotoxic, antiatherosclerotic, and antiobesity effects. The choice of extraction technique and plant part is crucial to obtain a diverse range of compounds necessary for specific indications.**Result:** Accelerated solvent extraction (ASE) has proven to be the most advantageous method compared to supercritical fluid maceration and extraction (SFE), yielding a wide variety of compounds.**Conclusion:** Overall, this review aims to provide scientists and companies interested in *Morus nigra* L. with opportunities and challenges for innovation in this field.

ARTICLE HISTORY

Received: March 25, 2023

Revised: April 28, 2023

Accepted: May 05, 2023

DOI:

10.2174/2210315514666230713164021

Keywords: Pharmaceutical potential, mulberry, extraction process, medicinal properties, *Morus nigra* L., accelerated solvent extraction.

1. INTRODUCTION

The genus *Morus* (Moraceae), commonly known as mulberry, comprises at least 24 species and over 100 varieties. These species are primarily distributed in the Northern temperate zone, capable of thriving in temperate to subtropical regions, and can even grow at altitudes of up to 4000 m [1, 2]. Some of the most well-known species include *Morus alba* L. (white mulberry), *Morus australis* Poir (Chinese mulberry), *Morus insignis* Bureau (American mulberry), *Morus mesozygia* Stapf (African mulberry), *Morus microphylla* Buckley (Texas mulberry), *Morus nigra* L. (blackmulberry), and *Morus rubra* L. (red mulberry) [3].

In Asian countries, mulberry leaves serve as a crucial nutrient source to produce silkworms (*Bombyx mori* L.). China, India, Vietnam, Uzbekistan, Brazil, Thailand, and Bangladesh are prominent leaders in silkworm production.

While the nutritional value of mulberry fruits has garnered greater interest, they are consumed in various forms, including fresh and processed variants such as juices, jellies, syrups, natural dyes, and dehydrated fruits. Additionally, they are also used in the production of cosmetic products [4, 5].

Among the main species within this genus, *Morus nigra* L. is native to Southwest Asia. This plant can be found in temperate and subtropical regions of Asia, Africa, and North America, and it has the ability to grow in a wide range of climatic, topographic, and soil conditions [6]. Traditional medicine has attributed various uses to different parts (leaves, stems, roots) and preparations (infusion, decoction, maceration, etc.) of *Morus nigra* L., administered through different routes (oral or topical). Phytochemical studies have identified phenolic constituents as the primary components responsible for the plant's hepatoprotective [7-9], hypolipidemic [10], anti-inflammatory, antioxidant, antimicrobial [11-13], neuroprotective [14], hypoglycemic [15-17], hypotensive and anti-cancer activities [1, 18-20].

*Address correspondence to this author at the Laboratory of Drug Technology, Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pernambuco. Av. Prof. Artur de Sá - Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brazil; E-mails: larissaapereira@hotmail.com; larissa.pereira@ufpe.br

Imagem 2- Artigo publicado

Send Orders for Reprints to reprints@benthamscience.net

Recent Patents on Biotechnology, XXXX, XX, 000-000

1

SYSTEMATIC REVIEW ARTICLE

Herbal Technological Prospects of *Morus nigra* L.: A Systematic Patent Analysis Review

Larissa Pereira Alves^{1,*}, Widson Michael dos Santos¹, Myla Lôbo de Souza¹, Larissa Araújo Rolim² and Pedro José Rolim-Neto¹

¹Laboratory of Drug Technology, Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pernambuco. Av. Prof. Artur de Sá - Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brazil; ²Drug, Medicine and Food Analytical Center, College of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Vale do São Francisco, Av. José de Sá Maniçoba, Petrolina, Pernambuco

Abstract: Background: *Morus nigra* L. is a plant with significant potential for drug development due to the presence of numerous bioactive compounds in its various parts.

Objectives: This article aims to compile the technological perspectives of *Morus nigra* L. towards drug development and therapeutic indications based on registered patents in databases.

Methods: The study analyzed patents published within the last five years, focusing on products derived from different parts of the *Morus nigra* L. plant. Patent databases such as the European Patent Office (EPO), the United States Patent and Trademark Office (USPTO), the World Intellectual Property Organization (WIPO), and the National Institute of Industrial Property Databases (INPI) were examined.

Results: A total of 45 patents were categorized by country of origin, type of applicant, extraction method, and therapeutic indications. China had the highest number of patent filings (43.48%), and private companies were the primary technology patent holders (38.64%). Noteworthy extraction methods included ultrasound-assisted extraction, decoc-tion, infusion, and maceration. The most utilized plant parts were leaves (44.44%), fol-lowed by fruits (35.56%), root bark (15.56%), and stems (4.44%). The main therapeutic indications identified were the treatment of hyperglycemia and dyslipidemia (43.33%), along with digestive problems, cosmetics, nutrition, and cleaning applications.

Conclusion: The study of patents covers discoveries and advancements often absent in scientific articles, making a review focused on this advanced information crucial for expanding existing scientific knowledge. Even if some therapies have been explored previously, patents can reveal innovative approaches and fresh perspectives that contribute to sustained scientific progress.

ARTICLE HISTORY

Received: May 15, 2023
Revised: June 18, 2023
Accepted: July 14, 2023

DOI:
10.2174/1872208317666230821102411

Keywords: *Morus nigra* L., patent analysis, biological activities, technological evolution, drug development, hyperglycemia.

1. INTRODUCTION

Morus nigra L. (black mulberry) is a nutritious food that belongs to the Moraceae family, which

comprises twenty-four species. The mulberry tree is capable of thriving in a diverse range of conditions, including temperate to subtropical regions and altitudes of up to 4000 m [1]. The primary bioactive metabolites present in black mulberry fruits encompass benzoic and cinnamic acid derivatives (phenolic acids), quercetin glycosides (flavonoids), as well as cyanidin and pelargonidin glycosides (anthocyanins) [1, 2]. The extraction of

*Address correspondence to this author at the Laboratory of Drug Technology, Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pernambuco, Av. Prof. Artur de Sá - Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brazil;
E-mail: larissaapereira@hotmail.com

Imagem 3- Trabalho apresentado



Universidade
Estadual da
Paraíba



UFRN
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE



CONCAF

IV Congresso de
Ciências Aplicadas à
Farmácia
Online



ISBN: 978-65-998631-3-4
9 786599 863134

CERTIFICADO DE APRESENTAÇÃO

O IV Congresso de Ciências Aplicadas à Farmácia - CONCAF, online, realizado durante os dias 25 a 28 de outubro de 2023, concede o certificado de apresentação na modalidade e-pôster ao trabalho intitulado “**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS DAS FOLHAS DE *Morus nigra* L.**”, dos autores **Larissa Pereira Alves, Bruna Fernanda de Lima Arruda Holanda, Maria Lavinya Arruda da Rocha, Samilly Gabrielly dos Santos Sales, Joaquim Gomes de Melo, Pedro José Rolim-Neto.**



Prof. Dr. João Augusto Oshiro Junior
Coordenador do CONCAF



Prof. Dr. Arnóbio Antônio da Silva Júnior
Coordenador do CONCAF