



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS I - CAMPINA GRANDE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

CAMILA BEATRIZ BARROS ARAÚJO

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA TERAPÊUTICO TRANSDÉRMICO HÍBRIDO
À BASE DE *Annona muricata* L. COM POTENCIAL ANTIINFLAMATÓRIO:
CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, AVALIAÇÕES *IN VITRO* E *IN VIVO***

**CAMPINA GRANDE, PB
2023**

CAMILA BEATRIZ BARROS ARAÚJO

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA TERAPÊUTICO TRANSDÉRMICO HÍBRIDO
À BASE DE *Annona muricata* L. COM POTENCIAL ANTIINFLAMATÓRIO:
CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, AVALIAÇÕES *IN VITRO* E *IN VIVO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Mestra em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Desenvolvimento e controle de qualidade de produtos farmacêuticos.

Orientador: Prof. Dr. João Augusto Oshiro Júnior

**CAMPINA GRANDE, PB
2023**

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

A663d Araújo, Camila Beatriz Barros.
Desenvolvimento de sistema terapêutico transdérmico híbrido à base de *Annona muricata* L. com potencial antiinflamatório [manuscrito] : caracterização físico-química, avaliações *in vitro* e *in vivo* / Camila Beatriz Barros Araújo. - 2023.
89 p. : il. colorido.
Digitado.
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2023.
"Orientação : Prof. Dr. João Augusto Oshiro Junior, Departamento de Farmácia - CCBS. "
1. Sistema terapêutico transdérmico. 2. Insumo farmacêutico ativo vegetal. 3. Doença inflamatória crônica. I.
Título
21. ed. CDD 615.32

CAMILA BEATRIZ BARROS ARAÚJO

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA TERAPÊUTICO TRANSDÉRMICO HÍBRIDO
À BASE DE *Annona muricata* L. COM POTENCIAL ANTIINFLAMATÓRIO:
CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, AVALIAÇÕES *IN VITRO* E *IN VIVO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Mestra em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Desenvolvimento e controle de qualidade de produtos farmacêuticos.

APROVADA EM: 30/03/2023

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. João Augusto Oshiro-Junior (Orientador)



Prof.^a Dr.^a Vanda Lucia dos Santos (Examinador interno)



Prof.^a Dr.^a Magda Rhayanny Assunção Ferreira (Examinador externo)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por minha vida e por todo seu amor e sustento durante minha trajetória, sem Ele nenhuma conquista seria possível.

Agradeço aos meus pais Rivalda da Silva Barros e José Edgley Araújo e meu irmão Danilo Pablo por nunca medirem esforços para mim, e aos meus sonhos. Obrigada por todo suporte e amparo nos meus desafios e dificuldades, vocês são meu alicerce.

Agradeço ao meu namorado, Bruno Emanuel por estar sempre ao meu lado, com todo seu amor e cumplicidade, por me fortalecer e apoiar durante toda essa trajetória.

Obrigada por me fazerem acreditar que tudo é possível, quando se tem amor e determinação! Amo vocês.

Agradeço ao meu orientador, João Augusto Oshiro Junior por ter sido tão solícito comigo, pela sua competência e acima de tudo por ter acreditado em mim e me acolhido. Serei eternamente grata por todas suas contribuições na minha formação acadêmica e pessoal.

Aos meus colegas de mestrado e laboratório: Luana, Kammila, José, Diego, Ingrid, Demis, Cris e todos que direta ou indiretamente me ajudaram com seus conhecimentos, suporte e companherismo.

As equipes dos laboratórios de ensaios farmacológicos, LABDEM e LDCPF por ter me possibilitado realizar todos os experimentos, agregando na minha formação acadêmica.

A todos os professores e técnicos que fizeram parte da minha formação, agradeço por todo conhecimento prestado.

A instituição, UEPB, por ter me acolhido e por ter me feito chegar até aqui!

A todos, minha eterna gratidão.

RESUMO

A artrite reumatóide é uma doença inflamatória crônica que causa destruição tecidual e deformidades. É uma doença incapacitante, mas com o diagnóstico precoce linhas de tratamento podem ser implantadas para retardar o avanço da doença. Os medicamentos disponíveis e comumente utilizados são os antiinflamatórios não esteroides, glicocorticóides e antirreumáticos, entretanto o uso crônico desses fármacos possui limitações devido aos efeitos adversos. Com isso, a busca e o desenvolvimento de um tratamento baseado em insumo farmacêutico ativo vegetal (IFAV) e sistemas terapêuticos transdérmicos (STT) tornam-se promissor e necessário. O objetivo desse estudo foi de obter o extrato a partir das folhas de *Annona muricata*, desenvolver e caracterizar um sistema terapêutico transdérmico contendo o extrato, assim como avaliar a atividade antiinflamatória. O IFAV foi caracterizado através das análises granulométrica, densidade aparente, perda por dessecação, pH e teor de cinzas. Em seguida, foi realizada a quantificação dos flavonoides totais. O extrato foi caracterizado por termogravimetria, e analisado a citotoxicidade em linhagem celular de hepatoma humano (HepG2). Os ensaios *in vivo*, corresponderam ao teste de toxicidade aguda do extrato e o teste de edema de pata induzido por zymosan 2%, nas concentrações de 10, 100 e 200 mg/kg. A segunda parte da pesquisa constituiu de desenvolver STT, primeiramente foram sintetizados os materiais híbridos pelo método sol-gel. A caracterização físico-química foi realizada por microscopia de força atômica (MFA), espalhamento de raios-X de pequeno ângulo (SAXS) e termogravimetria (TG). O estudo *in vivo* foi realizado frente ao teste de edema de pata. Os resultados referente às características físico-químicas da droga vegetal revelam um pó moderadamente grosso, com densidade de $0,30 \pm 0,01$ g/mL, perda por dessecação de $8,82 \pm 3,4\%$, pH $5,54 \pm 0,1$, cinza totais de $8,04\% \pm 0,26$ e cinzas insolúveis em ácido de $1,56 \pm 0,19$. A termogravimetria apresentou três eventos, o primeiro entre $31,55$ e $200,05$ °C com perda de massa (Δm) de $24,34\%$, o segundo $200,05$ e $376,38$ °C, com Δm de $37,92\%$ e, o terceiro com entre $376,38$ e $499,41$ °C, com Δm de $14,08\%$. Os eventos foram associados à perda de produtos voláteis e degradações de micro e macronutrientes. O método maceração, na proporção 70:30 etanol/água e concentração 2% do IFAV resultou em um extrato com maior concentração de flavonóides totais. Nos resultados de citotoxicidade *in vitro*, o IC50 do extrato foi $8,95 \pm 0,21$ µg/mL e, em concentrações menores ou iguais a $0,20781$ µg/ml não apresentaram citotoxicidade. O teste *in vivo* de toxicidade aguda por meio do *screening hipocrático* e análise dos órgãos não revelou nenhuma alteração significativa nos sinais dos animais tratados com dose de 2000 mg/kg durante os 14 dias de análise. O modelo para

atividade antiinflamatório por edema de pata demonstrou que redução de 100% para o grupo tratado com o extrato na concentração de 10mg/kg, sustentando por 4 horas. Posteriormente, o sistema híbrido foi sintetizado e o extrato foi incorporado na proporção de 6% m/m. Os resultados visuais demonstram um sistema homogêneo com coloração verde-escura. A MFA revelou poros na superfície do material da ordem de 1,575 μm . O SAXS demonstra que os “nós de silício” apresentam distância de 2,33 nm e aumentam para 33 nm após 30 minutos no teste de intumescimentonanoscopico. A termogravimetria revelou que o extrato apresenta maior estabilidade térmica quando incorporado no sistema. Por fim, o teste *in vivo* revelou que, a pomada comercial e o sistema com extrato após 30min, 1, 2, 4 e 6hrs apresentaram inibição de 28,15; 31,06; 75,72; 44,66 e 37,86% e 23,30; 94,17; 118,44; 84,46 e 43,68%), respectivamente, demonstrando que o sistema desenvolvido tem melhor atividade antiinflamatória.

Palavras chave: inflamação; flavonóides; graviola; sistemas híbridos.

ABSTRACT

Rheumatoid arthritis is a chronic inflammatory disease that causes tissue destruction and deformities. It is a disabling disease, but with early diagnosis lines of treatment can be implemented to slow the progression of the disease. The available and commonly used drugs are non-steroidal anti-inflammatory drugs, glucocorticoids and anti-rheumatics, however the chronic use of these drugs has limitations due to adverse effects. With this, the search and development of a treatment based on plant active pharmaceutical ingredient (IFAV) and transdermal therapeutic systems (STT) become promising and necessary. The objective of this study was to obtain the extract from the leaves of *Annona muricata*, to develop and characterize a transdermal therapeutic system containing the extract, as well as to evaluate the anti-inflammatory activity. The IFAV was characterized through granulometric analyses, bulk density, loss on drying, pH and ash content. Then, the quantification of total flavonoids was performed. The extract was characterized by thermogravimetry, and analyzed for cytotoxicity in a human hepatoma cell line (HepG2). The in vivo assays corresponded to the acute toxicity test of the extract and the paw edema test induced by 2% zymosan, at concentrations of 10, 100 and 200 mg/kg. The second part of the research consisted of developing STT, firstly the hybrid materials were synthesized by the sol-gel method. The physical-chemical characterization was performed by atomic force microscopy (AFM), small angle X-ray scattering (SAXS) and thermogravimetry (TG). The in vivo study was performed against the paw edema test. The results regarding the physicochemical characteristics of the plant drug reveal a moderately thick powder, with a density of 0.30 ± 0.01 g/mL, loss on desiccation of $8.82 \pm 3.4\%$, pH 5.54 ± 0.1 , total ash $8.04\% \pm 0.26$ and acid insoluble ash 1.56 ± 0.19 . Thermogravimetry showed three events, the first between 31.55 and 200.05 °C with a mass loss (Δm) of 24.34%, the second between 200.05 and 376.38°C, with a Δm of 37.92% and the third with between 376.38 and 499.41 °C, with Δm of 14.08%. The events were associated with the loss of volatile products and degradation of micro and macronutrients. The maceration method, in a 70:30 ethanol/water ratio and 2% concentration of IFAV, resulted in an extract with a higher concentration of total flavonoids. In the in vitro cytotoxicity results, the IC₅₀ of the extract was 8.95 ± 0.21 µg/ml and, in concentrations lower than or equal to 0.20781 µg/ml, they did not show cytotoxicity. The in vivo test of acute toxicity through Hippocratic screening and organ analysis did not reveal any significant change in the signs of animals treated with a dose of 2000 mg/kg during the 14 days of analysis. The model for anti-inflammatory activity by paw edema showed a 100% reduction for the group treated with the

extract at a concentration of 10mg/kg, sustained for 4 hours. Subsequently, the hybrid system was synthesized and the extract was incorporated in the proportion of 6% m/m. Visual results demonstrate a homogeneous system with a dark green color. AFM revealed pores on the surface of the material in the order of 1.575 μm . SAXS demonstrates that the “silicon knots” have a distance of 2.33 nm and increase to 33 nm after 30 minutes in the nanoscopic swelling test. Thermogravimetry revealed that the extract has greater thermal stability when incorporated into the system. Finally, the in vivo test revealed that the commercial ointment and the system with extract after 30min, 1, 2, 4 and 6hrs showed inhibition of 28.15; 31.06; 75.72; 44.66 and 37.86% and 23.30; 94.17; 118.44; 84.46 and 43.68%, respectively, demonstrating that the developed system has better anti-inflammatory activity.

Keywords: inflammation; flavonoids; soursop; hybrid systems.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ilustração da cascata de inflamação	16
Figura 2 – Esquema da patogênese da artrite reumatoide.....	18
Figura 3 – Ilustração da <i>Annona muricata</i> L.....	21
Figura 4 – Estrutura tridimensional de um composto híbrido.....	26
Figura 5 – Reações químicas envolvidas no processo do tipo sol-gel em materiais híbridos	27
Figura 6 – Exemplar de híbridos do tipo ureasil-poliéter	28
Figura 7 – Fluxograma das etapas envolvidas na metodologia do estudo	29
Figura 8 – Etapas de limpeza, pesagem, secagem e moagem do material vegetal.....	38
Figura 9 – Droga vegetal obtida das folhas de <i>Annona muricata</i> L.....	40
Figura 10 – Curva analítica da quercetina.....	43
Figura 11 – Ilustração dos doze extratos experimentais	44
Figura 12 – Remoção do solvente no extrato de <i>Annona muricata</i> por rotaevaporação	45
Figura 13 – Extrato de <i>Annona muricata</i> L. obtido por evaporação rotativa.....	46
Figura 14 – Curva termogravimétrica do extrato de <i>Annona muricata</i>	47
Figura 15 – Viabilidade celular (%) de células HepG2 tratadas com diferentes concentrações do extrato de <i>Annona muricata</i> L.	48
Figura 16 – Observação dos órgãos dos animais ao fim do teste de toxicidade aguda	52
Figura 17 – Gráfico de dose resposta do extrato de <i>Annona muricata</i> frente ao ensaio de edema de pata induzida por zymozan	54
Figura 18 – Processo de preparo do precursor híbrido	60
Figura 19 – Sistemas híbridos contendo <i>Annona muricata</i>	64
Figura 20 – Imagem topográfica do ureasil-PEO 500 puro e com extrato incorporado.....	65
Figura 21 – Evolução temporal das curvas SAXS para sistemas ureasil-PEO500.	66
Figura 22 – Intumescimento nanoscópico em função do tempo de contato com tampão fosfato.....	68
Figura 23 – Curvas termogravimétricas do extrato puro e do material com extrato incorporado.....	69
Figura 24 – Curva termogravimétrica do material puro (POE 500).....	70
Figura 25 – Liberação do extrato de <i>Annona muricata</i> em função do tempo (minutos)	71
Figura 26 – Gráfico de resposta do sistema de <i>Annona muricata</i> (S. AM 6%) frente ao ensaio de edema de pata induzida por zymozan em função do tempo	74
Figura 27 – Imagem dos animais frente ao ensaio de edema de pata induzida por zymosan .	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características físico-químicas da droga vegetal de <i>A. muricata</i>	40
Tabela 2 – Distribuição granulométrica do pó das folhas de <i>A. muricata</i>	41
Tabela 3 – Absorbâncias relativas à curva de calibração da quercetina obtida no estudo de linearidade	42
Tabela 4 – Análise preliminar para obtenção de melhor resultado em concentração [mg/g] de flavonóides	44
Tabela 5 – Efeito do tratamento com extrato de <i>Annona muricata</i> na mudança de peso dos animais. Valores correspondentes a média e desvio padrão.	49
Tabela 6 – Efeito do tratamento com extrato de <i>Annona muricata</i> no consumo diário de água e ração de camundongos fêmeas. Valores correspondentes a média e desvio padrão.....	49
Tabela 7 – Sinais de toxicidade do extrato de <i>Annona muricata</i> observados através do screening hipocrático	50
Tabela 8 – Peso dos órgãos de camundongos fêmeas tratadas com extrato de <i>Annona muricata</i> , após 14 dias. Valores correspondentes a média e desvio padrão.....	51
Tabela 9 – Descrição dos materiais e quantidades na preparação do precursor.....	60
Tabela 10 – Posição dos picos no vetor espalhamento qmax e distância de correlação “d” entre os grupos siloxano e a região polimérica da matriz para os híbridos ureasil-PEO500... ..	67

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	14
2.1	Objetivo geral	14
2.2	Objetivos específicos	14
3	REFERENCIAL TEÓRICO	15
3.1	Inflamação	15
3.2	Artrite reumatóide	17
3.3	Tratamentos convencionais	19
3.4	<i>Annona muricata</i> L.	20
3.5	Sistema terapêutico transdérmico (materiais híbridos orgânico-inorgânico)	24
3.5.1	<i>Materiais híbridos do tipo ureasil-poliéter</i>	27
4	METODOLOGIA	29
5	CAPÍTULO I- CONTROLE DE QUALIDADE DO MATERIAL VEGETAL, OBTENÇÃO DO EXTRATO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA DO EXTRATO DE <i>ANNONA MURICATA</i> L.	31
5.1	Introdução	31
5.2	Metodologia	32
5.2.1	<i>Coleta e preparação do material vegetal</i>	32
5.2.2	<i>Controle de qualidade da droga vegetal</i>	32
5.2.2.1	<i>Análise granulométrica</i>	32
5.2.2.2	<i>Densidade aparente</i>	33
5.2.2.3	<i>Perda por dessecação</i>	33
5.2.2.4	<i>Determinação do pH</i>	33
5.2.2.5	<i>Cinzas totais</i>	33
5.2.2.6	<i>Cinzas insolúveis em ácido</i>	33
5.2.3	<i>Obtenção do extrato de <i>Annona muricata</i></i>	34
5.2.4	<i>Quantificação de flavonóides totais</i>	34
5.2.5	<i>Termogravimetria (TG)</i>	34
5.2.6	<i>Análise de citotoxicidade do extrato de <i>Annona muricata</i> L.</i>	35
5.2.7	<i>Estudos in vivo</i>	35
5.2.7.1	<i>Local da Pesquisa</i>	35
5.2.7.2	<i>Animais</i>	36
5.2.8	<i>Avaliação toxicológica in vivo</i>	36
5.2.8.1	<i>Toxicidade aguda</i>	36
5.2.9	<i>Avaliação farmacológica</i>	37
5.2.9.1	<i>Edema de pata induzido por zymosan</i>	37

5.2.10 <i>Análise estatística</i>	37
5.3 Resultados e Discussão	38
5.3.1 <i>Coleta, limpeza, secagem e moagem</i>	38
5.3.2 <i>Caracterização da droga vegetal</i>	39
5.3.3 <i>Quantificação de flavonoides e curva analítica</i>	42
5.3.4 <i>Obtenção do extrato de Annona muricata</i>	43
5.3.5 <i>Termogravimetria</i>	46
5.3.6 <i>Análise de citotoxicidade do extrato de Annona muricata L.</i>	47
5.3.7 <i>Estudos in vivo</i>	48
5.3.7.1 <i>Toxicidade aguda</i>	48
5.3.7.2 <i>Edema de pata induzido por zymosan</i>	52
5.4 Conclusão	57
6 CAPÍTULO II- INCORPORAÇÃO DO EXTRATO DE ANNONA MURICATA L. EM MATERIAIS HÍBRIDOS DO TIPO UREASIL-POLIÉTER	59
6.1 Introdução	59
6.2 Metodologia	60
6.2.1 <i>Síntese de precursores híbridos e preparação de STT</i>	60
6.2.2 <i>Caracterização Físico-Química</i>	61
6.2.2.1 <i>Microscopia de força atômica (MFA)</i>	61
6.2.2.2 <i>Espalhamento de Raios-X de Pequeno Ângulo (SAXS)</i>	61
6.2.2.3 <i>Termogravimetria (TG)</i>	62
6.2.3 <i>Estudo de liberação in vitro</i>	62
6.2.4 <i>Estudo in vivo</i>	62
6.2.4.1 <i>Avaliação da atividade farmacológica</i>	62
6.2.4.2 <i>Edema de pata induzida por zymosan</i>	62
6.2.5 <i>Análise estatística</i>	63
6.3 Resultados e Discussão	64
6.3.1 <i>Materiais híbridos com Annona muricata</i>	64
6.3.2 <i>Caracterização físico-química dos sistemas contendo Annona muricata</i>	64
6.3.2.1 <i>Microscopia de força atômica (MFA)</i>	64
6.3.2.2 <i>Espalhamento de Raios-X de Pequeno Ângulo (SAXS)</i>	66
6.3.2.3 <i>Termogravimetria (TG)</i>	68
6.3.3 <i>Estudo de liberação in vitro</i>	70
6.3.4 <i>Avaliação da atividade farmacológica</i>	72
6.3.4.1 <i>Edema de pata induzida por zymosan</i>	72
6.4 Conclusão	76
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

1 INTRODUÇÃO

As doenças reumáticas possuem etiologia heterogênea e são responsáveis pela alta porcentagem de incapacidades no mundo (ANTONY; SINGH, 2021). A artrite reumatóide (AR) é uma doença articular inflamatória crônica de origem desconhecida, que se manifesta por alterações inflamatórias do tecido sinovial das articulações, cartilagem e ossos (YTTERBERG et al., 2022). A principal característica da doença é a hiperplasia sinovial, fator este, que contribui para a formação do *pannus* (SCHERER; HÄUPL; BURMESTER, 2020). Apresenta prevalência global estimada em 0,5 a 1%, atingindo com maior frequência em idosos e mulheres (ALETAHA; SMOLEN, 2018; GUO et al., 2018; YERIMA et al., 2021).

O tratamento da AR é complexo e variável a cada paciente e grau de gravidade, com isso o American College of Rheumatology (ACR) atualiza regularmente diretrizes de prática clínica para um manejo de qualidade da AR (FRAENKEL et al., 2021). Os medicamentos usados no tratamento da artrite reumatoide são predominantemente os glicocorticóides (GCs), anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) utilizados para o controle da dor e inflamação e os medicamentos antirreumáticos modificadores da doença (DMARDs), DMARDs biológicos (bDMARDs) e DMARDs sintéticos direcionados (tsDMARDs) (ABBASI et al., 2019). O uso excessivo e a longo prazo desses medicamentos, está atrelado a danos e reações severas como, alteração da função tireoidiana, hiperglicemia, hipertensão, insuficiência aguda da supra-renal, osteoporose, hemorragia digestiva ou úlceras e catarata (BUTTGEREIT; PALMOWSKI, 2022; RICE et al., 2017).

Dentro deste contexto, a busca de novos agentes farmacologicamente ativos obtidos por fontes naturais está em ascensão, fármacos clinicamente úteis e com menos efeitos adversos (SÜNTAR et al., 2020; LIMA, 2013). O uso de plantas medicinais é parte importante do conhecimento tradicional, ao longo dos anos no cenário farmacêutico, o isolamento e a identificação de compostos e moléculas biologicamente ativas levou à descoberta de novas terapias. A vasta gama de efeitos associados às plantas medicinais incluem, propriedades antiinflamatórias, antivirais, antitumorais e analgésicas (ANAND et al., 2019; AYE et al., 2019; PANYADEE, et al., 2019).

Explorada com propriedade antiinflamatória, antirreumática entre outras, a *Annona muricata* L., popularmente conhecida como graviola, contém mais de 212 variedades de fitoconstituintes, dentre eles, acetogeninas, alcalóides, fenóis, flavonóides, taninos, saponinas, triterpenos e esteróides são os metabólitos mais prevalentes que contribuem para a

bioatividade do extrato (FOONG; HAMID, 2012; NAYAK; HEGDE, 2021). A administração de *Annona muricata* L em sistemas terapêuticos transdérmicos (STT) pode superar as limitações encontradas nos fármacos convencionais via oral, evitando os efeitos de primeira passagem e possíveis efeitos adversos.

Utilizada para entrega de insumo farmacêutico na circulação sistêmica através da pele, os STT possuem muitas vantagens, incluindo concentrações plasmáticas estáveis de fármacos, melhor adesão do paciente, eliminação da primeira passagem hepática e degradação no trato gastrointestinal. A entrega bem-sucedida depende das propriedades físico-químicas do medicamento, tais como peso molecular, coeficiente de partição e a potência do medicamento (SINGH; MORRIS, 2011).

O STT pode ser desenvolvido por diferentes materiais, porém o uso de materiais híbridos nanoestruturados do tipo orgânico-inorgânico confere a esses sistemas diferentes vantagens, como por exemplo, são capazes de transportar e liberar fármacos de forma controlada, prolongada e local, resultando em efeitos colaterais baixos. Além disso, apresentam maiores valores de adesividade, viabilidade celular, baixo custo, aumentando a adesão do paciente ao tratamento, devido à facilidade, conforto e diminuição na frequência de administração do tratamento (OSHIRO et al., 2016; OSHIRO et al., 2015; OSHIRO et al., 2017).

Portanto, com o avanço do conhecimento químico e farmacológico das folhas de *Annona muricata* L., o objetivo deste trabalho é obter um extrato com a maior concentração de metabólitos secundários, avaliar a toxicidade aguda por meio de estudos *in vitro* e *in vivo*. Ademais, desenvolver o sistema terapêutico transdérmico híbrido, avaliar o perfil de liberação e atividade antiinflamatória *in vivo* da droga vegetal incorporada ao sistema.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver um sistema terapêutico transdérmico híbrido contendo *Annona muricata* L. para o tratamento de doenças inflamatórias, caracterização físico-química do extrato, avaliações *in vitro* e *in vivo*.

2.2 Objetivos específicos

- a) caracterizar a droga vegetal através de ensaios físico-químicos, contemplando as análises de granulometria, densidade aparente, determinação de pH, umidade, teor de cinzas totais e cinzas insolúveis em ácido;
- b) obter o extrato a partir das folhas de *Annona muricata* L.;
- c) realizar a síntese dos precursores híbridos e preparação dos STT;
- d) caracterizar físico-quimicamente o sistema, contemplando as análises de microscopia de força atômica (MFA), espalhamento de raios-X de pequeno ângulo (SAXS), termogravimetria (TG);
- e) realizar o estudo de liberação *in vitro*;
- f) analisar o potencial toxicológico do extrato através do ensaio de toxicidade aguda de dose única;
- g) avaliar o perfil anti-inflamatório do extrato e do sistema transdérmico frente aos modelos de edema de pata;

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Inflamação

O termo inflamação deriva do latim “*inflammare*”, é um processo complexo e necessário de defesa do organismo a estímulos biológicos, químicos, físicos ou reações imunológicas (ABDULKHALEQ et al., 2018). A inflamação tem como objetivo recompor a homeostase através de respostas organizadas e dinâmicas, culminando em alterações imunológicas, bioquímicas e fisiológicas, produzindo no local aumento do fluxo sanguíneo e da permeabilidade vascular, recrutamento leucocitário e liberação de mediadores químicos pró-inflamatórios (TNF- α , lipoxinas, cininas, prostaglandinas (PGs), leucotrienos, serotonina, histamina, substância P, tromboxanos, fator de ativação plaquetária, espécies reativas de oxigênio) para induzir o reparo tecidual (GERMOLEC et al., 2018; GODIN, 2014).

As alterações teciduais e funcionais configuram os cinco sinais do processo inflamatório: edema, calor, rubor, dor e perda da função. O edema é causado, sobretudo pela fase exsudativa, pelo aumento da permeabilidade vascular. O calor e rubor são oriundos da fase vascular, com o aumento do volume sanguíneo (hiperemia), ocorre, por conseguinte, aumento da temperatura no local da inflamação. A dor é ocasionada pela compressão das fibras nervosas locais, em decorrência do edema, e também pela liberação das substâncias químicas do processo inflamatório. Por fim, a perda da função é decorrente do edema especialmente em articulações, impedindo a movimentação e da dor, que dificultam as atividades cotidianas (ETIENNE et al., 2021).

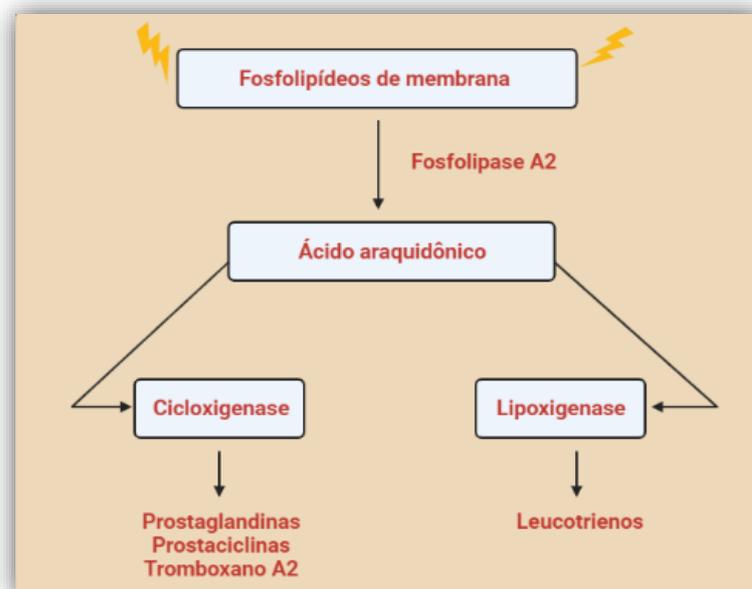
O processo inflamatório é altamente heterogêneo em tipos celulares e mediadores moleculares envolvidos, é classificado em duas fases, a inflamação aguda e crônica. A inflamação aguda, é definida como a sequência de respostas que ocorrem nas primeiras horas após a lesão, inicia-se rapidamente com a cascata de citocinas e quimiocinas, geralmente com ação curta, apresenta infiltrado celular composto principalmente por neutrófilos (CARNEIRO, 2009). Nesta fase, observa-se que a formação de eritema resulta do aumento do fluxo sanguíneo para a área afetada como consequência à vasodilatação (OYEKACHUKWU et al., 2017).

Em contrapartida, pode ocorrer a amplificação da resposta inflamatória aguda rumo à cronicidade. Quando os fatores desencadeantes não são contidos, uma resposta inflamatória desregulada pode ser desencadeada, podendo causar danos sistêmicos crônicos que resultam em distúrbios inflamatórios. A inflamação crônica é observada nos casos de infecções

persistentes ou em doenças inflamatórias imunomediadas. Tem início lento, maior duração, e além dos neutrófilos são encontrados infiltrados de células mononucleares (monócitos/macrófagos, linfócitos e plasmócitos) e destruição tecidual (STONE et al., 2020; OKIN et al., 2012).

A cascata da inflamação é uma via metabólica que utiliza o ácido araquidônico para sintetizar os mediadores lipídicos, chamados de eicosanóides (prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos). Como demonstrado na Figura 1, a cascata inicia com ação da fosfolipase A2 sobre os fosfolipídios, originando o ácido araquidônico, por sua vez o ácido araquidônico pode ser metabolizado por duas vias enzimáticas distintas: ciclooxigenase (COX) e da lipoxigenase (LOX). A ciclooxigenase é uma glicoproteína dimérica, possui 3 tipos, dentre eles: COX-1 é constitutiva, relacionada às atividades fisiológicas, COX-2 é induzida por estímulos, com papel importante nos processos inflamatórios e a COX-3 está relacionada a síntese da lipoxina que possui efeito anti-inflamatório. Com a oxidação do ácido araquidônico ocorre a formação de prostanóides. Estes prostanóides são prostaglandinas (aumentam a permeabilidade capilar, quimiotaxia, vasodilatação), prostaciclina (vasodilatadora e inibidora da agregação plaquetária) e tromboxano (vasoconstritor na circulação sistêmica e facilitador da agregação plaquetária) (CARNEIRO, 2009; ROSA, 2016; WANG et al., 2019).

Figura 1– Ilustração da cascata de inflamação



Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

3.2 Artrite reumatóide

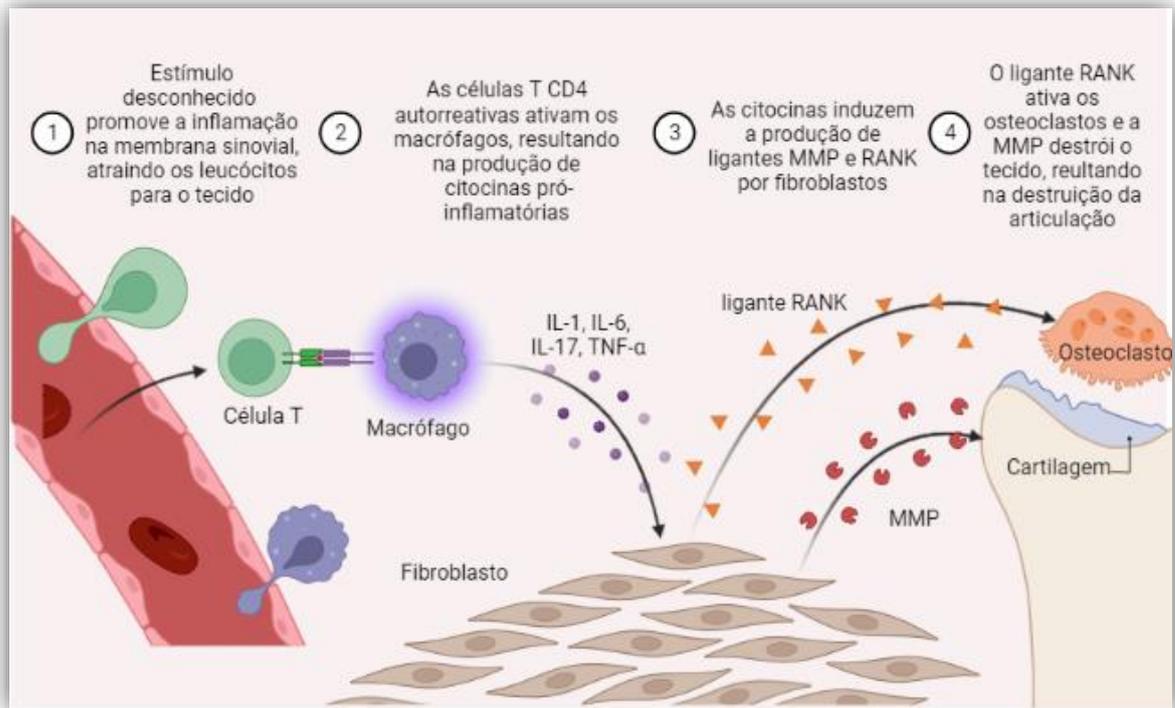
A artrite reumatóide (AR) é uma doença autoimune inflamatória e crônica, bastante complexa e pouco conhecida, é caracterizada por sinovite extensa resultando em erosão da cartilagem articular e do osso marginal que levam à destruição articular e incapacidade progressiva (CHIMENTI et al., 2015). A prevalência da doença é de cerca de 0,5% a 1% da população mundial, com maior frequência em idosos e três vezes mais nas mulheres do que nos homens (NAGAYOSHI et al., 2018). Embora a causa da AR seja desconhecida, o envolvimento da predisposição genética contribui para cerca de 60% do risco de desenvolver AR, além da presença do evento desencadeante, como infecções virais e bacterianas ou lesão tecidual.

A doença tem natureza multifatorial, incluem idade, sexo, genética, exposição ambiental e hormonal. Isoladamente, esses fatores não induzem a doença, entretanto a sobreposição deles pode ser determinante para o desenvolvimento da artrite. Os sintomas comumente encontrados na AR são rigidez nas articulações, fadiga, mialgia, febre, perda de peso, sensibilidade e inchaço articular e nódulos reumatóides (BAGATINI, 2017; BULLOCK et al., 2018).

A AR acomete simetricamente pequenas e grandes articulações, com maior frequência mãos e pés impactando significativamente a capacidade funcional do paciente. Além das articulações, outros órgãos podem ser afetados, como vasos sanguíneos, rins, coração, pulmões e fígado (VAN DELFT et al., 2020), desenvolvendo maior propensão a complexos reumatóides extras, como infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral, vasculite e aterosclerose (SRIVASTANA et al., 2017).

A patogênese central da AR é a sinóvia inflamada, isso resulta no influxo de células imunes nas articulações. Nesse contexto, uma rede complexa é formada através das células T, células B e outras células efetoras inatas, elas atuam na produção de citocinas pró-inflamatórias, desencadeando a ativação de sinoviócitos semelhantes a fibroblastos residentes, como demonstrado pela Figura 2 (CHEN et al., 2019).

Figura 2 – Esquema da patogênese da artrite reumatoide.



Fonte: Biorender.

Legenda: **RANK** é um receptor transmembrana; **ligante RANK** promove a diferenciação e ativação de células osteoclasticas; **IL-1**: interleucina 1; **IL-6**: interleucina 6; **IL-17**: interleucina 17; **TNF-α**: fator de necrose tumoral; **MMP**: metaloproteinases.

A membrana sinovial em pacientes com artrite reumatoide é caracterizada por hiperplasia celular, aumento da vascularização e influxo de células inflamatórias, especialmente as células T CD4⁺ (FANG et al., 2020). Originada a partir de um agente desencadeador, a AR inicia-se com a produção de autoantígenos, incluindo proteoglicanos, colágeno tipo II, proteínas citrulinadas e glicoproteínas da cartilagem humana (YANG et al., 2017). O sistema imunológico responde aos autoantígenos produzindo autoanticorpos, incluindo o fator reumatoide (FR) e o anticorpo anti-peptídeo citrulinado (ACPA) via estimulação de células B por células T CD4⁺ ativadas por antígeno, as células T CD4⁺ aumentam a resposta imune, estimulando fibroblastos sinoviais, condrócitos e osteoclastos. Com a liberação de citocinas, incluindo TNF, interleucina-1 e interleucina-6, ocorre a inflamação sinovial. A degradação do tecido conjuntivo advém das metaloproteinases de matriz e da estimulação da osteoclastogênese por células T CD4⁺ ativadas. Este meio inflamatório crônico na articulação, leva a uma expansão da membrana sinovial denominada

“pannus”, que acomete o osso periarticular na junção cartilagem-osso, resultando em erosão óssea e degradação da cartilagem (CHEN et al., 2019; CHOY et al., 2001; LIN et al., 2020).

3.3 Tratamentos convencionais

Por se tratar de uma doença autoimune, a artrite reumatoide não tem cura. Com isso, o objetivo central do tratamento é controlar a inflamação, aliviar a dor, manter a função articular e impedir a progressão da doença, concedendo melhor qualidade de vida ao paciente (LOPES, 2019). As abordagens terapêuticas existentes nos dias de hoje permitem, em muitos casos, o controle da doença, essas abordagens variam de acordo com as características de cada indivíduo (BULLOCK et al., 2018).

O tratamento padrão atual da AR inclui os glicocorticoides (GCs), os anti-inflamatórios não esteróides (AINEs), antirreumáticos modificadores da doença (DMARDs), analgésicos e agentes imunobiológicos. Os AINEs e analgésicos devem ser utilizados apenas como terapia adjuvante, sintomática, utilizados predominantemente para o controle da dor e da inflamação (MUELLER et al., 2021). Essas duas classes medicamentosas eram empregadas como primeira linha para a AR, contudo, a longo prazo não alteravam o curso da doença e apresentavam toxicidade para o sistema cardiovascular e gastrointestinal (AUGUSTO et al., 2022).

Os glicocorticóides são bastante utilizados devido sua resposta no controle efetivo da dor, inchaço e rigidez, mas não na evolução da doença a longo prazo. A recomendação deve ser por curto período de tempo devido aos seus diversos efeitos colaterais como o afinamento ósseo, ganho de peso, imunossupressão e diabetes. Os glicocorticóides devem ser associados com os DMARDs para que exista efeito sobre a patologia a longo prazo (AUGUSTO et al., 2022; CUTOLO, 2016; HUA et al., 2020).

Os antirreumáticos modificadores da doença (DMARDs) são administrados como medicação de primeira linha para o tratamento de AR, usadas para direcionar e inibir moléculas específicas das respostas imunes e inflamatórias. São categorizados em agentes sintéticos e biológicos. Os DMARDs sintéticos convencionais, como por exemplo o metotrexato, são empregados há mais de 50 anos e possuem alvos moleculares ainda não identificados. Entretanto, DMARDs sintéticos direcionados interferem com enzimas como as janus quinases (JAKs), que são moléculas de transdução de sinal intracelular que traduzem os efeitos de algumas citocinas em respostas celulares (ALETAHA; SMOLEN, 2018; YAP et al., 2018).

Através do diagnóstico precoce, essas terapias são capazes de inibir os mediadores inflamatórios e aliviar sintomas da doença. No entanto, o uso prolongado de anti-inflamatórios como os inibidores de ciclooxigenase e corticoides, estão associados a inúmeros efeitos colaterais, por exemplo, podem causar atrofia adrenal, osteoporose, supressão de resposta a infecção ou lesão. Os antiinflamatórios não esteroides (AINEs) estão associados a graus variados de risco cardiovascular e gastrointestinal (como úlceras pépticas), além de efeitos renais adversos, broncoespasmo devido ao bloqueio de prostaglandinas fisiológicas e inflamatórias e produção simultânea de leucotrienos (MUELLER et al., 2021; SANTOS et al., 2020; VANDEWALLE et al., 2018). Terapêuticas mais específicas, com novos agentes farmacologicamente ativos obtidos por fontes naturais e novas estratégias podem ajudar a minimizar esses efeitos adversos e, simultaneamente, aumentar a eficiência do tratamento.

Estudos recentes (GHASEMIAN et al., 2016; GOMES et al., 2021; MOBASHERI et al., 2012) demonstram a eficácia e benefícios do uso de fitoterápicos no tratamento da artrite e doenças reumáticas. Pesquisadores consolidaram o papel de várias plantas (rosa mosqueta, curcumina, resveratrol, *Miconia albicans*, *Annona muricata*, entre outras) no controle da inflamação. Os fitoterápicos podem inibir o NF- κ B (fator nuclear- κ B), um fator de transcrição regulatório de substâncias pró inflamatórias e estimular a diferenciação de células tronco mesenquimais (MSCs).

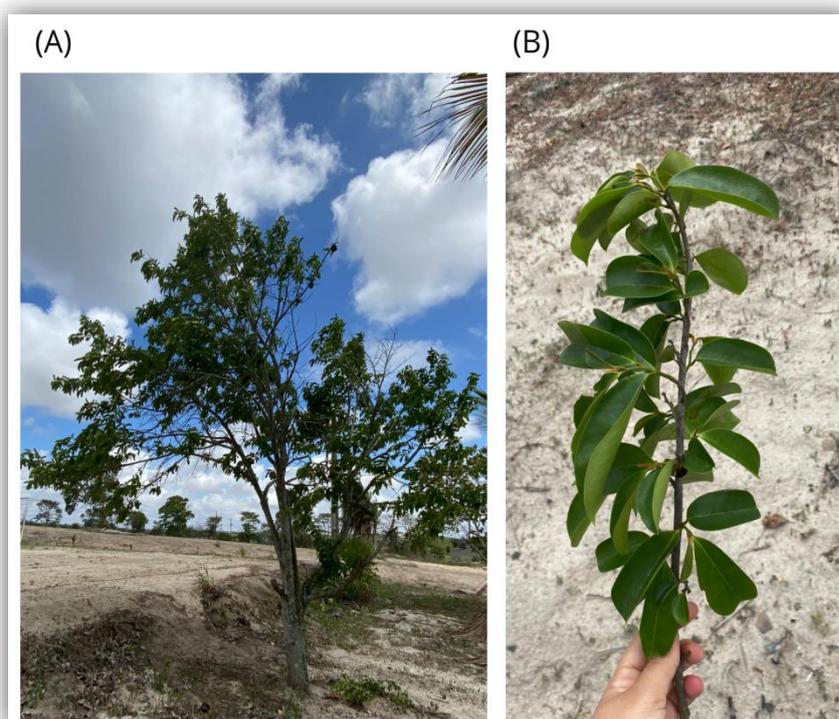
3.4 *Annona muricata* L.

O uso de compostos à base de plantas como tratamentos para doenças é bastante difundido e utilizado ao longo dos anos. A eficácia das plantas no tratamento de doenças está associada à ampla variedade de compostos químicos complexos que estão presentes em folhas, frutos, caules e sementes. *Annona muricata* é um dos exemplos de fruteiras tradicionais que vem sendo usada há décadas devido aos seus potenciais efeitos terapêuticos. (MUTAKIN et al., 2022; NAYAK; HEGDE, 2021).

Annona muricata L. pertence ao reino Plantae, divisão angiosperma (Magnoliophyta), classe Magnolids, ordem Magnoliales, família Annonaceae, subfamília Annonoideae, gênero *Annona*. Comumente chamada de graviola ou guanábana é uma planta nativa da América Central amplamente distribuída em regiões tropicais e subtropicais do mundo, como o Sudeste Asiático, América do Sul e as florestas tropicais da África (RADY et al., 2018; PATEL. M; PATEL. J, 2016).

É uma árvore frutífera, perene, terrestre, ereta, como demonstrada na Figura 2 A, possui um crescimento de até 5–10 m de altura e 15–83 cm de largura. Seu crescimento ocorre em altitudes abaixo de 1.200 m do nível do mar, umidade de 60% a 80% e na faixa de temperatura de 25 a 28 °C (MUTAKIN et al., 2022). Suas folhas podem ser vistas na Figura 2 B são arredondadas, grandes e com uma coloração verde escura brilhante. Os frutos são grandes, doce, sub ácido, oblongo ou angular com coloração esverdeada (PRASAD et al., 2019; HISS et al., 2019).

Figura 3 – Ilustração da *Annona muricata* L.



Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Legenda: (A) Árvore *Annona muricata* L. (B) Folhas de *Annona muricata* L.

Segundo Coria-Téllez et al, através de estudos fitoquímicos foram isolados e identificados 212 compostos bioativos na espécie. Os compostos mais prevalentes são acetogenina, alcalóides e fenóis, além dos metabólitos secundários como flavonóides, terpenóides, saponinas, cumarinas, lactonas, antraquinonas, glicosídeos, taninos e fitoesteróis, como também minerais essenciais, K, Ca, Na, Cu, Fe e Mg. Esses constituintes fitoquímicos presentes nas folhas de *Annona muricata*, são responsáveis por uma gama de ações terapêuticas (CORIA-TÉLLEZ et al., 2018; MOGHADAMTOUSI et al., 2015).

Estudos etnobotânicos demonstram que *A. muricata* é utilizada com ação antiinflamatória. Diante disso, Quilez et al. (2015) avaliou o potencial antiinflamatório do extrato aquoso de *Annona muricata* e evidenciou diminuição do edema nas orelhas dos animais (56 e 78%) assim como diminuiu a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO).

A potencial aplicação tópica também foi evidenciada no estudo de Moghadamtousi et al. (2015), em que utilizou o extrato de acetato de etila das folhas de *Annona muricata*, em feridas excisionais. A administração tópica durante 15 dias reduziu significativamente as feridas, além disso, acelerou os estágios da cicatrização, diminuiu o estresse oxidativo e a inflamação.

Outro estudo avaliando a ação antiinflamatória foi conduzido por Cercato et al. (2021), onde avaliou o efeito do extrato aquoso das folhas de *A. muricata*, e obteve como resultado redução significativa no edema de orelha, agregado à redução dos hidroperóxidos totais e à modulação da catalase.

Diversas outras ações terapêuticas são atribuídas a graviola, utilizada no tratamento de infecções bacterianas e fúngicas, possui atividade antiviral, antioxidante (BALDERRAMA-CARMONA et al., 2020), anti-helmíntica (EL-WAKIL et al., 2021; FERREIRA et al., 2013) anti-hipertensiva (OLA-DAVIES et al., 2019; SOPKE et al., 2020), antiinflamatória (NWAEHUJOR et al., 2020; ROSLIDA et al., 2010; SHUKRY et al., 2020) e anticancerígena (QAZI et al., 2018; YAJID et al., 2018) no quadro 1 abaixo está um compilado de estudos da literatura sobre seu uso e atividade terapêutica.

Quadro 1 – Principais atividades terapêuticas relatadas para *Annona muricata*

Atividade Terapêutica avaliada	Parte da planta	Tipo de estudo	Resultados	Referência
Analgésica e antiinflamatória	Extrato do fruto verde	<i>In vitro/in vivo</i>	Demonstrou efeito analgésico através da interação com a via opioidérgica e produziu inibição dependente da concentração da atividade da ciclooxigenase (COX)-1 e COX-2 em 39,44%±0,05% e 55,71%±0,12%,	ISHOLA et al., 2014

			respectivamente	
Antiinflamatória	Extrato etanólico das folhas	<i>In vivo</i>	Foi capaz de produzir efeitos anti-arrtríticos no modelo AA por suprimir significativamente as citocinas pró-inflamatórias tais como TNF- α e IL-1 β	FOONG et al., 2012
Antioxidante	Extrato metanólico das folhas	<i>In vitro</i>	Mostraram atividade de eliminação de radicais livres significativa ($p < 0,05$), o extrato metanólico demonstrou maior proteção contra danos no DNA induzidos por H ₂ O ₂	GEORGE et al., 2015
Antioxidante e citotóxico	Extrato hidroalcoólico das folhas	<i>In vitro/ in vivo</i>	Foram capazes de eliminar 44,71% dos radicais livres. Reduziu significativamente a viabilidade das células V79 no ensaio clonogênico em concentrações ≥ 8 $\mu\text{g/ml}$. O extrato aumentou o dano ao DNA induzido por mutagênico em camundongos	ACÉSIO et al., 2017
Anticancerígena	Extrato de folha e extrato de casca da fruta	<i>In vitro</i>	Produção de nanopartículas para incorporação do extrato, observou-se que a casca da fruta, tem um efeito antitumoral mais potente que o extrato da folha, atingindo 64,98%, 37%, 11,78% e 3,63% mais eficácia em HCT-116, A-375, MDA-MB-468 e MCF-7, respectivamente	GONZÁLEZ-PEDROZA et al., 2021
Antibacteriana	Extratos de folhas e cascas da fruta	<i>In vitro</i>	Apenas os extratos aquosos de folhas (ALA) e de etanol de casca de frutas (ESA) mostraram	IYANDA-JOEL et al., 2019

			atividade notável com 15 – 17 mm de diâmetro de inibição (DIH) contra os organismos de teste. As concentrações inibitórias mínimas (CIM) para o ALA e ESA foram 25 e 6,25 mg mL ⁻¹ respectivamente. Os dois extratos mostraram ainda atividade (6-18 mm DIH) contra 80% dos isolados multirresistentes testados.	
Antihipertensivo	Extrato aquoso de folhas	<i>In vivo</i>	<i>A. muricata</i> (9,17–48,5 mg/kg) causou redução significativa (p <0,05) dose-dependente na pressão arterial sem afetar a frequência cardíaca. Os efeitos hipotensores não foram afetados pela atropina (2 mg/kg), mepiramina (5 mg/kg), propranolol (1 mg/kg). Relaxou a fenilefrina (10 ⁻⁹ –10 ⁻⁴ M)	NWOKOC HA et al., 2012

Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

3.5 Sistema terapêutico transdérmico (materiais híbridos orgânico-inorgânico)

O sistema transdérmico (STT) é definido como uma membrana, uni ou multilamelar, capaz de ocluir a pele no local onde são aplicados. O objetivo principal é fornecer uma dose específica, suficiente para atingir a circulação sistêmica, devendo também ter boa adesão à pele e seus componentes não devem provocar reações de irritação cutânea (TRINDADE et al., 2017). Os produtos transdérmicos foram aprovados pela primeira vez em 1979 pela FDA. O uso dos STTs está em ascensão, pois melhoram a solubilidade dos compostos, além de fornecer administração constante e controlada do medicamento e permitir a entrada contínua de fármacos com meias-vidas biológicas curtas (DHIMAN et al., 2011; PEÑA-JUÁREZ et al., 2021).

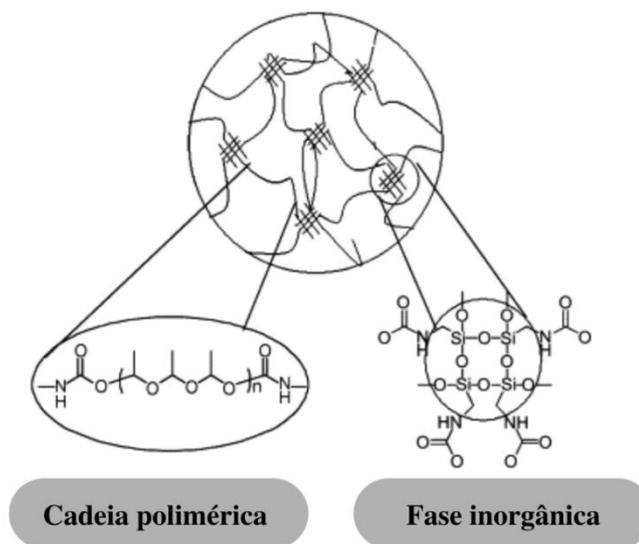
Os sistemas transdérmicos possibilitam a passagem de fármacos através da pele até à circulação sistêmica, foram inicialmente desenvolvidos como forma de contornar limitações das vias de administração convencionais e aumentar a eficácia terapêutica. O STT é uma alternativa promissora à administração oral, apesar de ser a mais utilizada e difundida, apresenta biodisponibilidade reduzida para determinados fármacos devido ao efeito de primeira passagem hepático, com isso o potencial de usar a pele como via de administração vem sendo estudado ao longo de várias décadas, como uma opção para ultrapassar aspectos indesejáveis relacionados com a farmacocinética e farmacodinâmica de determinados fármacos (DIAS et al., 2013; QUAN et al., 2021; RAMADON et al., 2022).

Os fármacos com perfil preferido para entrega transdérmica são aquelas com baixo peso molecular e lipofilicidade, com boa solubilidade e penetração através da pele. Ademais, medicamentos mais voláteis e com pontos de fusão mais baixos tendem a ser mais facilmente formulados, pois permeiam a pele com mais eficiência (ISAAC; HOLVEY, 2012; NG; GUPTA, 2020). O STT pode ser desenvolvido por diferentes materiais, incluindo diversos polímeros, como quitosana, alginato, sulfato de condroitina, poli (acrilamida), PEG, PVA, poli (ácido acrílico) (PAA), poli (ácido metacrílico) (PMAA), poli(metacrilato de metila) (PMMA), PVP, poli(ácido glicólico) (PLA), poli(caprolactona) (PCL), hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), os mais utilizados são o PEG reticulado, poli(2-etil hexil acrilato), polímeros híbridos, poli(acrilatos), poli(dimetil siloxano) (VILLANOVA; OREFICE; CUNHA, 2010).

Com o aprimoramento da nanociência e nanotecnologia, foi possível desenvolver formas poliméricas nanoestruturadas em matrizes de liberação controlada, substituindo os sistemas poliméricos convencionais. Uma classe de materiais que vem ganhando ênfase são os materiais do tipo orgânico-inorgânico (BARROS, et al., 2022; MENDES, 2012).

Os materiais híbridos orgânico-inorgânicos são formados pela combinação de componentes orgânicos e inorgânicos que dão origem a um material com características únicas, geralmente em escala nanométrica ou micrométrica (figura 4). Resulta em materiais macroscopicamente homogêneos, podendo diferir em parâmetros de interação molecular, os componentes que estão presentes, superfície de contato e grau de dispersão (JOSE; PRADO, 2005). Esta combinação de fases no mesmo material, confere propriedades de alta flexibilidade, resistência mecânica e térmica permitindo a interação com alvos biológicos (OSHIRO et al., 2017).

Figura 4 – Estrutura tridimensional de um composto híbrido



Fonte: adaptado de REKONDO et al., 2007.

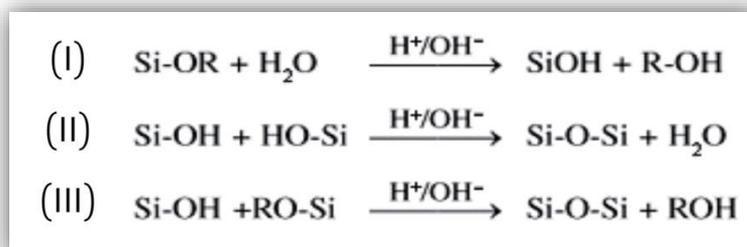
Os materiais híbridos são classificados em duas classes de acordo com os tipos de ligações químicas que constituem a interface inorgânico-orgânica. A classe I é integrada por sistemas híbridos que apresentam ligações fracas, como por exemplo, interações de Van Der Waals, ligações de hidrogênio ou interações eletrostáticas fracas. Em contrapartida, os híbridos da classe II exibem interações fortes entre as fases inorgânico-orgânica, por meio de ligações covalentes ou iônicas (FAUSTINI et al., 2018; FENG; ZHANG, 2013).

O processamento sintético mais utilizado desses materiais é do tipo sol-gel, pois apresenta características favoráveis como, simplicidade, baixo custo e condições amenas de temperatura e pressão baixas. O processo sol-gel está relacionado com as reações químicas de hidrólise e condensação. Primeiramente, (figura 5) ocorre à reação de hidrólise (reação I), em meio ácido ou básico, o grupamento OR é substituído pelo grupo silanol (Si-OH). Os grupos silanol podem interagir em si, como demonstrado na reação II ou até mesmo com os grupos OR (reação III) por meio de reações de condensação formando as ligações de siloxano, estabelecendo desta maneira a rede tridimensional de sílica (ESTEVES; BARROS-TIMMONS; TRINDADE, 2004).

Através desse método, é possível controlar a morfologia e as características de superfície da fase inorgânica, por meio dos parâmetros: temperatura, solvente, pH e catalisador. Dentre os precursores, o mais comumente utilizado é o TEOS, devido sua fácil purificação e taxa de reação lenta e controlada. Além disso, o pH pode influenciar na

microestrutura final do material, os catalisadores mais empregados são HCl, NaOH ou NH₄OH (PANDEY; MISHRA, 2011).

Figura 5 – Reações químicas envolvidas no processo do tipo sol-gel em materiais híbridos



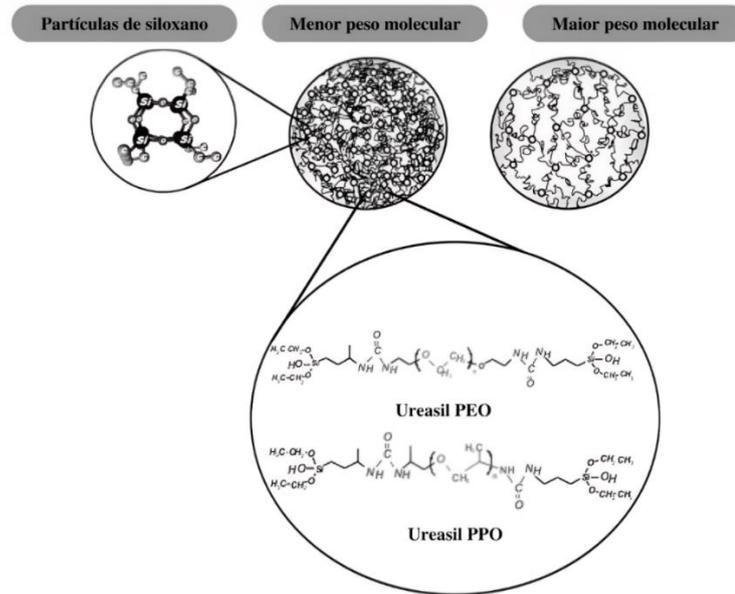
Fonte: adaptado de ESTEVES et al., 2004.

Diante do exposto, o uso de materiais híbridos do tipo orgânico-inorgânico confere aos sistemas vantagens diferenciadas, como por exemplo, capacidade de incorporar substâncias lipofílicas e hidrofílicas, baixa toxicidade, proporcionam níveis do fármaco mais prolongados e estáveis na corrente sanguínea, administração segura, além de baixo custo e facilidade de aplicação, isso geralmente permite a melhor adesão do paciente (OSHIRO JUNIOR et al., 2015; OSHIRO JUNIOR et al., 2016).

3.5.1 *Materiais híbridos do tipo ureasil-poliéter*

As modificações na estrutura nanométrica de materiais poliméricos são capazes de fornecer características estruturais, ópticas e mecânicas otimizadas (MENDES et al., 2021). Dentre a nova classe de polímeros nanoestruturados, os híbridos orgânico inorgânicos denominados (ureasil-poliéter) tem sido um dos materiais mais estudados. Conceitualmente, são polímeros constituídos por cadeias de poli (óxido de etileno) (PEO e poli (óxido de propileno) (PPO) e por frações de siloxano como demonstrado na figura 6 (OSHIRO JUNIOR et al., 2015). Esses materiais possuem características de alta transparência, alta flexibilidade, resistência térmica e mecânica, não tem efeito citotóxico, alta capacidade de carregamento e controle na liberação de fármacos. Essas propriedades torna este material promissor para atuar como um sistema de liberação de substâncias biologicamente ativas (OSHIRO et al., 2017; SOUZA et al., 2013).

Figura 6 – Exemplar de híbridos do tipo ureasil-poliéter

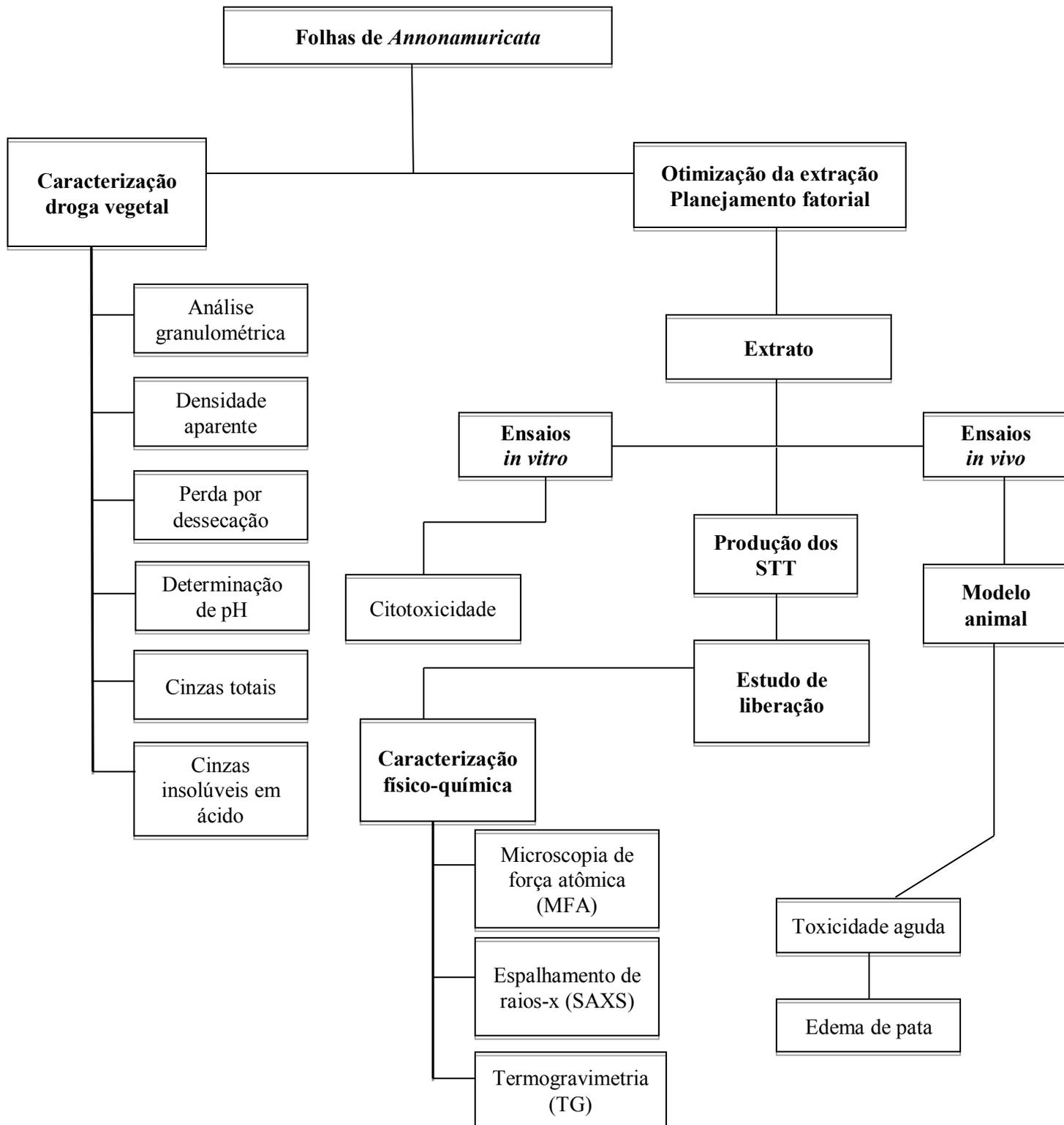


Fonte: adaptado de SOUZA et al., 2013

4 METODOLOGIA

As etapas que foram utilizadas como metodologia neste trabalho estão dispostas no fluxograma demonstrado na Figura 4.

Figura 7– Fluxograma das etapas envolvidas na metodologia do estudo



CAPÍTULO I. CONTROLE DE QUALIDADE DO
MATERIAL VEGETAL, OBTENÇÃO DO EXTRATO E
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA
DO EXTRATO DE *Annona muricata* L.

5 CAPÍTULO I- CONTROLE DE QUALIDADE DO MATERIAL VEGETAL, OBTENÇÃO DO EXTRATO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA DO EXTRATO DE *ANNONA MURICATA* L.

5.1 Introdução

A busca por desenvolvimento de produtos com propriedade antiinflamatória eficaz e menos efeitos adversos é de grande importância. As terapias à base de plantas têm sido usadas tradicionalmente em todo o mundo, há muitos anos. Presentes nas plantas, folhas e raízes, os fitoquímicos são compostos bioativos naturais que atuam como sistema de defesa no combate a doenças, como exemplo pode-se destacar os polifenóis, flavonóides, saponinas esteróides, compostos organossulfurados e vitaminas (VASANTHI; SHRISHRIMAL, 2012).

Rica em compostos fenólicos, a *Annona muricata* L. pertence à família das *Annonaceae*, popularmente conhecida como graviola, é uma planta perene das regiões tropicais que possui características medicinais em diversos de seus compostos. Suas utilizações terapêuticas ao longo das décadas marcaram sua notória ação antiinflamatória, além do seu amplo espectro de atividades biológicas que incluem, cicatrizante, antioxidante, anticancerígena, entre outras (ALSENOSY et al., 2019; JABIR et al., 2021).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) é fundamental investigar experimentalmente as plantas e princípios ativos que são utilizados para fins medicinais, visando a garantia de sua eficácia e segurança. Vários fatores podem influenciar na qualidade dos produtos à base de plantas, como por exemplo, a parte da planta utilizada, fatores ambientais, condições de armazenamento, contaminantes, controle físico-químico. Estas características são determinantes para eficácia terapêutica, e são avaliadas empregando técnicas analíticas sensíveis, exatas e precisas (KOPARDE; DOIJAD; MAGDUM, 2019; SILVA; DA SILVA; LINHARES, 2020).

Devido à vasta utilização da *Annona muricata* para fins terapêuticos e sua ampla distribuição no Brasil, este trabalho tem como objetivo obter os melhores parâmetros do processo de extração das folhas de *Annona muricata*. A partir do extrato com as maiores concentrações de flavonóides, caracteriza-lo e avalia-lo quanto à atividade antiinflamatória.

5.2 Metodologia

5.2.1 Coleta e preparação do material vegetal

As folhas de *Annona muricata* L. foram coletadas no município de Puxinanã na região semiárida do estado da Paraíba em 04 de fevereiro de 2022 às 9h (7°10'04.7''S; 35°58'50.1''W) e registradas no Sistema Nacional de Patrimônio Genético de Associados Conhecimentos Tradicionais (SISGEN) do Brasil sob número AC28672.

As folhas foram lavadas com solução de hipoclorito de sódio à 2% e em seguida foram previamente secas com papel toalha, e posteriormente secas em estufa de circulação forçada de ar (TECNAL modelo TE-394/2 MP) a 40°C, até obter estabilidade da massa do material. Por fim, as folhas foram pulverizadas em moinho de facas (SOLAB modelo SL-30) com malha de 10 mesh.

5.2.2 Controle de qualidade da droga vegetal

A qualidade da droga vegetal foi determinada por meio de testes de controle de qualidade de acordo com os testes adaptados da Farmacopeia Brasileira (2019).

5.2.2.1 Análise granulométrica

A repartição granulométrica foi realizada utilizando 25 g do pó obtido da *A. muricata*, submetida à peneira granulométrica da marca Bertel (Caieiras, São Paulo, Brasil), composta por um conjunto de seis tamises, previamente pesadas, com diâmetros das malhas respectivamente de 710, 355, 180, 150, 75 e 38 µm e um coletor, o processo foi realizado na vibração mecânica 4, durante 15 minutos. Após o término desse tempo, foi calculado o tamanho médio das partículas em função da distribuição das massas nos tamises. O percentual retido em cada tamis foi obtido, utilizando a Equação 1:

$$\% \text{ Retida no tamis} = P1 / P2 \times 100 \text{ (1)}$$

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

5.2.2.2 Densidade aparente

Amostras de 10 g foram pesadas ($n = 3$), transferidas para provetas de 100 mL e submetidas a 10, 500 e 1250 batidas, respectivamente, em superfície plana, nas quais foi avaliado o volume ocupado. A densidade foi dada pela razão massa/volume.

5.2.2.3 Perda por dessecação

Amostras de 1 g da droga foram submetidas ao aquecimento em estufa a 105 °C por 5 horas. Esse processo foi realizado em triplicada e através da média o resultado foi expresso em perda de substâncias voláteis ou água residual.

5.2.2.4 Determinação do pH

Foi preparada uma infusão a 1% da droga vegetal. Após o resfriamento, o pH foi determinado em um potenciômetro previamente calibrado da marca Gehaka, modelo PG 1800.

5.2.2.5 Cinzas totais

Amostras de 3 g foram incineradas e submetidas à mufla (450 °C), durante 2 horas. Após resfriadas, foram calculadas as cinzas totais em função do peso inicial.

5.2.2.6 Cinzas insolúveis em ácido

As cinzas totais obtidas na etapa anterior foram aquecidas à ebulição por 5 minutos. Após secagem, o material foi filtrado em papel isento de cinzas e calcinado (500 °C) por 4 horas. Após resfriamento, o material foi pesado e as cinzas insolúveis em ácido foram calculadas.

5.2.3 Obtenção do extrato de *Annona muricata*

Três métodos foram empregados: a maceração por 72 horas; turbólise – 10.000 rpm por 20 minutos com ciclos de 5 minutos e 1 minuto de repouso em ultraturrax (TECNAL modelo TE-102 TURRATEC); ultrassom – 30 minutos em 50 MHz em lavadora ultrassônica (UNIQUE modelo USC 33 1400 (São Paulo, Brasil)). Para todos os métodos, foram usados 3 proporções de solvente hidroalcoólico (30, 50 e 70%) e 3 concentrações da droga (2, 6 e 10%). Posterior a determinação do teor de flavonóides totais (item 2.4.1), foi preparado 5L do extrato. Em seguida, o concentrado foi filtrado e o solvente rotoevaporado sob pressão reduzida, em rotaevaporador (IKA® RV 8), por fim, essa mistura foi vertida em placa de petri de 20 x 20 e adicionadas em estufa por 3 dias a 50 °C.

5.2.4 Quantificação de flavonóides totais

A curva padrão foi construída utilizando-se concentrações entre 6 e 28 $\mu\text{g mL}^{-1}$, de quercetina, analisadas em espectrofotômetro, para a leitura da absorbância em 415 nm. As leituras das amostras do extrato vegetal foram feitas na presença de solução do cloreto de alumínio relacionando os valores de absorbância encontrados com a concentração de flavonóides da solução através de uma relação matemática obtida pela curva de calibração.

Distribuiu-se em tubos de ensaio 1,5 mL de solução metanólica de AlCl_3 2% (p/v) e posteriormente 1,5 mL de solução metanólica do extrato. Os tubos ficaram em repouso por 10 minutos, à temperatura ambiente (25 °C). As medidas foram obtidas no comprimento de onda de 415 nm. A concentração do extrato foi corrigida experimentalmente para estar dentro da faixa linear de absorbância espectral, obtida através da curva de calibração. Os valores são expressos em equivalentes de quercetina.

5.2.5 Termogravimetria (TG)

A curva TG do extrato foi obtida utilizando o analisador térmico ShimadzuTM- (TGA-50 e DTA-60) (Nº de série: C305651- Barueri, SP, Brasil), sob fluxo de nitrogênio (100 mL/min), na taxa de aquecimento de $10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, faixa de temperatura entre 30– 900 °C, utilizando 6 mg de amostra previamente pesadas em cadinho de alumina.

5.2.6 *Análise de citotoxicidade do extrato de Annona muricata L.*

A linhagem celular de hepatoma humano (HepG2) foi cultivada em meio de cultura contendo Dulbecco-DMEM e mantida em estufa a 5% de CO₂ e temperatura de 37 °C até a monocamada celular ficar confluenta. Posteriormente, as células foram tripsinizadas e homogeneizadas com meio de cultura mais 10% de soro fetal bovino. Para os ensaios de citotoxicidade (MTT), foi utilizada uma suspensão de $2,5 \times 10^5$ células/poço da cepa. As células foram cultivadas em placas de 96 poços em 24 horas de cultivo. Foram adicionadas diferentes concentrações do extrato de *Annona muricata* L. (0,05 a 212 µg/mL) solubilizado em DMEM. Após 24 horas, o meio foi descartado e 100 µL de MTT (1 mg/mL) em PBS foi adicionado a cada poço, as células da microplaca foram incubadas a 37 °C, protegidas da luz, até a presença de cristais violetas de formazan (3 horas). Para a solubilização dos cristais, 100µL de álcool isopropílico absoluto foi adicionado a cada poço e a leitura espectrofotométrica da absorbância, no comprimento de onda de 595 nm, foi realizada em um leitor de placas. Os testes foram realizados em triplicata. A porcentagem de células vivas foi calculada em relação ao controle negativo.

5.2.7 *Estudos in vivo*

5.2.7.1 *Local da Pesquisa*

A avaliação da toxicidade *in vivo* foi desenvolvida no Centro de Bioterismo da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), e o teste de edema de pata foi realizado no Laboratório de Ensaios Farmacológicos da UEPB. Os procedimentos de cuidados e manuseio de animais estavam em estrita conformidade com as recomendações do Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório dos Institutos Nacionais de Saúde e encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 08 de outubro de 2008, com o decreto 6.899 de 05 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA) registrada com o nº 027/2022.

5.2.7.2 Animais

Para a avaliação farmacológica e toxicológica foi utilizado camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*) adultos, machos e fêmeas, priorizando o peso entre 25 e 35 g. Os animais foram mantidos sob as seguintes condições ambientais: temperatura de 23 ± 1 °C, umidade relativa de 40 a 60%, ventilação e exaustão de ar diretamente nas gaiolas microisoladoras. Essas gaiolas microisoladoras com grade, tampa e sistema de válvulas para insuflamento e exaustão de ar, medindo 435 cm², condicionou o número máximo de 4 camundongos por gaiola, em função do peso ou idade. Esses foram alimentados com ração para roedores de marca Quintia, esterilizada por radiação gama, servida *ad libitum*, a água disponibilizada foi filtrada em carvão ativado e 5 micras, esterilizada por autoclavação a 121°C por 20 minutos, também *ad libitum*, a forração das gaiolas foi feita com maravalha de pinus, esterilizada por radiação gama.

Os animais foram eutanasiados por excesso de associação de anestésico Ketamina 10% (300 mg.kg⁻¹) e Xilazina 2% (30 mg.kg⁻¹) por via intra-peritoneal.

5.2.8 Avaliação toxicológica *in vivo*

5.2.8.1 Toxicidade aguda

Para o teste de toxicidade aguda oral foram utilizados 2 grupos de 3 animais fêmeas. Os animais do grupo controle, receberam o veículo (50 µL de salina estéril tamponada PBS) enquanto que os animais do grupo tratados receberam o extrato de *Annona muricata* com dose de 2000 mg.kg⁻¹ por via oral. Foram realizadas observações comportamentais sistemáticas nos tempos de 15 e 30 minutos e 1, 2, e 4 horas após a administração e, daí em diante, diariamente, até o décimo quarto dia por meio do screening hipocrático segundo Almeida (1999). Parâmetros como massa corporal, consumo de água e ração foram observados a cada 24 horas durante 14 dias. Ao final do experimento, os animais foram então pesados e anestesiados e em seguida submetidos à eutanásia, sendo os órgãos (fígado, baço, coração, rins e estômago) retirados, pesados e avaliados macroscopicamente.

5.2.9 Avaliação farmacológica

5.2.9.1. Edema de pata induzido por zymosan

Os testes de edema de pata foram realizados conforme realizados por Fernandes (2002), com adaptações. Foram organizados 5 grupos de 4 animais, machos. Primeiramente, os animais receberam, na região plantar das patas traseiras esquerdas, o volume de 50 μL da solução de zymosan a 2%. Outro grupo recebeu apenas 50 μL de salina estéril tamponada (PBS) que foi utilizada como controle. Ademais, no grupo tratado foi administrado por via oral uma solução contendo 10, 100 e 200 mg/kg de *Annona muricata* L respectivamente. Nos tempos 30 min, 1, 2, 4 e 6 h, o volume de cada pata de camundongo foi medido em mm^3 com o auxílio de um plestismômetro, antes do tratamento e após a estimulação do edema, a quantidade de inchaço da pata foi determinada para cada animal, o estudo foi cego, onde o responsável pelas leituras não conhecia os animais de cada grupo, sendo, portanto identificados por códigos. Os dados foram representados como variação do volume da pata ($\Delta \cdot \text{mm}^3$).

5.2.10 Análise estatística

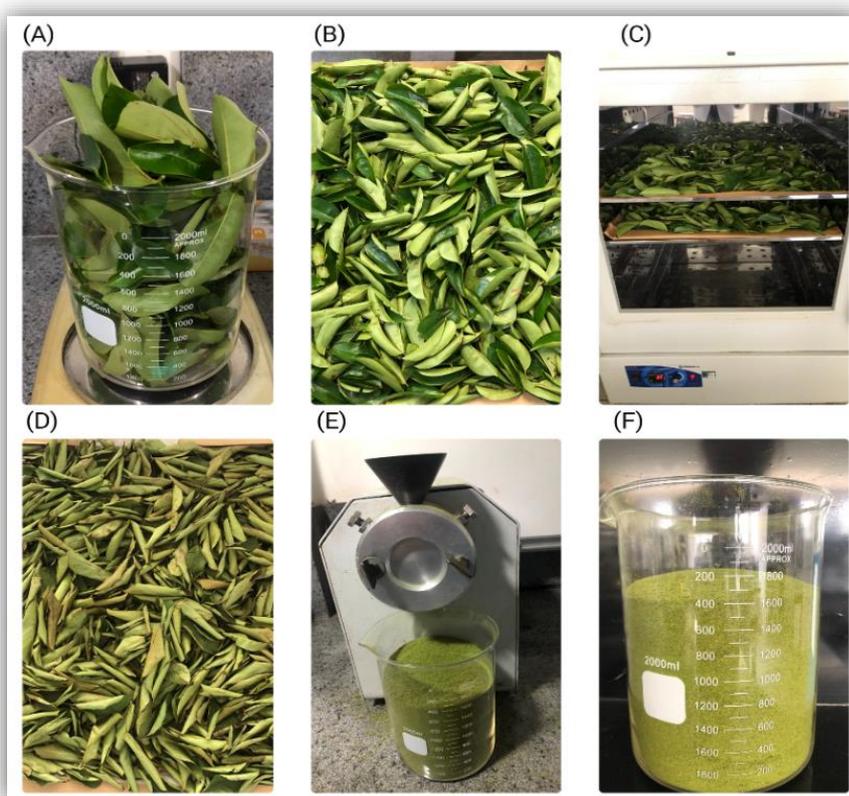
Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão das medidas feitas em cada grupo. As comparações entre os grupos no teste de toxicidade aguda foram feitas usando o teste T de Student. Para o estudo de atividade farmacológica foi empregado ANOVA one-way com teste de Tukey. Todos os dados foram analisados utilizando o *Software Prism 9.4.1* (GraphPad, San Diego, CA, EUA). As diferenças estatísticas foram consideradas significativas para * $p < 0,5$; ** $p < 0,1$; *** $p < 0,01$.

5.3 Resultados e discussão

5.3.1 Coleta, limpeza, secagem e moagem

Após a coleta (1kg), os resultados da análise visual corroboraram com as características inerentes da planta: folhas ovadas, largas, de coloração verde escuro e brilhante. Posteriormente a secagem e moagem obtiveram-se um rendimento total de 385 g de droga vegetal após a moagem (38,5%).

Figura 8 – Etapas de limpeza, pesagem, secagem e moagem do material vegetal



Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Legenda: (A) Pesagens das folhas de *A. muricata*; (B) Distribuição das folhas limpas em bandejas; (C) Processo de secagem das folhas em estufa; (D) Folhas secas; (E) Processo de moagem das folhas; (F) Resultado final da droga vegetal.

As plantas possuem alto teor de água em sua estrutura, desta maneira, os processos de secagem desempenham papel essencial na conservação dos compostos originalmente encontrados no material vegetal e preservação de suas características organolépticas. A secagem é uma operação unitária e um dos métodos de processamento mais comuns, implica na evaporação da água livre de dentro do material sólido para atmosfera, resultando na

matéria seca sem danificar o tecido e as propriedades da planta. A fonte do calor latente de vaporização pode ser fornecida por convecção, condução e radiação. Além do mais, a secagem da amostra possibilita diminuir a velocidade de deterioração do material (KARAM et al., 2016; OYINLOYE; YOON, 2020).

Os métodos de secagem incluem ambiente, estufa, liofilização e microondas. A secagem em estufa é um dos métodos mais comumente empregados para a redução da umidade das plantas, por isso, foi o método de escolha tendo em vista o principal o objetivo de obter um material seco, livre da proliferação de microrganismos, e maior rendimento de ativos naturais (TISCHER et al., 2014).

Segundo Azwanida et al. (2015) o método de moagem objetiva reduzir o tamanho da partícula, aumentando a superfície de contato entre amostras e solventes de extração. O processo de redução de tamanho resulta de forças mecânicas externas atuando em um material que é grande o suficiente para quebrar a força de ligação molecular interna do material através da geração de estresse em torno da estrutura da amostra (AZWANIDA, 2015; TISCHER et al., 2014).

De acordo com o tipo de amostra são selecionados os tipos de moinhos apropriados. O método de moagem escolhido no presente estudo foi o moinho de facas, são usados para amostras secas de folhas, com indicação para materiais fibrosos e maleáveis, correspondendo as características das folhas de *A. muricata*. Além disso, o moinho de facas é um tipo mais barato e de mais fácil operação do que o de martelo e o de bolas (FRANÇA; FONTES; CASTRO, 2016).

5.3.2 Caracterização da droga vegetal

A caracterização físico-química da matéria prima vegetal é o primeiro passo a ser realizado na padronização de medicamentos à base de plantas. Na Figura 9 pode ser observado a droga vegetal e na Tabela 1, são mostrados os resultados da caracterização da droga vegetal.

Figura 9 – Droga vegetal obtida das folhas de *Annona muricata* L.



Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Tabela 1 – Características físico-químicas da droga vegetal de *A. muricata*

Testes	Valor obtido
Análise granulométrica	Pó moderadamente grosso
Densidade	$0,30 \pm 0,01$ g/mL
Perda por dessecação	$8,82 \pm 3,4\%$
Determinação de pH	$5,54 \pm 0,11$
Cinzas totais	$8,04\% \pm 0,26$
Cinzas insolúveis em ácido	$1,56 \pm 0,19$

Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

A distribuição granulométrica define a superfície de contato disponível para interação com o solvente utilizado no processo extrativo, tanto a polaridade do solvente extrator como o tamanho das partículas são capazes de influenciar na concentração dos metabólitos secundários presentes na formulação final. Com isso, os resultados descritos acima constituem parâmetros importantes para manter a homogeneidade e reprodutibilidade dos processos extrativos com *A. muricata* (MIGLIATO, et al., 2011).

De acordo com a Farmacopeia Brasileira 2019, a granulometria da droga vegetal foi classificada em pó moderadamente grosso (BRASIL, 2019b). Pode-se observar através da

tabela 2 que o pó encontram-se predominantemente distribuído em dois tamises: 75 e 180 μm respectivamente, representando 64,36% de todo o material. Pós com menores tamanhos de partícula tendem a potencializar a extração dos constituintes químicos e conseqüentemente podem potencializar sua atividade farmacológica.

Tabela 2 – Distribuição granulométrica do pó das folhas de *A. muricata*.

Abertura (μm)	Massa (g)	%
710	0,57	2,3
355	3,5	14,3
180	6,7	27,4
150	0,99	4,05
75	9,02	36,9
38	3,13	12,82
Coletor	0,53	2,17

Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

A perda por dessecação tem como finalidade determinar a quantidade de substâncias voláteis, acompanhar o processo de secagem, como também é um indicativo da umidade residual. A quantidade excessiva de água em drogas vegetais propicia o desenvolvimento e crescimento de microrganismos e insetos, a hidrólise e a atividade enzimática, podendo ser causa de degradação dos constituintes da droga. A perda por dessecação do pó das folhas de *A. muricata*, apresentou uma média de 8,82% ($\pm 3,4$), esse resultado está dentro da faixa de 8 a 14% estabelecido pela Farmacopeia Brasileira (2010), expressando desta maneira uma secagem eficiente da matéria-prima vegetal.

O pH da infusão da droga vegetal mostrou-se levemente ácido ($5,54 \pm 0,11$) (Tabela 1). Estudos realizados por Oliveira et al. (2020) e Assunção et al. (2020) determinaram o pH de *A. muricata*, os valores médios variaram entre 5,34 e 5,98, sugestivo da presença de metabólitos ácidos, esses resultados demonstraram proximidade ao encontrado neste estudo. A determinação do pH é um parâmetro importante na padronização e estabilidade das soluções extrativas, visto que sua alteração pode significar contaminação microbiana e deterioração do produto (PEREIRA et al., 2019).

Considera-se parte importante no controle de qualidade da droga vegetal, o teor de cinzas. As cinzas são resíduos inorgânicos que permanecem após o processo de incineração.

Com isso, a determinação do teor de cinzas auxilia na quantificação de impurezas inorgânicas não voláteis que podem estar presentes na amostra como contaminantes (COSMO; GALERIANI, 2021; SILVA; DA SILVA; LINHARES, 2020). Considerando o componente inorgânico intrínseco de cada droga, estabeleceu-se segundo a Farmacopeia Brasileira (2010) que os teores de cinzas devem estar entre 3 e 15%. Portanto, os resultados obtidos no presente estudo (8,04%) encontram-se dentro das especificações.

5.3.3 *Quantificação de flavonoides e curva analítica*

As análises referentes à quantificação de flavonoides nos diferentes extratos foram realizadas utilizando quercetina como padrão externo para a construção da curva padrão. A linearidade foi determinada através da construção da curva da solução padrão nas concentrações entre 6 e 28 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. A curva obtida demonstra que os resultados são diretamente proporcionais à concentração do marcador na amostra. A equação da reta dos dados obtidos para quercetina apresentaram o coeficiente de correlação (r^2) de 0,995, observado na Figura 10 e Tabela 3. Após o cálculo pela equação da reta foram obtidos valores de flavonoides totais para cada extrato.

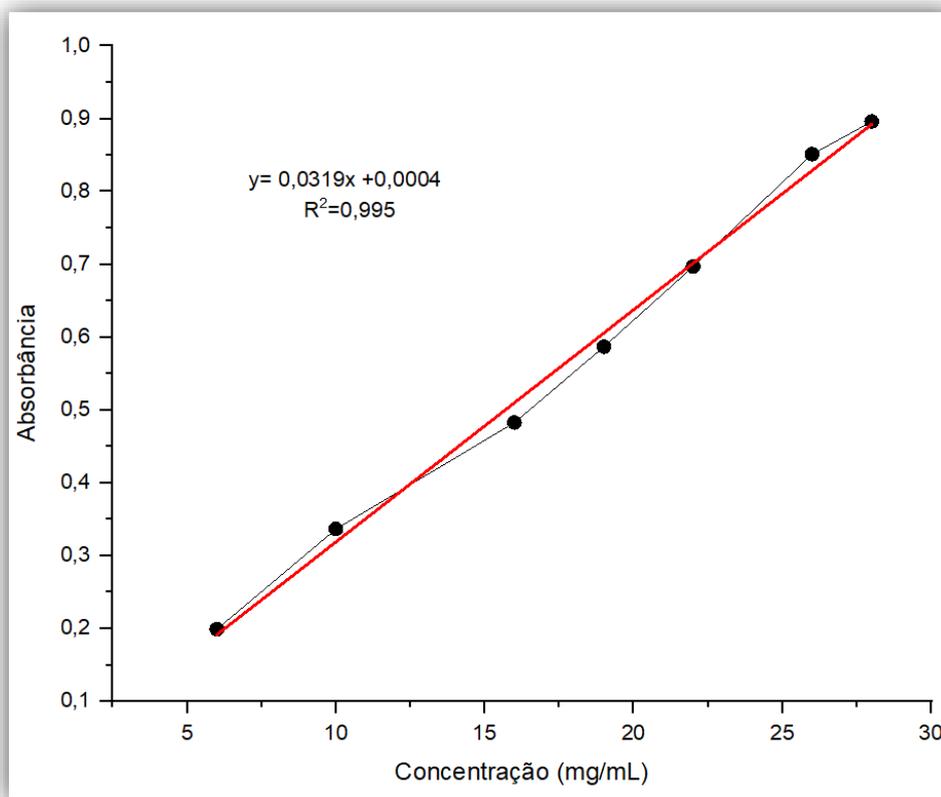
A partir dos valores da curva de calibração foram estimados os limites de quantificação (LQ) e detecção (LD). Os valores de LQ e LD foram 0,0329 e 0,0108 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente.

Tabela 3 – Absorbâncias relativas à curva de calibração da quercetina obtida no estudo de linearidade

Concentração	F1	F2	F3	Média	Desvio padrão
6	0,1986	0,1986	0,2003	0,199167	0,000801388
10	0,3357	0,3427	0,3313	0,336567	0,004694204
16	0,5056	0,483	0,4594	0,482667	0,018862544
19	0,5677	0,599	0,5942	0,586967	0,013763801
22	0,7103	0,6953	0,6849	0,696833	0,010426036
26	0,8864	0,8378	0,8298	0,851333	0,025010042
28	0,9252	0,8835	0,8795	0,896067	0,020665

Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Legenda: F1 (formulação 1); F2 (formulação 2); F3 (formulação 3).

Figura 10 – Curva analítica da quercetina

Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

5.3.4 Obtenção do extrato de *Annona muricata*

Os protocolos para o processo de extração de constituintes químicos de plantas são diversos devido à variedade de suas características químicas e à variedade de matrizes vegetais. Vários fatores podem afetar o processo extrativo e o rendimento dos constituintes químicos, como por exemplo, divisão da droga, o estado da droga, massa utilizada, natureza dos solventes, proporção e volume dos solventes, temperatura, agitação, pH e tempo de extração (ABUBAKAR; HAQUE, 2020; PANDEY; TRIPATHI, 2014; SASIDHARAN et al., 2011). Há processos extrativos distintos descritos na Farmacopeia Brasileira (2019) que podem ser usados conforme os objetivos requeridos, devendo-se avaliar a eficácia do método, a disponibilidade, custo do processo, maior rendimento.

Ademais, o agente extrator também é um dos fatores que mais influenciam no processo extrativo. Possuem a finalidade de dissolver os constituintes químicos de interesse da planta sem alterar quimicamente. Os fatores elencados importantes para escolha do solvente, inclui: seletividade, a capacidade de um solvente extrair o constituinte ativo. O

solvente ideal deve ser atóxico e não inflamável, não deve reagir com o extrato, baixa temperatura de ebulição e ter baixo custo (ABUBAKAR; HAQUE, 2020).

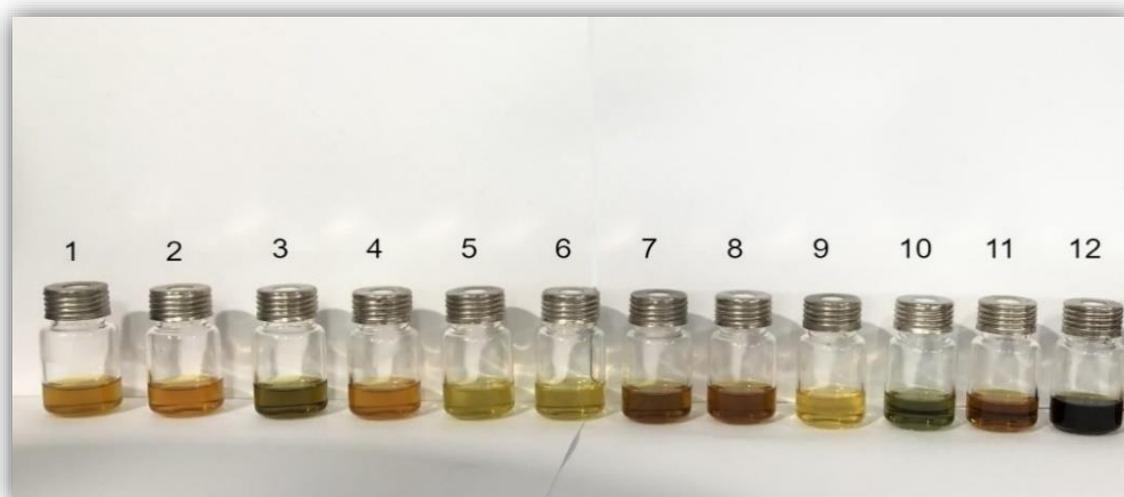
Avaliando os experimentos processados, os resultados são mostrados na Tabela 4 e figura 11.

Tabela 4 – Análise preliminar para obtenção de melhor resultado em concentração [mg/g] de flavonóides

Experimento	Método	Proporção de solventes	Droga %	Resultado [mg/g]
1	Ultrassom	30 etanol/70 água	6%	6,00
2	Turbólise	30 etanol/70 água	6%	3,08
3	Ultrassom	70 etanol/ 30 água	6%	8,29
4	Turbólise	70 etanol/ 30 água	6%	4,19
5	Ultrassom	50 etanol/ 50 água	2%	9,10
6	Turbólise	50 etanol/ 50 água	2%	8,33
7	Ultrassom	50 etanol/ 50 água	10%	3,62
8	Turbólise	50 etanol/ 50 água	10%	2,59
9	Maceração	30 etanol/70 água	2%	6,88
10	Maceração	70 etanol/ 30 água	2%	16,99
11	Maceração	30 etanol/70 água	10%	3,19
12	Maceração	70 etanol/ 30 água	10%	6,89

Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Figura 11 – Ilustração dos doze extratos experimentais



Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Na figura 11, observa-se que as concentrações do insumo vegetal e as proporções de solventes influenciaram nos parâmetros colorimétricos do extrato. Os extratos 7, 8, 11 e 12 resultaram em cores mais escuras, com tendência às cores marrom e verde escuro, isso se deve principalmente à maior concentração do IFAV (10%). Em contrapartida, os extratos 5 e 6 exibiram coloração mais clara, justificando a menor concentração do insumo (2%), em paralelo com a mesma concentração (2%) observa-se o extrato 10, apresentando coloração mais escura quando comparado ao extrato 5 e 6, isso deve-se a maior proporção de etanol (70%), demonstrando ser um solvente capaz de extrair grande quantidade dos constituintes de interesse. Por possuir um caráter anfifílico, é possível extrair substâncias com características apolares e polares, como por exemplo, as substâncias fenólicas, fato este que pode justificar o maior teor de flavonoides totais no extrato 10 (SATO et al., 2018). Esse evento também foi avaliado por outros autores, Pereira e colaboradores relacionaram a variação das colorações, a partir do extrato de *Miconia Ciliata*.

Através da análise preliminar de melhor condição de extração, o maior resultado obtido em concentração de flavonóides foi por meio do método de maceração, proporção 70:30 etanol/água e 2% de IFAV, como demonstrado na tabela 4. Com isso, foi preparado 5L do extrato seguindo esses parâmetros. Em seguida, o concentrado foi filtrado e o solvente foi removido pela técnica de rotaevaporação sob pressão reduzida, em rotaevaporador (IKA® RV 8) como demonstrado na figura 12. Partindo do princípio que o ponto de ebulição diminui com a diminuição da pressão, isto permite que solventes sejam vaporizados à temperaturas inferiores do que seu ponto de ebulição em pressão normal, o vapor é condensado e o processo de destilação é realizado. Por fim, o material resultante foi submetido à secagem em estufa de circulação de ar por tempo necessário, obtendo o extrato final (Figura 13).

Figura 12 – Remoção do solvente no extrato de *Annona muricata* por rotaevaporação



Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Figura 13 – Extrato de *Annona muricata* L. obtido por evaporação rotativa



Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

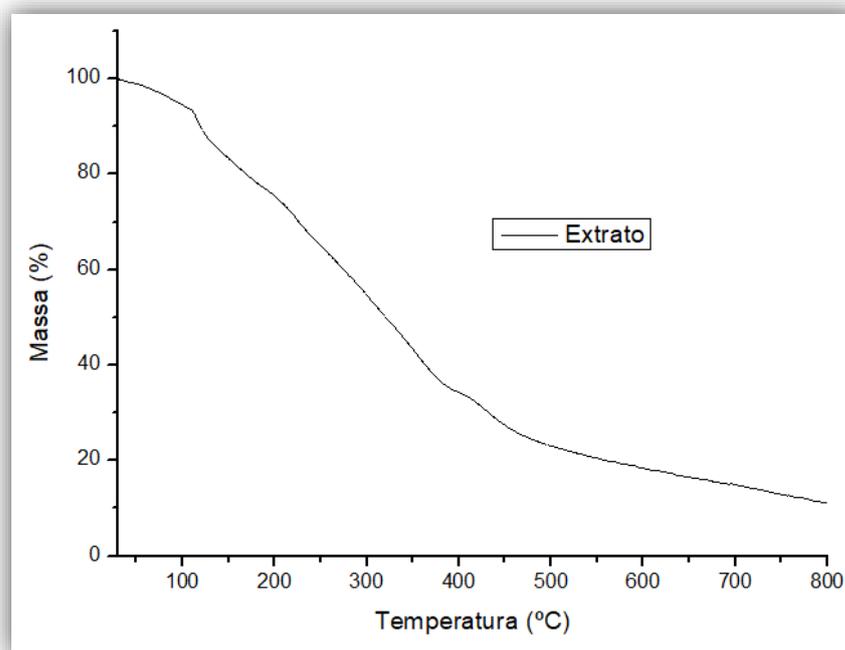
Conforme mostrado na figura 13, o extrato não obteve total evaporação da água. Segundo Rodrigues e colaboradores (2016), as preparações extrativas de plantas secas apresentam-se com consistência variada. Os extratos podem ser classificados em extratos fluído, mole e seco. Nos extratos fluídos, parte do extrato equivale a uma parte em massa ou volume do insumo vegetal seco. A evaporação parcial do solvente, com mínimo de 70% de resíduos secos, representa os extratos moles. Já os extratos secos são obtidos a partir da evaporação total do solvente, mínimo de 95% de resíduos sólidos em massa. Dessa maneira, os extratos são classificados de acordo com a quantidade residual de umidade presente, e, portanto da concentração atingida durante a evaporação, sendo assim o extrato de *Annona muricata* obtido no presente estudo, foi considerado um extrato mole.

5.3.5 Termogravimetria

A curva termogravimétrica medida sob fluxo de nitrogênio da amostra do extrato puro foi ilustrada na figura 14. A primeira etapa ocorreu entre 31,55 e 106,67°C com perda de massa (Δm) de 6,099%, essa decomposição térmica pode ser atribuída à perda inicial de produtos voláteis, principalmente água livre. A 2ª etapa ocorreu entre 106,67 e 168,62°C, com Δm de 13,62%, a 3ª etapa ocorreu entre 168,62 e 366,83 °C, com Δm de 40,54%. A 2ª e 3ª etapas representam as degradações dos micro e macros nutrientes da amostra vegetal, assim como demonstrado no estudo de Brandão et al. (2016). A 4ª etapa ocorreu entre 366,83 e

427,89 °C com Δm de 8,47%, a última etapa ocorreu entre 427,89 e 900 °C, caracterizado por uma perda de massa lenta e progressiva.

Figura 14 – Curva termogravimétrica do extrato de *Annona muricata*



Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

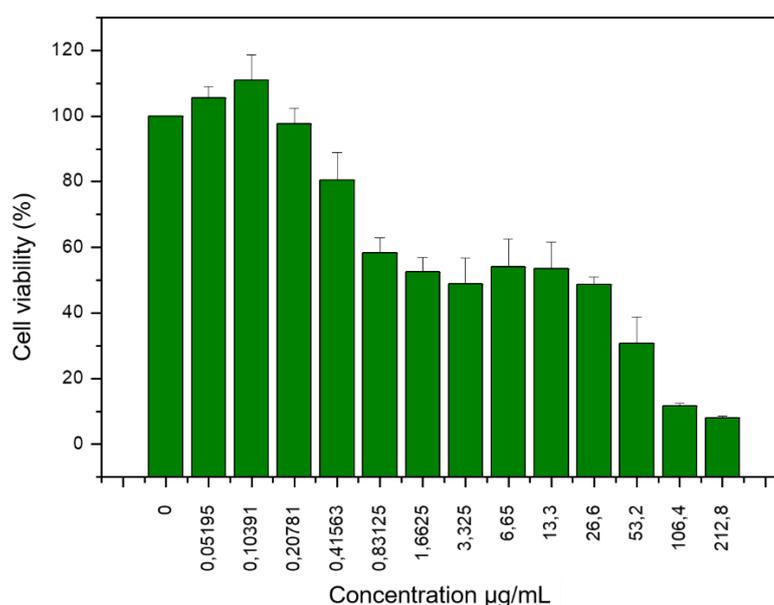
5.3.6 Análise de citotoxicidade do extrato de *Annona muricata* L.

Para determinar o grau de toxicidade celular que o extrato de *Annona muricata* L. apresenta, a fim de se mostrar compatível ou não como uso de IFAV, foi realizado o teste de MTT utilizando diferentes concentrações do extrato. A Figura 15 mostra os resultados obtidos para células HepG2 submetidas ao tratamento com extrato mole de *Annona muricata*. Através deste gráfico foi possível realizar a regressão linear da curva e, usando a equação gerada, é possível determinar a IC50, ou seja, a concentração necessária para causar 50% de letalidade das células, que, neste caso, foi $8,95 \pm 0,21 \mu\text{g/mL}$.

Através da figura 15 foi demonstrado que todas as concentrações testadas menores ou iguais a $0,20781 \mu\text{g/ml}$ do extrato não apresentaram citotoxicidade, pois apresentaram valores de viabilidade celular em torno de 100%, ou seja, semelhantes ao controle negativo, em que as células foram tratadas apenas com meio de cultura. De fato, em concentrações do extrato abaixo de $0,10 \mu\text{g/ml}$, a viabilidade celular foi ligeiramente superior ao controle negativo, o que pode ser devido à prevenção da morte celular, talvez pela atividade antioxidante desse

extrato. Outros estudos utilizando extratos vegetais podem ser encontrados na literatura demonstrando esse mesmo comportamento (IBRAHIM; ABDULLAHI, 2015; RODUAN et al., 2019). A análise desses resultados permitiu observar a segurança estabelecida no uso terapêutico do extrato.

Figura 15 – Viabilidade celular (%) de células HepG2 tratadas com diferentes concentrações do extrato de *Annona muricata* L.



Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

5.3.7 Estudos *in vivo*

5.3.7.1 Toxicidade aguda

O ensaio de toxicidade aguda é um indicativo da segurança de uma substância em determinadas faixas de dose, utilizada para avaliar o efeito tóxico em um sistema biológico. Esta toxicidade aguda ocorre quando há um único contato (dose única) com o agente tóxico, dentro de aproximadamente 24 horas (DE OLIVEIRA et al., 2018; PRASESTI; KURNIATI, 2022).

Desse modo, para avaliar o perfil de segurança do extrato das folhas *Annona muricata* foi realizado o teste de toxicidade aguda segundo o protocolo estabelecido pela Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD). Como preconizado, foi

administrado nos animais do grupo tratado uma dose equivalente a 2000 mg kg⁻¹ e em seguida avaliado a mortalidade e os sinais de toxicidade durante as primeiras 4 horas após a administração do extrato através do screening hipocrático (tabela 7).

O peso corporal e consumo de água e ração foram monitorados durante 14 dias, conforme os resultados mostrados na tabela 5 e 6. O peso corporal é um dos parâmetros utilizados em avaliações toxicológicas para indicar o aparecimento precoce de efeitos tóxicos de uma determinada substância, e pode ser observada por meio da redução nos consumos de água e ração (JUNIOR et al., 2012). No presente estudo, os grupos controle e tratado mantiveram uma média de consumo entre si, sem alterações pertinentes, assim como demonstrado no ganho de peso de ambos.

Tabela 5 – Efeito do tratamento com extrato de *Annona muricata* na mudança de peso dos animais. Valores correspondentes a média e desvio padrão.

Grupos	Peso (g) dia 0	Peso (g) dia 14
Controle (Salina)	21,66 ± 0,47	21,66 ± 1,88
Extrato (2.000mg.kg ⁻¹)	20,00 ± 0,81	20,66 ± 1,24

Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Tabela 6 – Efeito do tratamento com extrato de *Annona muricata* no consumo diário de água e ração de camundongos fêmeas. Valores correspondentes a média e desvio padrão.

Grupos	Água (mL)	Ração (g)
Controle (Salina)	15,42 ± 1,50	12,21 ± 1,92
Extrato (2.000mg.kg ⁻¹)	15,57 ± 0,75	13,07 ± 1,54
Valor <i>p</i>	0,8231	0,2050

Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Não foram registradas mortes dos animais após o tratamento com 2000 mg kg⁻¹ do extrato. Os resultados da avaliação dos parâmetros comportamentais (tabela 7) revelaram que os animais do grupo tratado apresentaram analgesia com 1 e 2 horas, quando submetido a estímulo doloroso na cauda, esses resultados podem estar associado a mais uma atividade terapêutica do extrato como demonstrado no estudo de Kuswinarti et al., 2018 que comprovaram o efeito analgésico do extrato etanólico de *Annona muricata* em ratos Wistar,

Vocalização	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Refluxo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2) Depressora										
Abdução das patas posterior	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ambulação diminuída	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Analgesia	0	0	0	3	0	3	0	0	0	0
Anestesia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ataxia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Catatonía	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Estiramento	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hipnose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Perda do reflexo auricular	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Perda do reflexo córneo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ptose palpebral	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sedação	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sonolência	0	0	0	1	0	3	0	3	0	3

Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Legenda: C (controle); T (tratado). Classificação dos efeitos: (0) sem efeito; (1) pouco efeito; (2) efeito médio; (3) efeito intenso

Ao final do 14º dia os órgãos dos animais foram retirados e avaliados segundo alterações macroscópicas e o peso, conforme demonstrado na tabela 8 e figura 16. A tabela 9 dispõe os pesos dos órgãos aplicando-se o teste *t* de Student, não foi observada diferença estatística significativa entre o grupo controle e o tratado, assim como, nenhuma alteração visual foi observada, não revelou nenhuma anormalidade, presença de lesões ou alterações na cor dos órgãos.

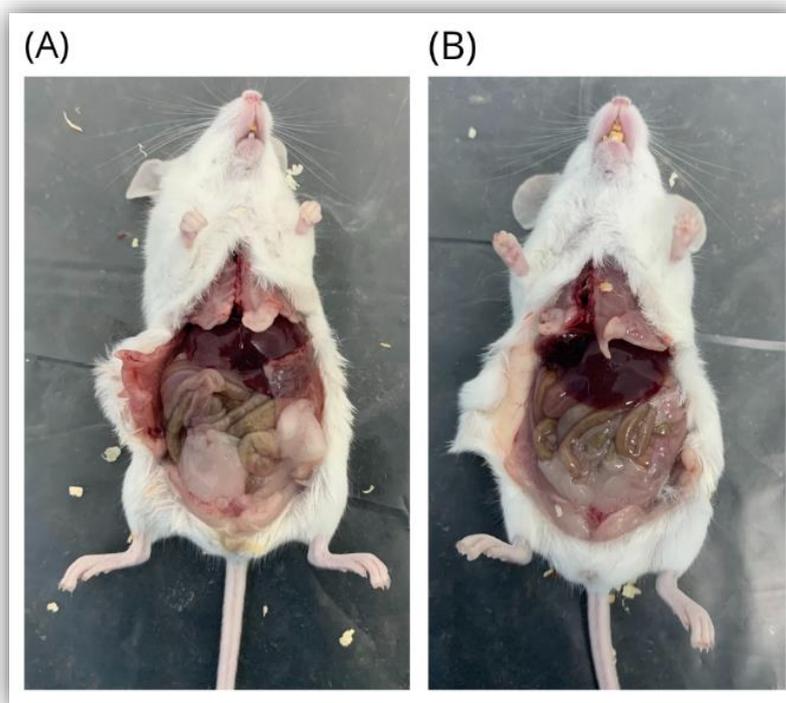
Tabela 8 – Peso dos órgãos de camundongos fêmeas tratadas com extrato de *Annona muricata*, após 14 dias. Valores correspondentes a média e desvio padrão.

Órgãos	Controle	Extrato (2.000 mg.kg ⁻¹)	Valor <i>p</i>
Coração	0,125 ± 0,02	0,139 ± 0,02	0,355
Rins	0,161 ± 0,01	0,170 ± 0,01	0,7798
Baço	0,132 ± 0,05	0,062 ± 0,006	0,0764
Fígado	1,097 ± 0,11	1,064 ± 0,15	0,2576
Estômago	0,399 ± 0,08	0,319 ± 0,04	0,2419

Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Valores expressos em média ± desvio padrão. Teste T *student*.

Figura 16 – Observação dos órgãos dos animais ao fim do teste de toxicidade aguda



Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Legenda: Imagem (A) animal do grupo controle; Imagem (B) animal do grupo tratado

5.3.7.2 Edema de pata induzido por zymosan

O teste de edema de pata induzido por zymosan (ZM) a 2% foi utilizado para avaliar a ação antiinflamatória do extrato de *Annona muricata*, nas doses de 10, 100 e 200 mg/kg por via oral. Em camundongos, a administração de ZM promove o surgimento de parâmetros inflamatórios e, conseqüentemente, é considerado um modelo animal adequado para estudar novas abordagens terapêuticas para inflamação (GUAZELLI et al., 2018).

O teste de edema de pata induzido por zymozan foi avaliado e quantificado através do tamanho das patas dos animais, por meio do aparelho pletismômetro, que consiste em uma cuba elaborada para registrar o volume líquido deslocado, ao introduzir a pata dos animais.

O grupo controle negativo não recebeu agente antiinflamatório. Foi utilizado como parâmetro para avaliar o edema induzido pela aplicação do zymozan. Neste grupo, os volumes das patas (Δ .mm³) dos animais variaram em 30 min, 1, 2, 4 e 6hrs: 0,08; 0,1525; 0,1075; 0,115; 0,245, respectivamente, atingindo valores máximos entre a 2^a e 6^a hora como demonstrado na figura 17. Segundo Maione et al., 2019 e Santos, 2015 esse fator pode ser explicado pelas duas fases inflamatórias induzidas pelo zymosan: I- O processo inflamatório é

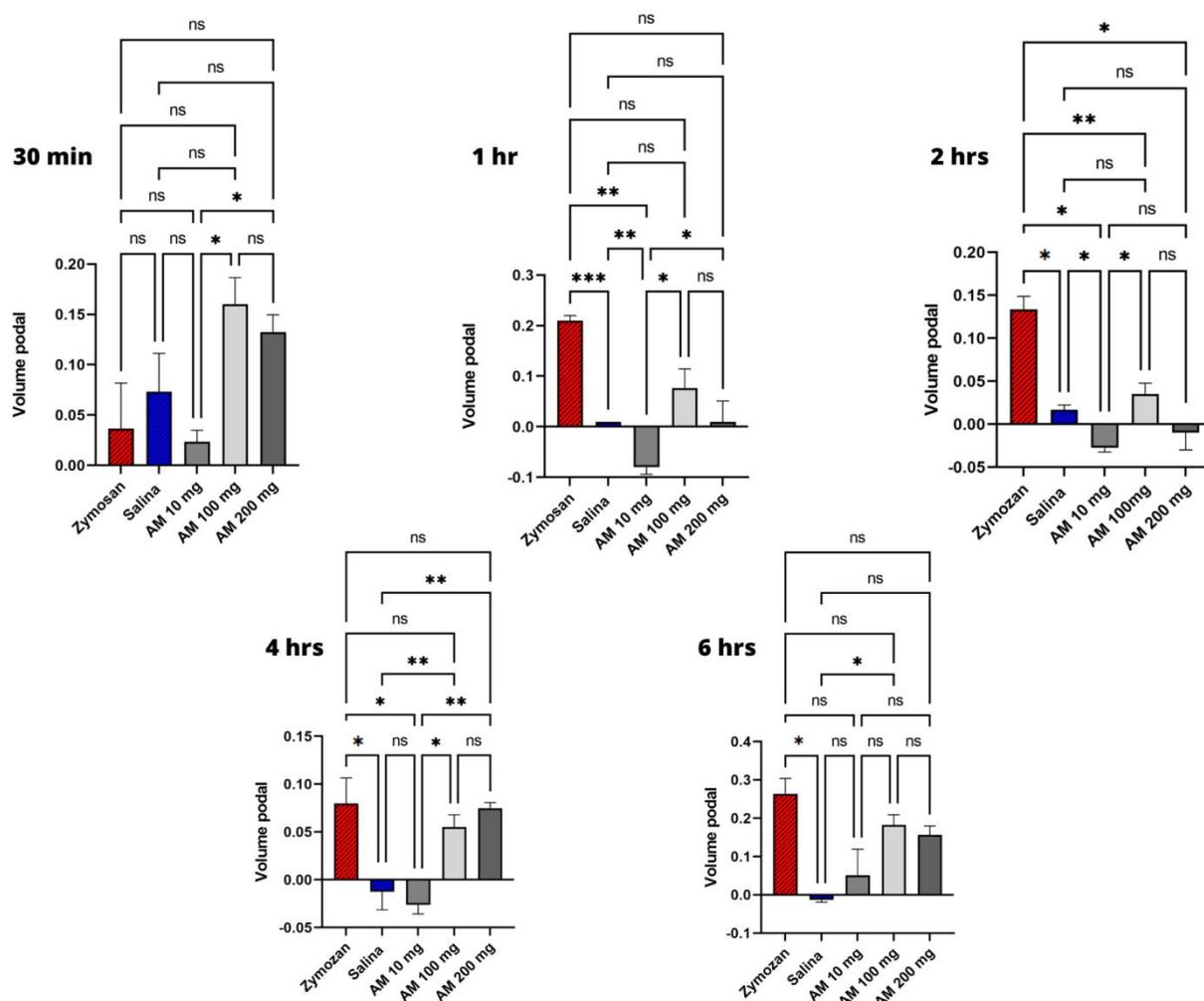
mediado pela atuação do sistema complemento C3a e C5a, ocorre o recrutamento dos mastócitos e basófilos, desencadeando a liberação de histamina e serotonina nas primeiras 2 horas. Na fase II ocorre a liberação de metabólitos oriundos do ácido araquidônico, espécies reativas de oxigênio e citocinas.

A média das variações basais (mL) dos grupos zymosan, salina, A.M 10 mg, A.M 100 mg e A.M 200 mg correspondeu à: 0,28; 0,21; 0,33; 0,29 e 0,29. Não houve diferença estatística entre os volumes basais de cada grupo estudado. Esses valores foram utilizados para o cálculo de inibição do edema. Dessa maneira, o grupo tratado com a dose de 10 mg kg⁻¹ de *Annona muricata*, apresentou percentual de inibição em 30 min de 82,57%, atingindo 100% com 1h, sustentando esse resultado até 4hrs de teste e diminuindo para 87,87% com 6hrs.

O grupo tratado com a dose de 100 mg kg⁻¹ demonstrou percentual de inibição em 30 min, 1, 2, 4 e 6hrs de: 37,93; 80,17; 87,93; 81,03 e 37,06% e o grupo tratado com 200mg kg⁻¹ de (54,48; 96,55; 94,82; 74,13 e 51,72%) quando comparados ao volume basal de suas respectivas medições.

As duas maiores doses apresentaram perfis equivalentes nos tempos de teste, sem diferença estatística. Entretanto, o grupo tratado com a menor dose (10 mg kg⁻¹) apontou diferença significativa (**p < 0,1) quando comparado ao grupo controle zymozan, além disso, apresentou maiores porcentagens de inibição, resultando em total inibição do edema na primeira hora do teste. Esses resultados foram sustentados em 2 horas de teste (**p < 0,1) e 4 horas (*p < 0,5), assim como demonstrou não ser dose-dependente. Esses resultados permitem estabelecer a dose terapêutica para esse IFAV em 10 mg kg⁻¹ correspondendo ao seu efeito máximo (Figura 17).

Figura 17 – Gráfico de dose resposta do extrato de *Annona muricata* frente ao ensaio de edema de pata induzida por zymozan



Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Os gráficos expressam a média \pm SEM da diferença entre as patas por cada tempo estabelecido após a injeção, em função dos tratamentos; $n = 4$ animais por grupo. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA one-way), seguida do teste de Turkey. * $p < 0,5$; ** $p < 0,1$; *** $p < 0,01$; ns: não significativo.

Com base nos resultados demonstrados na figura 17, foi possível observar que nos primeiros 30 minutos não havia edema instalado. Em todas as concentrações analisadas, com 1 hora, o extrato apresentou atividade com diminuição da inflamação, se mantendo por até mais de 4 horas. Esse fato pode ser justificado pela presença das substâncias ativas do extrato de *Annona muricata* que afetam o processo inflamatório de forma ampla, tanto nas fases iniciais quanto nas tardias da resposta inflamatória.

O estudo proposto por SM, Abdul Wahab et al. (2022) utilizou as folhas de *Annona muricata* para desenvolver um extrato etanólico 80%, demonstrando ação imunossupressora

por diferentes vias imunológicas. Através desse estudo, foi observado que o extrato atuou significativamente nas respostas imunes humorais. Em relação às respostas imunes inatas, observou-se que o extrato foi capaz de reduzir na maior dose (400 mg/kg) a migração de neutrófilos, reduziu a liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e inibiu a expressão de ceruloplasmina, esta é uma proteína de fase aguda, conseqüentemente seu nível será elevado em processos inflamatórios. O fato de o extrato ter se mostrado capaz de impedir a liberação de citocinas pró- inflamatórias que são responsáveis pela liberação de ceruloplasmina na corrente sanguínea, lhe torna promissor, isso corrobora com os resultados obtidos no presente estudo, justificando a diminuição do edema de pata na primeira hora do teste.

Através do estudo de Abdul Wahab, também foi observado a diminuição da expressão dos anticorpos IgM e IgG, responsivos pelo início da resposta imune adaptativa. Com isso, endossa a permanência do efeito antiinflamatório na pata dos animais nas 4 horas do nosso teste, o que pode ser indicativo de efetividade do extrato de *Annona muricata* nas respostas tardias da inflamação.

Outra pesquisa desenvolvida por Ojo et al., (2022) avalia as propriedades do extrato aquoso das cascas de *A. muricata* frente a ratos diabéticos. Foi demonstrado que após a administração nas doses de 6,76; 13,53 e 27,06 mg/kg do extrato, os níveis de fibrinogênio (FBG) diminuíram, assim como avaliou-se os níveis séricos de insulina, HOMA- β e análise histológica das células pancreáticas. Através deste estudo foi observado que os flavonóides e ácido benzóico presente no extrato foram capazes de atuar na redução da resistência à insulina em ratos, em doses relativamente baixas, isso reforça nossos resultados significativos de atividade antiinflamatória na dosagem de 10mg/kg, comprovando a ação terapêutica do extrato de *A. muricata*.

Visando entender o porquê as concentrações de 100 e 200 mg/kg não seguiram o padrão de dose-reposta, buscas na literatura foram feitas e observou-se o estudo desenvolvido por Uğurbaş et al., (2022). Com objetivo de avaliar a ação antioxidante do extrato aquoso das folhas de *A. muricata*, os autores observaram que conforme aumentava a concentração do extrato ocorria uma diminuição nos derivados da oxidação do óxido nítrico, ou seja, o incremento da concentração não implicou sempre em ação maior, na verdade, reduziu a atividade antioxidante. Na concentração de (5 μ g/ml) ocorreu inibição do radical hidroxila, em contrapartida, ao testar concentrações maiores, a ação antioxidante foi reduzida.

Com base nesse resultado farmacológico (10 mg/kg), realizou-se a extrapolação de dose para uso em humanos, baseado no guia proposto por Nair (2016), a dose para camundongos foi calculada considerando o fator de conversão humano para camundongos

albino de acordo com a área de superfície corporal. Isso foi feito dividindo-o pelo peso humano adulto de 70 kg e multiplicando-o por um fator para acomodar a área de superfície corporal do animal. O cálculo da dose foi feito através da fórmula (I) e (II) abaixo, em que utiliza um expoente para a área de superfície corporal (0,67), que representa a diferença na taxa metabólica:

$$(I) \quad \text{HED (mg / kg} = \text{Animal NOAEL mg/kg)} \times (\text{Peso}_{\text{animal}} [\text{kg}]/\text{Peso}_{\text{humano}} [\text{kg}])^{(1-0,67)}$$

$$(II) \quad \text{HED (mg/kg)} = \text{Animal faz (mg/kg)} \times (\text{Animal } K_m / \text{Humano } K_m)$$

Onde, HED é a dose equivalente humana;

NOAEL é a maior dose onde não são observados efeitos adversos;

K_m é o fator de correção.

Desta maneira,

$$\text{HED (mg/kg)} = 0,01\text{g/kg} \times (0,02 \text{ kg} / 70 \text{ kg})^{0,33 \times (37/3)}$$

$$\text{HED (mg/kg)} = 0,615 \text{ mg/kg}$$

Portanto, a dose equivalente humana (HED) para uma dose animal de 0,01 g/kg, levando em consideração a diferença na superfície corporal entre animais e humanos, seria de 0,615 mg/kg. Isso significa que, se um ser humano de 70 kg ingerisse a mesma quantidade da substância por quilograma de peso corporal que o animal, a dose equivalente seria de 43,05 mg.

5.4 Conclusão

A caracterização físico-química da matéria prima vegetal (folhas de *Annona muricata*), foi realizada através da determinação de granulometria, pH, densidade, cinzas, e demonstraram qualidade em todos os testes preconizados pela Farmacopeia para controle do insumo farmacêutico. A partir disso, o extrato etanólico das folhas de *Annona muricata* foi produzido por meio da maceração, 70:30 etanol/água e 2% de IFAV obtendo resultado de maior concentração de flavonoides (16,99 mg).

A citotoxicidade *in vitro* do extrato foi analisada e o resultado de IC50 foi $8,95 \pm 0,21$ $\mu\text{g/mL}$. Nos testes *in vivo*, a atividade antiinflamatória do extrato com dose de 10 mg kg^{-1} apresentou maior percentual de inibição do edema de pata, o efeito apontou diferença significativa (** $p < 0,1$) na 1 hora de teste, sustentando a atividade por até mais de 4 horas. No estudo de toxicidade aguda nenhuma diferença significativa foi observada entre o grupo tratado e o controle, evidenciando que o extrato não é tóxico na dose estudada. A extrapolação de dose roedor-humano demonstrou que para um ser humano de 70 kg, a dose equivalente seria de 43,05 mg/kg.

Portanto, a atividade antiinflamatória do extrato de *Annona muricata* foi confirmada, como também demonstrou melhor atividade na menor dose do estudo, cessando completamente a inflamação. Dessa forma, tais resultados contribuem de maneira significativa para elucidação e validação científica do uso das folhas de *Annona muricata*.

CAPÍTULO II. INCORPORAÇÃO DO EXTRATO DE
***Annona muricata* L. EM FILMES POLIMÉRICOS TIPO**
UREASIL-POLIÉTER

6 CAPÍTULO II- INCORPORAÇÃO DO EXTRATO DE *ANNONA MURICATA* L. EM MATERIAIS HÍBRIDOS DO TIPO UREASIL-POLIÉTER

6.1 Introdução

Novas estratégias vêm surgindo para entrega de extratos vegetais, capazes de melhorar resultados farmacocinéticos e clínicos (BEM-SHABAT et al., 2020). Dentre as tecnologias recentes na obtenção de sistemas poliméricos nanoestruturados, os materiais híbridos orgânico inorgânicos são promissores e de grande interesse na área científica devido às suas propriedades e aplicações abrangentes (SOUSA, 2019).

Os materiais híbridos são formados em combinação de componentes inorgânicos e orgânicos, geralmente em tamanho submicrométrico (1 μ m) (GARCIA-MARTINEZ; COLLAR, 2020). A parte orgânica é responsável por conferir características físicas ou químicas específicas à membrana, em contrapartida, a inorgânica aumenta a resistência termomecânica. Ambas as fases atuam em sinergia, complementando suas propriedades.

Com características mecânicas otimizadas, os materiais híbridos ureasil-poliéter mostram-se capazes de atuar como sistema de liberação controlada de fármacos, além de oferecerem flexibilidade, transparência, boa adesão, biocompatibilidade (CARAVIERI et al., 2019; CHIAVACCI et al., 2022) assim como, as condições amenas de polimerização preservam a natureza química das moléculas orgânicas. Conseqüentemente o uso desses materiais têm atraído atenção para fins farmacêuticos (DE JESUS et al., 2018; MARIANO et al., 2021).

Agentes ativos, incluindo compostos orgânicos, polifenólicos e flavonóides podem ser incorporados em matrizes poliméricas e atuar com efeito antiinflamatório acentuado. Desse modo, a incorporação de ativos vegetais em matrizes tem sido estudada com o objetivo de buscar os seus efeitos, além de garantir uma alta margem de segurança ao paciente, sem os efeitos ulcerogênicos observados no uso de outros fármacos antiinflamatórios. O uso em longo prazo desta classe de medicamentos está atrelado a risco a saúde, neste sentido é de grande relevância a pesquisa por novos ativos que possam ser incorporadas em novas formas farmacêuticas.

Considerando o efeito antiinflamatório do extrato das folhas de *Annona muricata* e o potencial dos sistemas híbridos do tipo ureasil poliéter como veículo para o uso transdérmico, no presente estudo foi realizado o desenvolvimento de filmes contendo o extrato, avaliada suas propriedades e atividade antiinflamatória *in vivo*.

6.2 Metodologia

6.2.1 Síntese de precursores híbridos e preparação de STT

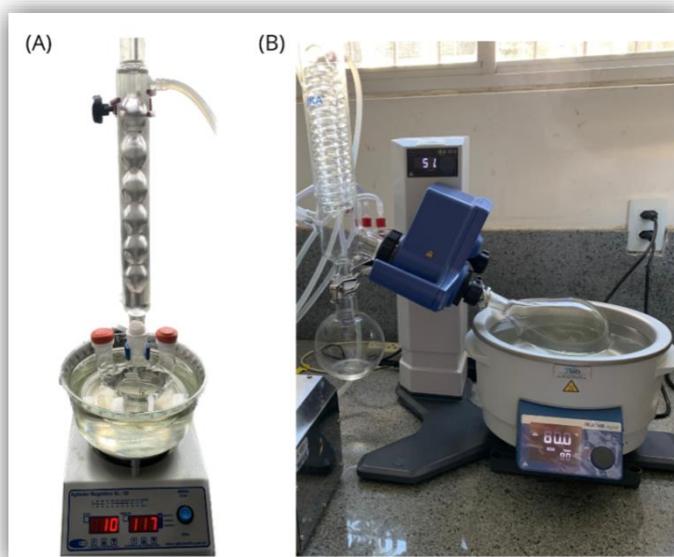
Os materiais híbridos ureasil-poliéter foram sintetizados pelo método sol-gel. Os precursores híbridos foram preparados pela reação de um alcóxido modificado (3-isocianatopropiltrióxido de silano (IsoTrEOS) do qual foram utilizados 22,5 mL e adicionados gradativamente, sob agitação, a um polímero modificado (NH₂-POE-NH₂) 27,3 g, com peso molecular 500 g mol⁻¹ (tabela 9). Esta mistura foi diluída em 40 mL de etanol, sob refluxo e temperatura de 60°C por 24 horas (figura 18 a) (OSHIRO, 2015; OSHIRO 2017). Posteriormente, o solvente foi eliminado sob aquecimento e pressão reduzida (rotaevaporação) (figura 18 b).

Tabela 9 – Descrição dos materiais e quantidades na preparação do precursor

Material	IsoTrEOS	Polímero	Etanol
Ureasil- PEO 500	22,5 mL	27,3 g (PEO- massa molar 500 g mol ⁻¹)	40 mL

Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Figura 18 – Processo de preparo do precursor híbrido



Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Obtido o precursor híbrido, realizou-se as reações de hidrólise e condensação, promovidas pela adição de 500 μL de etanol, 100 μL água e 50 μL de catalisador ácido (HCl) com concentração de 0,2 M. Foi adicionado 0,750 g do precursor híbrido para 1, 3, 6 e 10% do extrato de *A. muricata*, permitindo a dispersão e retenção do extrato na matriz polimérica.

6.2.2 Caracterização Físico-Química

6.2.2.1 Microscopia de força atômica (MFA)

Foram realizadas medições de topografia dos sistemas com e sem extrato, utilizando a técnica de MFA. A análise foi realizada utilizando o microscópio de força atômica (Bruker, modelo Dimension Icon), em modo de contato intermitente. A amostra foi adicionada ao microscópio e assim, as imagens topográficas foram observadas usando uma sonda/cantilever, varrendo uma área de $4 \times 5 \mu\text{m}$. O tratamento das imagens topográficas foi realizado utilizando o software NanotecWSxM versão 5.0.

6.2.2.2 Espalhamento de Raios-X de Pequeno Ângulo (SAXS)

A linha de espalhamento de raios X de baixo ângulo (SAXS) do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS; Campinas, São Paulo, Brasil) foi usada para caracterização de nanoestruturas. A linha SAXS 1 foi equipada com um conjunto de fendas assimétricas e um monocromador de silício, o que nos permite obter um feixe monocromático de $\lambda = 1.608 \text{ \AA}$ e uma seção transversal de aproximadamente $1,6 \text{ mm}^2$. Um detector de raios X sensível à posição e um analisador multicanal foram usados para monitorar a intensidade do feixe espalhado, $I(q)$, em função do módulo de vetor de espalhamento $q = (4\pi/\lambda)\sin(\varepsilon/2)$, onde ε é o ângulo de espalhamento dos raios X.

A intensidade espalhada foi normalizada pela espessura e atenuação da amostra. Para isso, foram realizadas medições *in situ* antes e durante a passagem do tampão fosfato (pH 7,2) pelo material utilizando uma bomba peristáltica para controlar o fluxo do meio, mantido a 37°C .

6.2.2.3 Termogravimetria (TG)

As curvas TG do STT puro, STT com extrato de *Annona muricata*, e o precursor híbrido foram obtidas utilizando o analisador térmico simultâneo TG modelo SDT Q600 (TA Instruments, New Castle, Delaware, EUA), sob fluxo de nitrogênio (100 mL/min), nas taxas de aquecimento de 10°C.min⁻¹, faixa de temperatura entre 30– 900 °C, utilizando 6 mg de amostra previamente pesadas em cadinho de alumina.

6.2.3 Estudo de liberação *in vitro*

O sistema transdérmico contendo o extrato de *Annona muricata* foi imerso em 25 mL do meio receptor (tampão fosfato pH 7,2) a 37 °C. O sistema foi mantido sob agitação com pás a 50 rpm. Em tempos pré-determinados de 15, 30, 45, 60, 120, 240, 300, 360, 420, 480, 600, 720, 1440, 2880, 4320, 5760 minutos, 1,5 mL do meio receptor foram removidos para determinar a concentração do fármaco incorporado no sistema em função do tempo por meio do espectrofotômetro a 415 nm.

6.2.4 Estudo *in vivo*

6.2.4.1 Avaliação da atividade farmacológica

A avaliação de atividade farmacológica foi realizada no Laboratório de Ensaio Farmacológicos da UEPB. Os procedimentos de cuidados e manuseio de animais estavam em estrita conformidade com as recomendações do Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório dos Institutos Nacionais de Saúde e encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 08 de outubro de 2008, com o decreto 6.899 de 05 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA) registrada com o nº 027/2022.

6.2.4.2 Edema de pata induzida por zymosan

Os testes de edema de pata foram realizados conforme realizados por Anter (2018), com adaptações. Foram organizados 4 grupos de 4 animais, machos. Primeiramente, os animais receberam, na região plantar das patas traseiras esquerdas, o volume de 50 µL da

solução de zymozan a 2%. No outro grupo foi administrado apenas 50 μ L de salina estéril tamponada (PBS) utilizado como controle. Ademais, foi administrado no grupo tratado por via tópica uma solução formadora de filme *in situ* (0,3 mL) contendo 45 mg de *Annona muricata* L. O grupo controle positivo recebeu o tratamento com (0,3 mL) a pomada fitoterápica Fexive. Nos tempos 30 min, 1, 2, 4 e 6 h, o volume de cada pata de camundongo foi medido em mm^3 com o auxílio de um plestismômetro, antes do tratamento e após a estimulação do edema, a quantidade de inchaço da pata foi determinada para cada animal e os dados foram representados como variação do volume da pata ($\Delta \cdot \text{mm}^3$).

6.2.5 *Análise estatística*

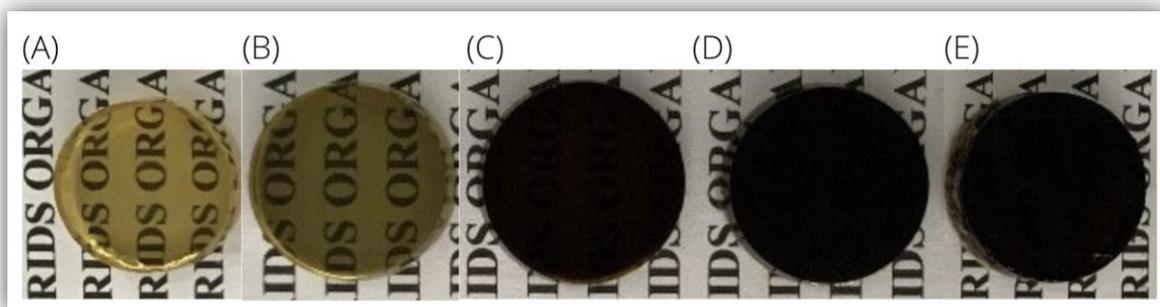
Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão das medidas feitas em cada grupo. Para o estudo de atividade farmacológica foi empregado ANOVA one-way com teste de Tukey. Todos os dados foram analisados utilizando o *Software Prism 9.4.1* (GraphPad, San Diego, CA, EUA). As diferenças estatísticas foram consideradas significativas para * $p < 0,5$; ** $p < 0,1$; *** $p < 0,01$.

6.3 Resultados e Discussão

6.3.1 Materiais híbridos com *Annona muricata*

Os materiais híbridos (Figura 19) apresentaram características contínuas (ausência de rupturas e fraturas após a secagem), homogêneas (ausência de partículas insolúveis ou visíveis ao olho nu) e flexíveis semelhantes às descritas no estudo de Andrade et al., 2017. Segundo análise macroscópica, a coloração foi variável. Os materiais (a) e (b) A.M 1% e A.M 3% respectivamente mostraram-se com aspecto mais transparente, os materiais híbridos (c) A.M 6% e (d) A.M 10 % com a tonalidade verde escuro, coloração específica do extrato incorporado. Constatou-se que quanto maior a concentração de incorporação do extrato mais intensa é a coloração do sistema, podendo ser visto no material (e) com 20% do extrato de A.M. Além disso, o material (e) apresentou fratura e aspecto não homogêneo devido à grande quantidade de extrato.

Figura 19– Sistemas híbridos contendo *Annona muricata*



Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

6.3.2 Caracterização físico-química dos sistemas contendo *Annona muricata*

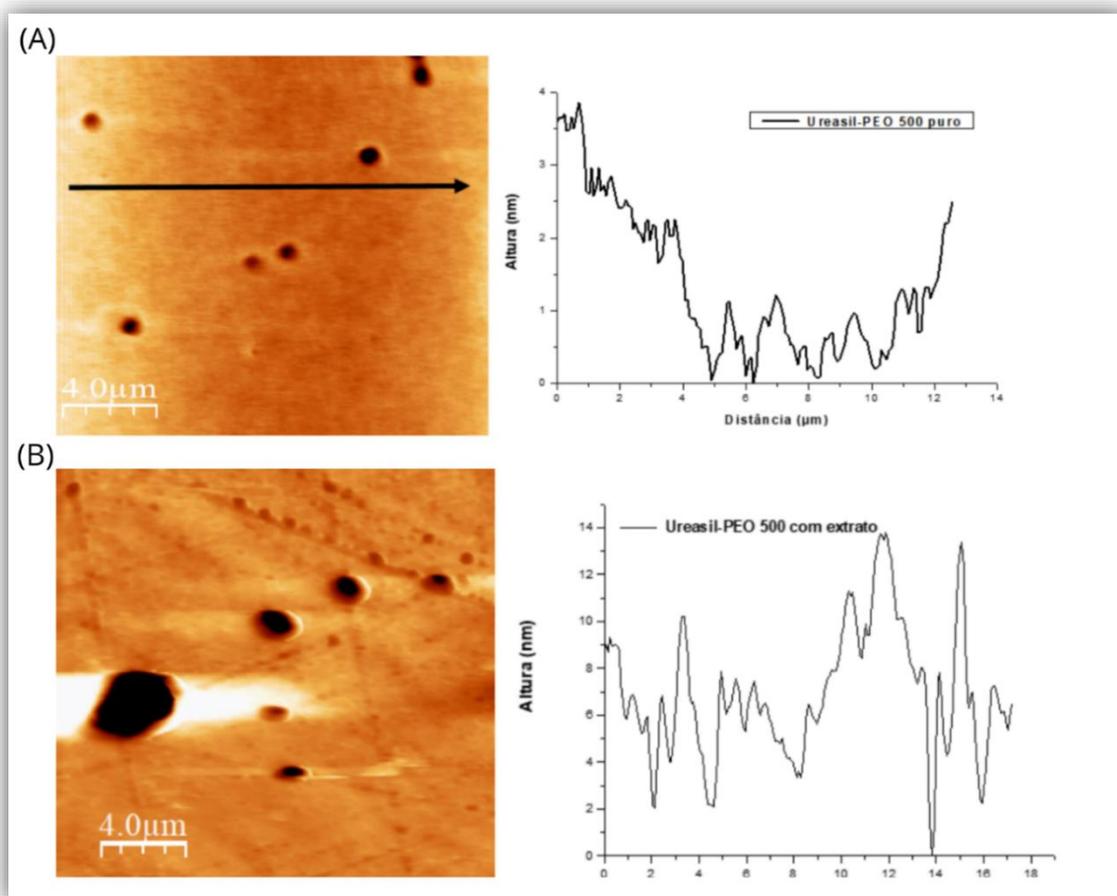
6.3.2.1 Microscopia de força atômica (MFA)

Considerando que a técnica MFA se baseia na varredura da superfície da amostra por uma ponta em pirâmide ou também chamada de ponta e integrada num cantilever flexível, pode ser operada em três modos diferentes: modo de contato, modo sem contato e modo de contato intermitente (GARCIA, 2020; GIESSIBL, 2003), as amostras foram analisadas

procurando uma melhor compreensão das superfícies destes materiais. Através da figura 20, é possível observar os resultados da topografia em modo de contato para (A) Ureasil-PEO puro e (B) com o extrato, respectivamente.

Como se pode ver, a superfície ureasil-PEO pura é relativamente plana na área considerada, com variações de altura de aproximadamente 3 nm, com uma rugosidade média (RMS) de 1,73 nm e a presença de poros (média = 523 nm de diâmetro), consistente com a literatura (OSHIRO et al., 2018). Contudo, quando o extrato é adicionado ao material ureasil-PEO, houve um aumento da rugosidade média (RMS) da superfície (5,91 nm), com variações de altura de aproximadamente 14 nm. No entanto, o fato que merece destaque foi o aumento dos poros (média = 1,575 μm). Os poros observados no material ureasil-PEO é um fator que contribui para a liberação do fármaco, uma vez que os poros facilitam a penetração do meio fisiológico no material e, conseqüentemente, a dissolução do fármaco e a sua saída da matriz.

Figura 20 – Imagem topográfica do ureasil-PEO 500 puro e com extrato incorporado



Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

6.3.2.2 Espalhamento de Raios-X de Pequeno Ângulo (SAXS)

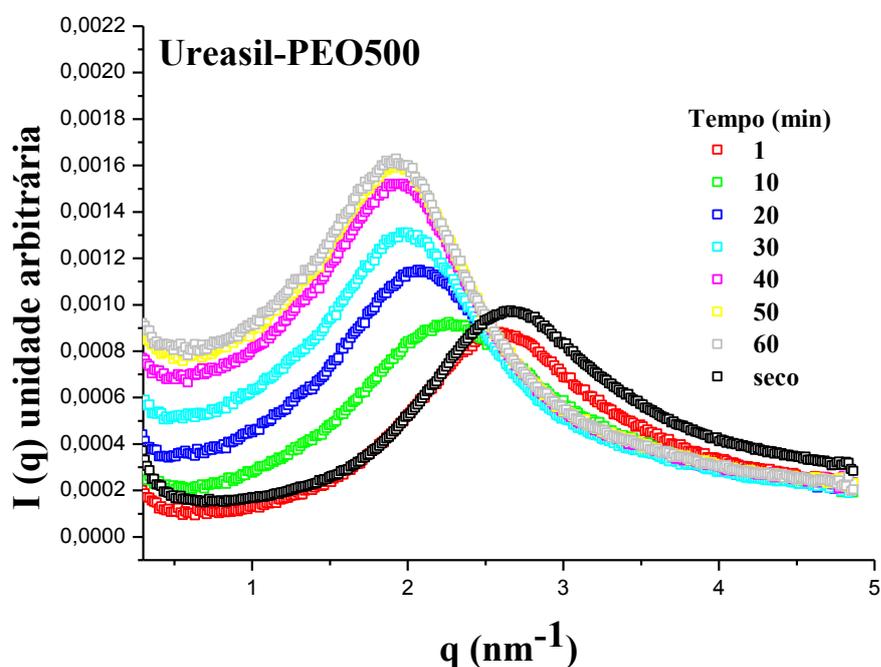
Visto que a técnica SAXS é amplamente utilizada para a caracterização de materiais que são formados por uma cadeia polimérica orgânica e uma fase inorgânica que contém silício “Si” (Si-O-Si), em virtude de existir uma grande diferença de densidade eletrônica entre os cadeia orgânica e os “nós” de silício, as medições “*in situ*” usando SAXS foram realizadas, antes e durante o processo de passagem do meio de liberação (pH 7,2 tampão fosfato com 0,5% procetyl) pelo sistema ureasil-PEO500. A distância de correlação entre dois “nós” de silício pode ser calculada pela seguinte equação:

$$d = 2\pi/q_{max}$$

(q_{max} é o valor máximo do pico presente na curva SAXS e d é a distância entre os “nós” de silício).

A Figura 21 mostra a evolução temporal das curvas SAXS para o sistema ureasil-PEO500. A curva no tempo 0 corresponde à amostra seca (antes de entrar em contato com o meio).

Figura 21 – Evolução temporal das curvas SAXS para sistemas ureasil-PEO500.



Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

A Figura 21 revela a presença de um único pico largo para cada curva, o que é característico de uma forte correlação espacial entre os “nós” de silício (MOLINA et al., 2014). Além disso, também é possível observar que há um deslocamento da posição máxima do pico de correlação para valores baixos de q , conforme aumenta o tempo de contato com o meio de liberação, indicando que os grupos siloxano estão se distanciando devido ao relaxamento das cadeias poliméricas (inchaço).

Após 50 minutos de contato com o meio, observa-se que não há deslocamento no pico de correlação. A Tabela 10 apresenta os valores dos parâmetros q_{max} e d calculados para todas as curvas dos sistemas ureasil-PEO500 mostrados na Figura 21. Observa-se que houve um aumento na distância de correlação entre os grupos siloxano, pois sua distância no material puro é de 2,33 nm e após 60 minutos é de 3,30 nm, após 50 minutos não houve alteração.

Tabela 10 – Posição dos picos no vetor espalhamento q_{max} e distância de correlação “ d ” entre os grupos siloxano e a região polimérica da matriz para os híbridos ureasil-PEO500.

Tempo	q_{max}	D
Seco	2,69	2,33
10	2,29	2,74
20	2,08	3,01
30	1,96	3,20
40	1,92	3,27
50	1,90	3,30
60	1,90	3,30

Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

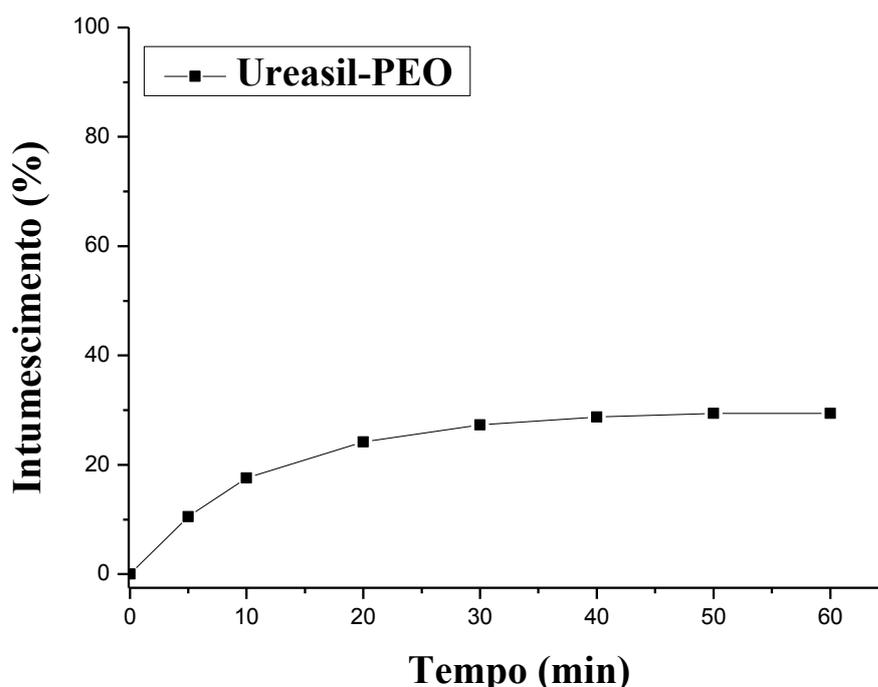
A partir do valor da distância de correlação calculada (d), é possível analisar a porcentagem de aumento da distância entre os grupos de siloxano após cada tempo de contato com o meio, através da relação:

$$\Delta d = dt - ds / dt$$

Onde, dt é o valor da distância de correlação no tempo t de contato com o meio de liberação e ds é o valor da distância de correlação calculada para a amostra seca (antes do contato com o meio de liberação). A Tabela 10 mostra esses valores.

Pode-se observar na Figura 22 que o material ureasil-PEO500 sofreu um intumescimento nanoscópico de 29,40% após 50 minutos de contato com o meio. Esse processo ocorre devido à adsorção do meio através do material que possui características hidrofílicas. Após 50 minutos, o inchaço atinge seu equilíbrio.

Figura 22 – Intumescimento nanoscópico em função do tempo de contato com tampão fosfato



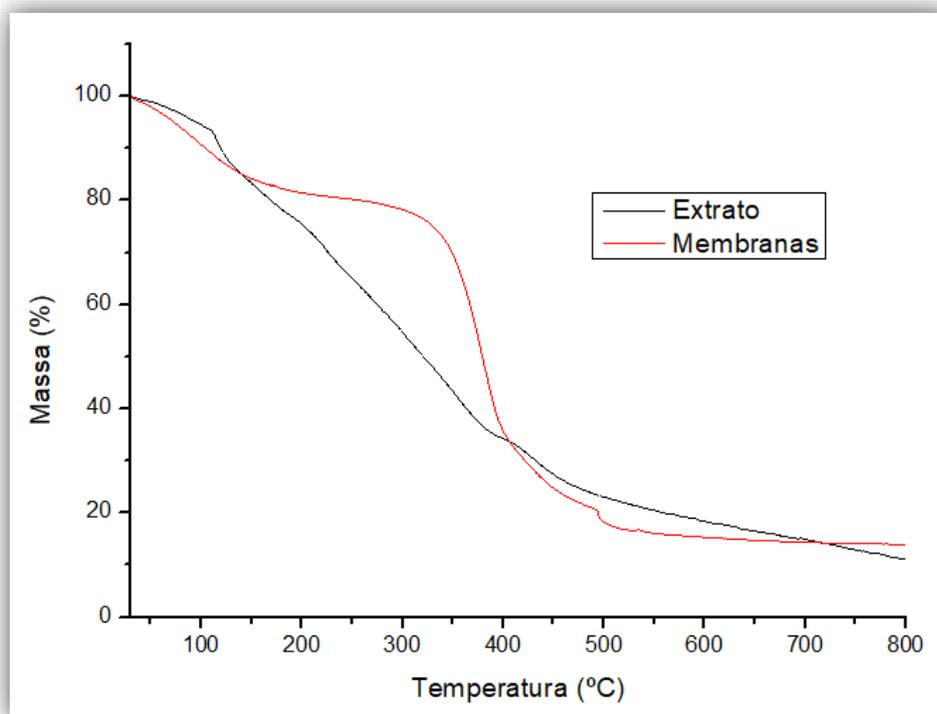
Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

6.3.2.3 Termogravimetria (TG)

As curvas termogravimétricas medidas sob fluxo de nitrogênio das amostras do extrato incorporado no sistema híbrido, e o extrato puro foram ilustradas na figura 23. Na curva do sistema híbrido com extrato de *Annona muricata* (figura 23) foi possível observar o primeiro evento de perda de massa nas temperaturas entre 29,91 e 223,91 °C resultado da evaporação de produtos voláteis, com perda de massa (Δm) de 18,98%. A 2ª etapa ocorreu entre 223,91 e 497,80°C, com Δm de 60,0%, esse evento pode ser justificado pela decomposição dos componentes no sistema híbrido, assim como a condensação do grupo silanol e a 3ª etapa ocorreu entre 497,80 e 899,96°C, com menor perda Δm de 6,70%. Os materiais possuem

maior resistência ao calor, os resultados do TG revelaram que a estabilidade térmica foi melhorada em relação ao extrato puro (FU 69T al., 2008; MEKAWYT al., 2011).

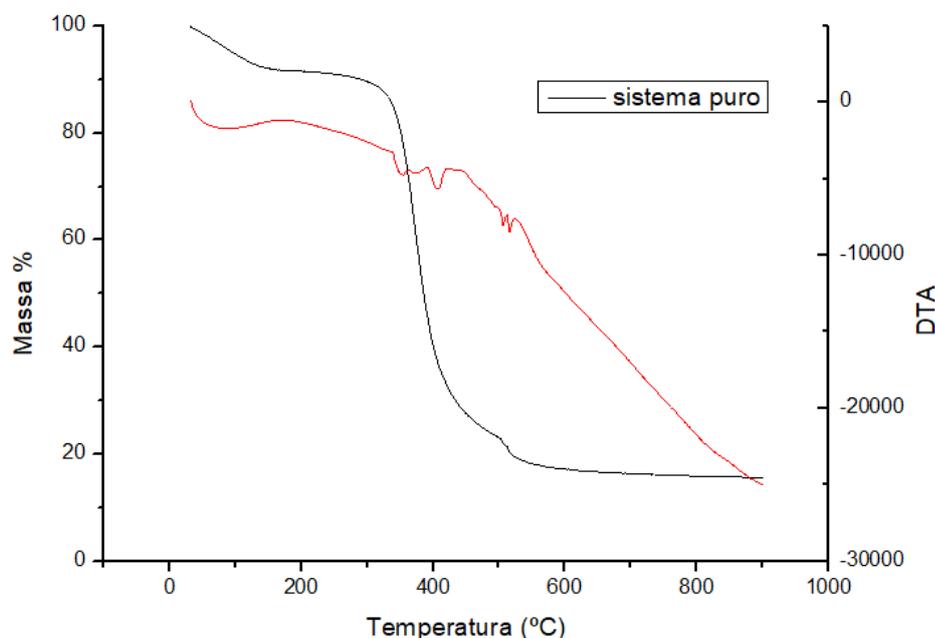
Figura 23 – Curvas termogravimétricas do extrato puro e do material com extrato incorporado



Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

A curva termogravimétrica do STT puro (PEO 500) foi ilustrada na figura 24. Foi possível observar três eventos de decomposição térmica. O primeiro evento ocorreu entre 57,50 e 161,37 °C com perda de massa de 13,41%, atribuída à evaporação de produtos voláteis com água e etanol. O segundo e principal evento ocorre entre 268,33 e 431,39 °C com Δm de 57,74%. Por fim, o terceiro evento ocorreu entre 500,00 e 900°C com perda de massa de 8,61%.

Figura 24 – Curva termogravimétrica do material puro (POE 500)



Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

6.3.3 Estudo de liberação *in vitro*

Os dados apresentados na figura 25 mostram o perfil de liberação do extrato de *Annona muricata* L. do STT orgânico-inorgânico. Os resultados sugerem uma liberação lenta dos ativos a partir do sistema, estando em conformidade com a literatura (NOGUEIRA, 2019). Pode-se observar que após 5760 minutos (96 horas) de contato com o líquido receptor, o STT ureasil-PEO liberou 0,1259% do extrato de *Annona muricata* L., este fato indica a possibilidade de controlar a liberação de *Annona muricata* por dias ou até mesmo meses. A quantificação do extrato foi realizada por espectrofotometria UV-VIS a 415 nm.

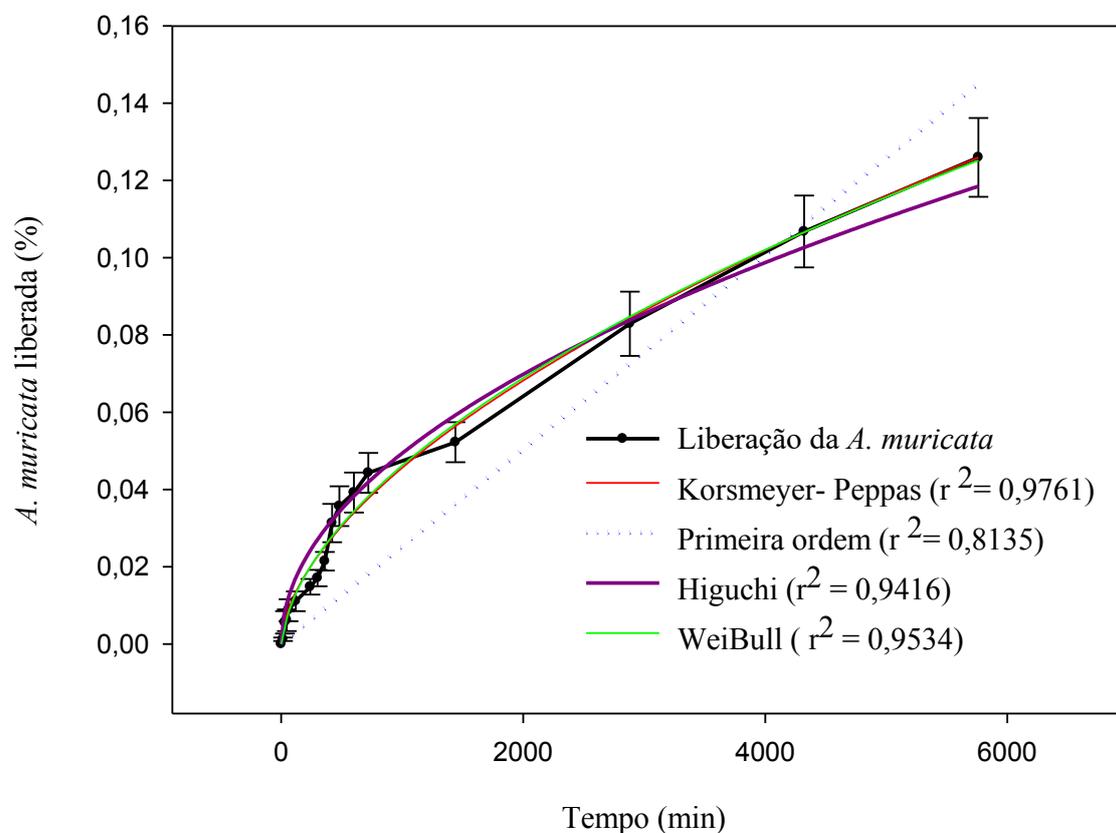
A cinética de liberação do sistema foi obtida a partir dos modelos matemáticos específicos, fato este, importante para entender e elucidar os mecanismos de transporte envolvidos no controle do processo de liberação do fármaco da matriz. Os modelos cinéticos aplicados foram os de primeira-ordem, Higuchi, Weibull e Korsmeyer-Peppas através do software Sigma Plot 10.0. Após aplicar os modelos matemáticos e submetê-los à regressão linear, obteve-se como resultado que o modelo de Korsmeyer-Peppas apresentou maior coeficiente de correlação ($r^2 = 0,9761$), isso indica que a cinética de liberação da *Annona muricata* a partir do STT orgânico-inorgânico segue este modelo.

O modelo de Korsmeyer-Peppas é representado pela fórmula (III) abaixo:

$$(III) \quad M_t / M_\infty = Kt^n + b$$

Onde, K é a constante cinética, que incorpora características estruturais e geométricas do mecanismo e n é o expoente de liberação que, de acordo com o valor numérico que assume, caracteriza e classifica o mecanismo de liberação do fármaco em: n= 0,45 são processos controlados por difusão (modelo Fickiano), valores de n entre 0,45 e 0,89 indicam um transporte anômalo não Fickniano, que corresponde à combinação de dois mecanismos, o de difusão e o fenômeno de intumescimento do polímero, através do relaxamento da cadeia polimérica (LOPES; LOBO; COSTA, 2005). Portanto, de acordo com os dados no presente estudo, o STT contendo *Annona muricata* apresentou valor do expoente n de 0,57, ou seja, a liberação do fármaco está ocorrendo pelo transporte anômolo não Fickniano.

Figura 25 – Liberação do extrato de *Annona muricata* em função do tempo (minutos)



Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

6.3.4 Avaliação da atividade farmacológica

6.3.4.1 Edema de pata induzida por zymosan

O STT na concentração de 6% obtido na etapa anterior do estudo foi avaliado quanto a sua propriedade antiinflamatória, através do teste de edema de pata induzido por zymosan a 2%. O teste foi avaliado e quantificado através do tamanho das patas dos animais, por meio do aparelho pletismômetro, que consiste em uma cuba elaborada para registrar o volume líquido deslocado, ao introduzir a pata dos animais. Os resultados do estudo para avaliação da atividade antiinflamatória do sistema contendo o extrato de *A. muricata* estão apresentados na Figura 26.

O grupo controle zymozan não recebeu agente antiinflamatório. Foi utilizado como parâmetro para avaliar o edema induzido pela aplicação do zymozan. Neste grupo, os volumes das patas dos animais variaram de 0,36 mL a 0,52 mL (figura 26), atingindo valores máximos entre a 4^a e 6^a hora. Segundo Maione et al., 2019 e Santos, 2015 esse fator pode ser explicado pelas duas fases inflamatórias induzidas pelo zymosan: I- O processo inflamatório é mediado pela atuação do sistema complemento C3a e C5a, ocorre o recrutamento dos mastócitos e basófilos, desencadeando a liberação de histamina e serotonina nas primeiras 2 horas. Na fase II ocorre a liberação de metabólitos oriundos do ácido araquidônico, espécies reativas de oxigênio e citocinas.

O grupo controle positivo recebeu o tratamento com a pomada Flexive® CDM, um fitoterápico, cujo princípio ativo é o extrato hidroalcoólico da raiz de Confrei (*Symphytum officinale*) 350 mg/g, possui ação anti-inflamatória, analgésica, redutor de edema, assim como promove regeneração e granulação tissular. Os componentes responsáveis por essas propriedades são a alantoína, os mucopolissacarídeos e os taninos. Esse fármaco foi escolhido por se tratar de um fitoterápico, corroborando com o presente estudo, que também visa avaliar um produto natural (FLEXIVE, 2010).

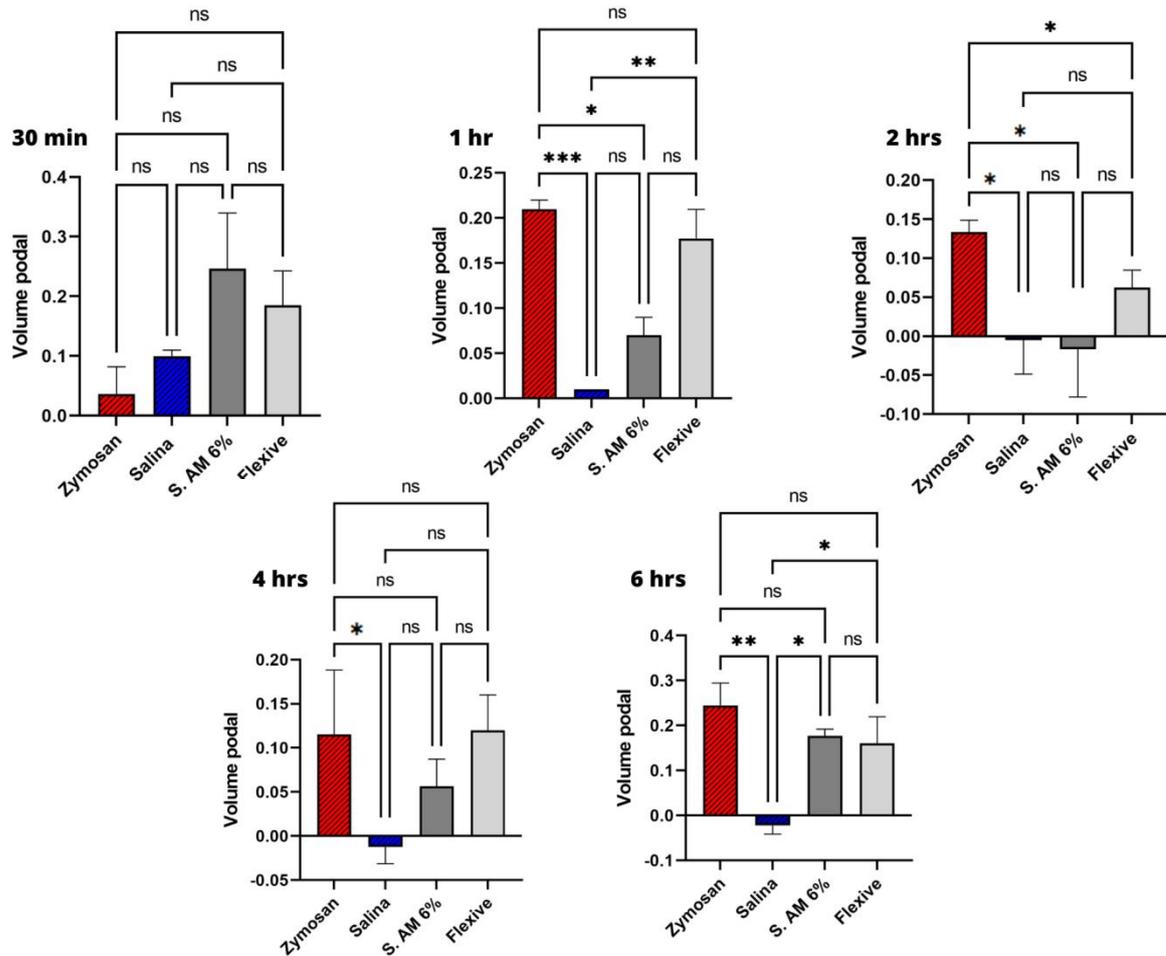
O edema do grupo tratado com o controle positivo (flexive) apresentou resultados no percentual de inibição em 30min, 1, 2, 4 e 6hrs de: 28,15; 31,06; 75,72; 44,66 e 37,86% respectivamente. Em paralelo, o grupo tratado com o sistema híbrido de AM a 6% inibiu em (23,30; 94,17; 118,44; 84,46 e 43,68%) (figura 26 e 27). Esses resultados demonstraram que o grupo tratado com o sistema AM 6% apresentou um pico de inibição entre 1 e 2 horas de teste (*p < 0,5), já o fármaco comercial demonstrou atividade apenas na segunda hora de teste (*p < 0,5), voltando a diminuir (%) no decorrer do tempo. Com isso, podemos avaliar que o

sistema estudado mostrou resultados superiores ao grupo tratado com flexive, tornando-se promissor seu uso para controle de inflamação.

Correlacionando os resultados obtidos através do sistema (S.AM 6%) com os resultados obtidos com o extrato puro exposto no capítulo anterior, observa-se que o tratamento S.AM 6% também cessou completamente a inflamação na segunda hora de teste, mantendo controlada a inflamação. Por se tratar de uma perspectiva de aplicação por via transdérmica, várias vantagens surgem quando comparados a administração por via oral, como por exemplo, evita a passagem pelo trato gastrointestinal, baixo índice de efeitos colaterais, além de liberação controlada com preservação do efeito terapêutico (PHATALE et al., 2022; SABBAGH; KIM, 2022).

Um estudo conduzido por Kuznetsova et al. (2022) avaliou a entrega de antiinflamatórios através de lipossomas híbridos por via transdérmica, como resultados observou-se que o sistema foi efetivo no controle da inflamação frente ao teste de edema de pata, além disso os autores demonstraram que o sistema lipossomal híbrido com diclofenaco sódico incorporado apresentou maior eficácia terapêutica quando comparado ao sistema convencional. Isso corrobora em partes com o presente estudo, tendo em vista que o sistema híbrido contendo *Annona muricata* pode desempenhar atividade maior ou similar ao extrato puro por via de administração oral.

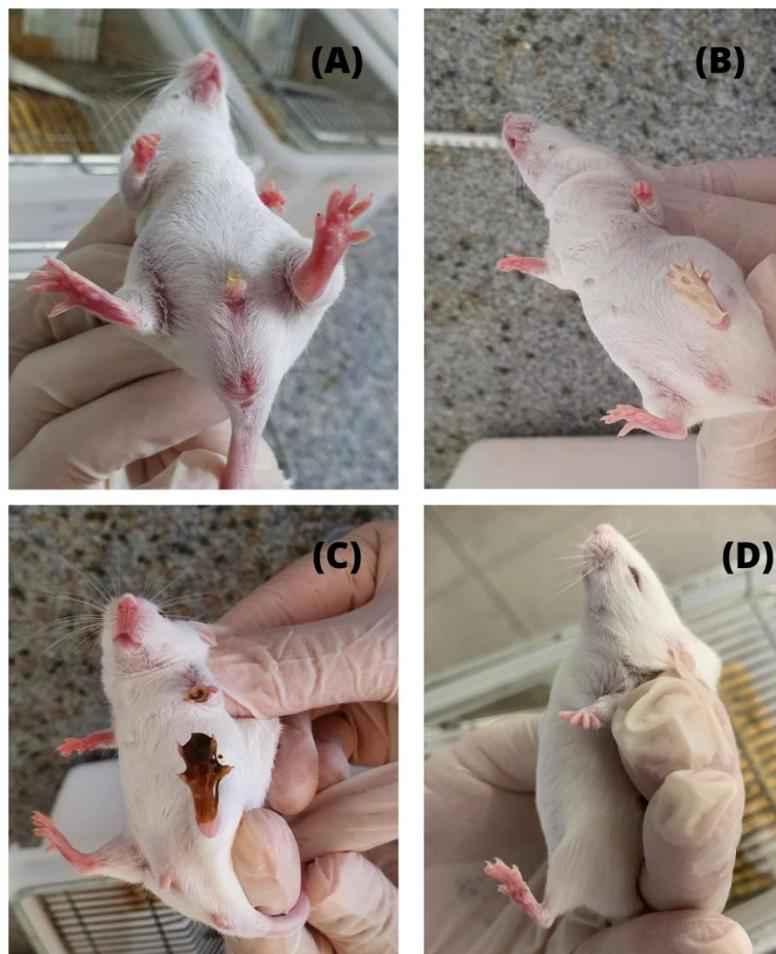
Figura 26 – Gráfico de resposta do sistema de *Annona muricata* (S. AM 6%) frente ao ensaio de edema de pata induzida por zymozan em função do tempo



Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Os gráficos expressam a média \pm SEM da diferença entre as patas por cada tempo estabelecido após a injeção, em função dos tratamentos; $n = 4$ animais por grupo. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA one-way), seguida do teste de Turkey. * $p < 0,5$; ** $p < 0,1$; *** $p < 0,01$; ns: não significativo.

Figura 27 – Imagem dos animais frente ao ensaio de edema de pata induzida por zymosan



Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Legenda: Imagem (A) representa a pata do animal com a inflamação. Imagem (B) animal com o tratamento comercial Flexive. Imagem (C) exibe o animal em tratamento com sistema terapêutico transdérmico contendo *Annona muricata*. Imagem (D) animal exibe pata sem a inflamação após tratamento com o sistema.

6.4 Conclusão

Na presente pesquisa, o objetivo foi atingido, sendo este o desenvolvimento do sistema híbrido do tipo ureasil-poliéter incorporadas do extrato das folhas de *Annona muricata* L. com finalidade de atuar com ação antiinflamatória. Toda a parte de obtenção e caracterização do extrato foi realizada e mencionada no capítulo anterior. No desenvolvimento dos filmes, atingiu-se a concentração de 6% como ideal por apresentar a coloração específica e homogeneidade estando, portanto, aptas a serem utilizadas nos processos seguintes do estudo.

Alguns efeitos foram proporcionados pela adição do extrato nos materiais, dentre eles, no teste de MFA obteve-se maior rugosidade, altura e aumento também dos poros, fatores que estão diretamente relacionados à liberação do fármaco. Além disto, as curvas termogravimétricas mostraram maior resistência à decomposição térmica dos materiais em relação ao extrato puro. Portanto, é possível evidenciar que ocorreu otimização do sistema.

Com a investigação da propriedade antiinflamatória, observou-se pelo teste *in vivo* de edema de pata que o sistema (S.AM 6%) reduziu a inflamação para níveis basais, ademais mostrou-se maior eficácia e ação quando comparado ao grupo controle comercial flexive, que praticamente não conseguiu manter o efeito terapêutico.

Portanto, a utilização do extrato de *Annona muricata* L., em sistema híbrido tipo ureasil-poliéter pode surgir como uma alternativa para superar as limitações encontradas em sistemas convencionais, proporcionando maior tempo de efeito farmacológico, liberação controlada do insumo ativo, menos efeitos colaterais, e facilidade de utilização dos pacientes. Tendo em vista toda a síntese de informações contida nesta pesquisa, torna-se promissor o uso deste sistema.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBASI, M.; MOUSAVI, M.J.; JAMALZEHI, S.; ALIMOHAMMADI, R.; BEZVAN, M.H.; MOHAMMADI, H.; ASLANI, S. Strategies toward rheumatoid arthritis therapy; the old the new. *Journal of Cellular Physiology*, v. 234, n.7, p. 10018–10031, 2019.
- ABDULKHALEQ, L. ASSI, M.A.; ABDULLAH, R.; ZAMRI-SAAD, M.; TAUFIQ-YAP, Y.H.; HEZMEE, M.N.M. The crucial roles of inflammatory mediators in inflammation: A review. *Veterinary world*, v. 11, n. 5, p. 627, 2018.
- ABUBAKAR, A. R.; HAQUE, M. Preparation of medicinal plants: Basic extraction and fractionation procedures for experimental purposes. *Journal of pharmacy & bioallied sciences*, v. 12, n. 1, p. 1, 2020.
- ACÉSIO, N.O.; CARRIJO, G.S.; BATISTA, T.H.; DAMASCENO, J.L.; CÔRREA, M.B.; TOZATTI, M.G.; CUNHA, W.R.; TAVARES, D.C. Assessment of the antioxidant, cytotoxic, and genotoxic potential of the *Annona muricata* leaves and their influence on genomic stability. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, v. 80, n. 23-24, p. 1290-1300, 2017.
- ALETAHA, Daniel; SMOLEN, Josef S. Diagnosis and management of rheumatoid arthritis: a review. *Jama*, v. 320, n. 13, p. 1360-1372, 2018.
- ALMEIDA, R. N.; FALCÃO, A. C. G. M.; DINIZ, R. S. T.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; POLARI, R. M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; AGRA, M. F.; DUARTE, J. C.; FERREIRA, C. D.; ANTONIOLLI, A. R.; ARAÚJO, C. C. Metodologia para avaliação de plantas com atividade no sistema nervoso central e alguns dados experimentais. *Revista Brasileira de Farmácia*, Rio de Janeiro, v. 80, p. 72-76, 1999.
- ALSENOSY, AW.A.; EL-FAR, A.H.; SADEK, K.M.; IBRAHIM, S.A.; ATTA, M.S.; SAYED-AHMED, A.; JAOUNI, S.K.A.; MOUSA, S.A. Graviola (*Annona muricata*) attenuates behavioural alterations and testicular oxidative stress induced by streptozotocin in diabetic rats. *PloSone*, v. 14, n. 9, p. e0222410, 2019.
- ANAND, U.; HERRERA, N.J.; ALTEMIMI, A.; LAKHSSASSI, N.A comprehensive review on medicinal plants as antimicrobial therapeutics: potential avenues of biocompatible drug discovery. *Metabolites*, v. 9, n. 11, p. 258, 2019.
- ANDRADE, Karina Luzia. **Desenvolvimento e caracterização de membranas de borracha natural associadas à extrato aquoso de própolis de bijuí para tratamento de queimaduras**. Dissertação (Mestrado em Ciência de Materiais)– Universidade Federal do Mato Grosso. Barra do Garças. 2017.
- ANTONY, B.; SINGH, A. Imaging and biochemical markers for osteoarthritis. *Diagnostics*, v. 11, n. 7, p. 1205, 2021.
- ASSUNÇÃO, D.P.S.F. **Desenvolvimento, caracterização e avaliação biológica de nanopartículas de ouro e de prata, obtidas por síntese verde, a partir do extrato de *Annonamuricata* Linnaeus (Annonaceae)**. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas)– Universidade Estadual do Centro-Oeste. Ponta Grossa. 2020.

AUGUSTO, M.F.; DA SILVA, R.V.; MIQUELITO, J.T.; FREITAS, K.G.; FERREIRA, V.L.; VIANA, F.G.A.; CARVALHO, D.B.; FILHO, A.M.; SIQUEIRA, E.C. Fisiopatologia e tratamento da artrite reumatoide: uma revisão narrativa. **Revista Eletrônica Acervo Médico**, v. 9, p. e10106-e10106, 2022.

AYE, M.M.; AUNG, H.T.; SEIN, M.M.; ARMIJOS, C.A review on the phytochemistry, medicinal properties and pharmacological activities of 15 selected Myanmar medicinal plants. **Molecules**, v. 24, n. 2, p. 293, 2019.

AZWANIDA, N. N. A review on the extraction methods usein medicinal plants, principle, strength and limitation. **Medicinal & Aromatic Plants**, v. 4, n. 196, p. 2167-0412, 2015. BAGATINI, Fabíola. **Avaliação econômica do tratamento da artrite reumatoide no componente especializado da assistência farmacêutica: utilização de recursos e qualidade de vida**. Tese (Doutorado em Farmácia) – Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. 2017.

BALDERRAMA-CARMONA, A.P.; SILVA-BELTRÁN, N.P.; GÁLVEZ-RUIZ, J.C.; RUÍZ-CRUZ, S.; CHAIDEZ-QUIROZ, C.; MORÁN-PALACIO, E.F. Antiviral, antioxidant, and antihemolytic effect of *Annona muricata* L. leaves extracts. **Plants**, v. 9, n. 12, p. 1650, 2020.

BARROS, R.M.; DA SILVA, C.G.; COSTA, K.M.N.; DA SILVA-JUNIOR, A.A.; SCARDUELI, C.R.; MARCANTONIO, R.A.C.; CHIAVACCI, L.A.; OSHIRO-JUNIOR, J.A. Dexamethasone-Loaded Ureasil Hydrophobic Membrane for Bone Guided Regeneration. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 5, p. 1027, 2022.

BEN-SHABAT, S.; YARMOLINSKY, L.; PORAT, D.; DAHAN, A. Antiviral effect of phytochemicals from medicinal plants: Applications and drug delivery strategies. **Drug delivery and translational research**, v. 10, n. 2, p. 354-367, 2020.

BRANDÃO, D. O.; GUIMARÃES, G.P.; SANTOS, R.L.; JUNIOR, F.J.L.R.; DA SILVA, K.A.; DE SOUZA, F.S.; MACÊDO, R.O. Model analytical development for physical, chemical, and biological characterization of *Momordica charantia* vegetable drug. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v. 2016, 2016.

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

BULLOCK, J.; RIZVI, S.A.A.; SALEH, A.M.; AHMED, S.S.; ANSARI, R.A.; AHMED, J. Rheumatoid arthritis: a brief overview of the treatment. **Medical Principles and Practice**, v. 27, n. 6, p. 501-507, 2018.

BUTTGEREIT, Frank; PALMOWSKI, Andriko. How to taper glucocorticoids in inflammatory rheumatic diseases? A narrative review of novel evidence in rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus, and giant cell arteritis. **Joint BoneSpine**, v. 89, n. 1, p. 105285, 2022.

CARAVIERI, B.B.; DE JESUS, N.A.M.; DE OLIVEIRA, L.K.; ARAUJO, M.D.; ANDRADE, G.P.; MOLINA, E.F. Ureasil organic-inorganic hybrid as a potential carrier for combined delivery of anti-inflammatory and anticancer drugs. **ACS Applied Bio Materials**, v. 2, n. 5, p. 1875-1883, 2019.

CARNEIRO, Patrícia dos Santos. **Análise da expressão diferencial dos genes envolvidos na resposta inflamatória aguda e crônica e sua influência na carcinogênese química cutânea em camundongos geneticamente selecionados para alta ou baixa reatividade inflamatória aguda.** Tese (Doutorado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo. São Paulo. 2009.

CERCATO, Luana M. et al. Reduced cutaneous inflammation associated with antioxidant action after topical application of the aqueous extract of *Annona muricata* leaves. **Inflammopharmacology**, v. 29, p. 307-315, 2021.

CHEN, Z.; BOZEC, A.; RAMMING, A.; SCHETT, G. Anti-inflammatory and immune-regulatory cytokines in rheumatoid arthritis. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 15, n. 1, p. 9-17, 2019.

CHIAVACCI, L.A.; DA SILVA, B.L.; CORRÊA, A.G.S.; PULCINELLI, S.H. Control of the structure and of the release profile of biological active molecules from materials prepared via sol-gel. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, v. 101, n. 1, p. 71-86, 2022.

CHIMENTI, M. S.; TRIGGIANESE, P.; CONIGLIARO, P.; CANDI, E.; MELINO, G.; PERRICONE, R. The interplay between inflammation and metabolism in rheumatoid arthritis. **Cell death & disease**, v. 6, n. 9, p. e1887-e1887, 2015.

CHOY, E.H.S.; PANAYI, G.S. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. **New England Journal of Medicine**, v. 344, n. 12, p. 907-916, 2001.

CORIA-TÉLLEZ, A.V.; MONTALVO-GONZALEZ, E.; YAHIA, E.M.; OBLEDO-VAZQUEZ, E.N. *Annona muricata*: A comprehensive review on its traditional medicinal uses, phytochemicals, pharmacological activities, mechanisms of action and toxicity. **Arabian Journal of chemistry**, v. 11, n. 5, p. 662-691, 2018.

COSMO, B.M.N.; GALERIANI, T.M. Composição bromatológica de beterraba, capim elefante e farinha de peixe. **Revista Brasileira Multidisciplinar**, v. 24, n. 3, p. 53-69, 2021.

CUTOLO, Maurizio. Glucocorticoids and chronotherapy in rheumatoid arthritis. **Rheumatic & Musculoskeletal Diseases open**, v. 2, n. 1, p. e000203, 2016.

DE JESUS, N.A.M.; DE OLIVEIRA, A.H.P.; TAVARES, D.C.; FURTADO, R.A.; DE SILVA, M.L.A.; CUNHA, W.R.; MOLINA, E.F. Biofilm formed from a tri-ureasil organic–inorganic hybrid gel for use as a cubebin release system. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, v. 88, n. 1, p. 192-201, 2018.

DE OLIVEIRA, A.M.; FREIRE, M.O.L.; DA SILVA, W.A.V.; FERREIRA, M.R.A.; PAIVA, P.M.G.; SOARES, L.A.L.; DE MEDEIROS, P.L.; CARVALHO, B.M.; NAPOLEÃO, T.H. Saline extract of *Pilosocereus gounellei* stem has antinociceptive effect in mice without showing acute toxicity and altering motor coordination. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 95, p. 289-297, 2018.

DE OLIVEIRA, B. F.; NEGREIROS, J.K.S.; BONFIM, K.S.; CAVALCANTE, J.A.; PINTO, M.F.; COSTA, N.A. Modelagem matemática da cinética de secagem em camada de espuma

da folha da gravioleira (*Annona muricata* Linn) e caracterização do pó obtido. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 4, p. e10942811-e10942811, 2020.

DHIMAN, S.; SINGH, T.G.; REHNI, A. K. Transdermal patches: a recent approach to new drug delivery system. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 5, p. 26-34, 2011.

DIAS, Ana Raquel Pires. **Sistemas transdérmicos**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias. Lisboa. 2013.

EL-WAKIL, E. S.; ABDELMAKSOU, H.F.; ABOUSHOUSA, T.S.; GHALLAB, M.M.I. Evaluation of *Annona muricata* (Graviola) leaves activity against experimental trichinellosis: *in vitro* and *in vivo* studies. **Journal of Helminthology**, v. 95, 2021.

ESTEVEZ, A.C.C.; BARROS-TIMMONS, A.; TRINDADE, T. Nanocompósitos de matriz polimérica: estratégias de síntese de materiais híbridos. **Química Nova**, v. 27, p. 798-806, 2004.

ETIENNE, R.; VIEGAS, F.P.D.; VIEGAS JR, C. Aspectos fisiopatológicos da inflamação e o planejamento de fármacos: uma visão geral atualizada. **Revista Virtual de Química**, v. 13, n. 1, 2021.

FANG, Q.; ZHOU, C.; NANDAKUMAR, K.S. Molecular and cellular pathways contributing to joint damage in rheumatoid arthritis. **Mediators of inflammation**, v. 2020, 2020.

FAUSTINI, M.; NICOLE, L.; RUIZ-HITZKY, E.; SANCHEZ, C. History of organic-inorganic hybrid materials: prehistory, art, science, and advanced applications. **Advanced Functional Materials**, v. 28, n. 27, p. 1704158, 2018.

FENG, J.; ZHANG, H. Hybrid materials based on lanthanide organic complexes: a review. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 1, p. 387-410, 2013.

FERNANDES, Daniel. **Inibição do edema de pata de camundongo induzida pela injeção de doadores de óxido nítrico**: envolvimento de guanilato ciclase solúvel e de canais de potássio. 2002. Dissertação (Pós-Graduação em Farmacologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.

FERREIRA, L. E.; CASTRO, P.M.N.; CHAGAS, A.C.S.; FRANÇA, S.C.; BELEBONI, R.O. *In vitro* anthelmintic activity of aqueous leaf extract of *Annona muricata* L. (Annonaceae) against *Haemonchus contortus* from sheep. **Experimental parasitology**, v. 134, n. 3, p. 327-332, 2013.

FLEXIVE: pomada. Responsável técnico Geraldo César Monteiro de Castro. Rio de Janeiro: Merck KGaA & Co, 2010. Disponível em: <https://staticwebv8.jet.com.br/drogaosuper/Bulas/7891721023422.pdf>. Acesso em: 3 nov. 2022.

FOONG, C.P.; HAMID, R.A. Evaluation of anti-inflammatory activities of ethanolic extract of *Annona muricata* leaves. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, p. 1301-1307, 2012.

FRAENKEL, Liana et al. 2021 American College of Rheumatology guideline for the treatment of rheumatoid arthritis. **Arthritis & Rheumatology**, v. 73, n. 7, p. 1108-1123, 2021.

FU, T.; WANG, J.; NI, J.; CUI, Z.; ZHONG, S.; ZHAO, C.; NA, H.; XING. Sulfonated poly(ether etherketone)/aminopropyltriethoxysilane/phosphotungstic acid hybrid membranes with non-covalent bond: Characterization, thermal stability, and proton conductivity. **Solid State Ionics**, v. 179, n. 39, p. 2265-2273, 2008.

GARCIA, Ricardo. Nanomechanical mapping of soft materials with the atomic force microscope: methods, theory and applications. **Chemical Society Reviews**, v. 49, n. 16, p. 5850-5884, 2020.

GARCÍA-MARTÍNEZ, Jesús-María; COLLAR, Emilia P. Organic–Inorganic Hybrid Materials. **Polymers**, v. 13, n. 1, p. 86, 2020.

GEORGE, V. C.; KUMAR, D.R.N.; SURESH, P.K. Antioxidant, DNA protective efficacy and HPLC analysis of *Annona muricata* (soursop) extracts. **Journal of food science and technology**, v. 52, n. 4, p. 2328-2335, 2015.

GERMOLEC, D.R.; SHIPKOWSKI, K.A.; FRAWLEY, R.P.; EVANS, E. Markers of inflammation. **Immunotoxicity Testing**, p. 57-79, 2018.

GHASEMIAN, M.; OWLIA, S.; OWLIA, M.B. Review of anti-inflammatory herbal medicines. **Advances in pharmacological sciences**, v. 2016, 2016.

GIESSIBL, F.J. Advances in atomic force microscopy. **Reviews of modern physics**, v. 75, n. 3, p. 949, 2003.

GODIN, Adriana Martins. **Atividades do 2-ftalimidoetanol e do nitrato de 2-ftalimidoetila, análogos ftalimídicos destituídos do anel glutarimídico, em modelos experimentais de dor e inflamação.** Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte. 2014.

GOMES, Thiago PO et al. *Miconia albicans* and *Curcuma longa* herbal medicines positively modulate joint pain, function and inflammation in patients with osteoarthritis: a clinical study. **Inflammopharmacology**, v. 29, n. 2, p. 377-391, 2021.

GONZÁLEZ-PEDROZA, María G. et al. Silver nanoparticles from *annona muricata* peel and leaf extracts as a potential potent, biocompatible and low cost antitumor tool. **Nanomaterials**, v. 11, n. 5, p. 1273, 2021.

GUAZELLI, C.F.S.; STAURENGO-FERRARIA, L.; ZARPELON, A.C.; PINHO-RIBEIRO, F.A.; RUIZ-MIYAZAWA, K.W.; VICENTINI, F.T.M.C.; VIGNOLI, J.A.; CAMILIOS-NETO, D.; GEORGETTI, S.R.; BARACAT, M.M.; CASAGRANDE, R.; VERRI JR, W.A. Quercetin attenuates zymosan-induced arthritis in mice. **Biomedicine & pharmacotherapy**, v. 102, p. 175-184, 2018.

HISS, Lorraine Stephane. **Extratos de folhas de *annonamuricata* são citotóxicos e reduzem a proliferação celular em carcinoma epidermóide oral *in vitro***. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal do Triângulo Mineiro. Uberaba. 2019.

HUA, C.; BUTTGEREIT, F.; COMBE, B. Glucocorticoids in rheumatoid arthritis: current status and future studies. **Rheumatic & Musculoskeletal Diseases open**, v. 6, n. 1, p. e000536, 2020.

IBRAHIM, N. S.; ABDULLAHI, M. Cytotoxicity, total phenolic contents and antioxidant activity of the leaves extract of *Annona muricata*. **ChemSearch Journal**, v. 6, n. 1, p. 46-51, 2015.

ISAAC, M.; HOLVEY, C. Transdermal patches: the emerging mode of drug delivery system in psychiatry. **Therapeutic advances in psychopharmacology**, v. 2, n. 6, p. 255-263, 2012.

ISHOLA, I.O.; AWODELE, O.; OLUSAYERO, A.M.; OCHIENG, C.O. Mechanisms of analgesic and anti-inflammatory properties of *Annona muricata* Linn. (Annonaceae) fruit extract in rodents. **Journal of medicinal food**, v. 17, n. 12, p. 1375-1382, 2014.

IYANDA-JOEL, W.O.; OMONIGBEHIN, E.A.; IWEALA, E.E.J; CHINEDU, S.N. Antibacterial studies on fruit-skin and leaf extracts of *Annona muricata* in Ota, Nigeria. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, p. 012029, 2019.

JABIR, M.S.; SALEH, Y.M.; SULAIMAN, G.M.; YASEEN, N.Y.; SAHIB, U.I.; DEWIR, Y.H.; ALWAHIBI, M.S.; SOLIMAN, D.A. Green synthesis of silver nanoparticles using *Annona muricata* extract as an inducer of apoptosis in cancer cells and inhibitor for NLRP3 inflammasome via enhanced autophagy. **Nanomaterials**, v. 11, n. 2, p. 384, 2021.

JOSÉ, N.M.; PRADO, L.A.S.DA. Materiais híbridos orgânico-inorgânicos: preparação e algumas aplicações. **Química Nova**, v. 28, p. 281-288, 2005.

JÚNIOR, H.B.P.; BORGES, L.M.F.; SOUSA, L.A.D; CUNHA, L.C.; JUNIOR, R.DS.L.; MELO, D.F.A.; PEREIRA, M.E. Avaliação da toxicidade aguda do extrato hexânico de frutos de *Melia azedarach* (Meliaceae) em camundongos. **Ciência Animal Brasileira**, v. 13, n. 4, p. 512-519, 2012.

KARAM, M.C.; PETIT, J.; ZIMMER, D.; DJANTOU, E.B.; SCHER, J. Effects of drying and grinding in production of fruit and vegetable powders: A review. **Journal of Food Engineering**, v. 188, p. 32-49, 2016.

KOPARDE, A.A.; DOIJAD, R. C.; MAGDUM, C.S. Natural products in drug discovery. **Pharmacognosy-medicinal plants**. IntechOpen, 2019.

KUSWINARTI, K.; SAVIRA, K.; RUDIMAN, R. The analgesic effect of ethanol extract Soursop (*Annona muricata* L.) leaves in wistar rats. **Althea Medical Journal**, v. 5, n. 4, p. 196-200, 2018.

KUZNETSOVA, D.A.; VASILIEVA, E.A.; KUZNETSOV, D.M.; LENINA, O.S.; FILIPPOV, S.K.; PETROV, K.A.; ZAKHAROVA, L.Y.; SINAYSHIN, O.G. Enhancement

of the Transdermal Delivery of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs Using Liposomes Containing Cationic Surfactants. **ACS omega**, v. 7, n. 29, p. 25741-25750, 2022.

LIMA, Beatriz de Sousa. **Atividades antioxidante, anti-inflamatória e antibacteriana dos extratos hexânico e etanólico das folhas da gravioleira (*Annonamuricata* L.)**. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal do Ceará. Fortaleza. 2013.

LIN, YJ.; ANZAGHE, M.; SCHÜLKE, S. Update on the pathomechanism, diagnosis, and treatment options for rheumatoid arthritis. **Cells**, v. 9, n. 4, p. 880, 2020.

LOPES, Andreia Bairrão Lino Guiomar. **Imunoterapia e artrite reumatoide**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de Lisboa. Portugal. 2019.

LOPES, Carla Martins; LOBO, José Manuel Sousa; COSTA, Paulo. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, p. 143-154, 2005.

MAIONE, F.; MINOSI, P.; GIANNUARIO, A.D.; RAUCCI, F.; CHINI, M.G.; DE VITA, S.; BIFULCO, G.; MASCOLO, N.; PIERETTI, S. Long-lasting anti-inflammatory and antinociceptive effects of acute ammonium glycyrrhizinate administration: pharmacological, biochemical, and docking studies. **Molecules**, v. 24, n. 13, p. 2453, 2019.

MALEKI, S.J.; CRESPO, J.F.; CABANILLAS, B. Anti-inflammatory effects of flavonoids. **Food chemistry**, v. 299, p. 125124, 2019.

MANZIONE, M.G.; MARTORELL, M.; SHAROPOV, F.; BHAT, N.G.; KUMAR, N.V.A.; FOKOU, P.V.T.; PEZZANI, R. Phytochemical and pharmacological properties of asperuloside, a systematic review. **European Journal of Pharmacology**, v. 883, p. 173344, 2020.

MARIANO, G. H. et al. Characterization of novel human intragenic antimicrobial peptides, incorporation and release studies from ureasil-polyether hybrid matrix. **Materials Science and Engineering: C**, v. 119, p. 111581, 2021.

MEKAWY, M.M.; YAMAGUCHI, A.; EL-SAFETY, S.A.; ITHO, T.; TERAMAE, N. Mesoporous silica hybrid membranes for precise size-exclusive separation of silver nanoparticles. **Journal of colloid and interface science**, v. 355, n. 2, p. 348-358, 2011.

MENDES, J.F.; OSHIRO-JUNIOR, J.A.; DA SILVA, C.G.; CHIAVACCI, L.A. Synthesis of ureasil-polyether film forming materials by using environmentally friendly solvent. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 42, p. 1-10, 2021.

MENDES, Juliana Fernandes. **Formadores de filmes híbridos orgânicos inorgânicos do tipo ureasil-poliéter para liberação controlada de fármacos**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Araraquara. 2012.

MIGLIATO, K.F.; CORRÊA, M.A.; SALGADO, H.R.N. Planejamento experimental na otimização da extração dos frutos de *Syzygiumcumini* (L.) skeels. **Química Nova**, v. 34, p. 695-699, 2011.

MOBASHERI, Ali. Intersection of inflammation and herbal medicine in the treatment of osteoarthritis. **Current rheumatology reports**, v. 14, n. 6, p. 604-616, 2012.

MOGHADAMTOUSI, S.Z.; FADAEINASAB, M.; NIKZARD, S.; MOHAN, G.; ALI, H.M.; KADIR, H.A. *Annona muricata* (Annonaceae): a review of its traditional uses, isolated acetogenins and biological activities. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 7, p. 15625-15658, 2015.

MOGHADAMTOUSI, Soheil Zorofchian et al. *Annona muricata* leaves accelerate wound healing in rats via involvement of Hsp70 and antioxidant defence. **International Journal of Surgery**, v. 18, p. 110-117, 2015.

MOLINA, E.F.; PARREIRA, R.L.T.; DE FARIA, E.H.; DE CARVALHO, H.W.P.; CARAMORI, G.F.; COIMBRA, D.F.; NASSAR, E.J.; CIUFFI, K.J. Ureasil-poly (ethylene oxide) hybrid matrix for selective adsorption and separation of dyes from water. **Langmuir**, v. 30, n. 13, p. 3857-3868, 2014.

MOSIĆ, M.; DRAMIĆANIN, A. Extraction as a critical step in phytochemical analysis. **Journal of AOAC International**, v. 103, n. 2, p. 365-372, 2020.

MUELLER, AL.; PAYANDEH, Z.; MOHAMMADKHANI, N.; MUBARAK, S.M.H.; ZAKERI, A.; BAHRAMI, A.A.; BROCKMUELLER, A.; SHAKIBAEI, M. Recent advances in understanding the pathogenesis of rheumatoid arthritis: New treatment strategies. **Cells**, v. 10, n. 11, p. 3017, 2021.

MUTAKIN, M.; FAUZIATI, R.; FADHILAH, F.N.; ZUHROTUN, A.; AMALIA, R.; HADISAPUTRI, Y.E. Pharmacological Activities of Soursop (*Annona muricata* Lin.). **Molecules**, v. 27, n. 4, p. 1201, 2022.

NAGAYOSHI, B. A.; LOURENÇÃO, L.G.; KOBAYASE, Y.N.S.; PAULA, M.D.S.; MIYAZAKI, M.C.O.S. Artrite reumatoide: perfil de pacientes e sobrecarga de cuidadores. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, v. 21, p. 44-52, 2018.

NAIR, Anroop B.; JACOB, Shery. A simple practice guide for dose conversion between animals and human. **Journal of basic and clinical pharmacy**, v. 7, n. 2, p. 27, 2016.

NAYAK, A.; HEGDE, K. A Comprehensive Review on the Miracle Nature of *Annona muricata* Linn. **RGUHS Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 11, n. 1, 2021.

NG, Li Ching; GUPTA, M. Transdermal drug delivery systems in diabetes management: A review. **Asian journal of pharmaceutical sciences**, v. 15, n. 1, p. 13-25, 2020.

NOGUEIRA, Lucas Fabricio Bahia. **Síntese e caracterização de membranas biopoliméricas híbridas contendo apatitas e nanopartículas de prata**. 2019. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

NWAEHUIJOR, I.U.; OLATUNJI, G.A.; FABIYI, O.A.; AKANDE, S.A. Antioxidant and anti-inflammatory potential, and chemical composition of fractions of ethanol extract of *Annona muricata* leaf. **Ruhuna Journal of Science**, v. 11, n. 2, 2020.

- NWOKOCHA, C.R.; OWU, D.U.; GORDON, A.; THAXTER, K.; MCCALLA, G.; OZOLUNA, R. I.; YOUNG, L. Possible mechanisms of action of the hypotensive effect of *Annona muricata* (soursop) in normotensive Sprague–Dawley rats. **Pharmaceutical Biology**, v. 50, n. 11, p. 1436-1441, 2012.
- OJO, O.A.; GRANT, S.; AMANZE, J.C.; ONI, A.I.; OJO, A.B.; ELEBIYO, T.C.; OBAFEMI, T.O.; AYOKUNLE, D.I.; OGUNLAKIN, A.D. *Annona muricata* L. Peel extract inhibits carbohydrate metabolizing enzymes and reduces pancreatic β -cells, inflammation, and apoptosis via upregulation of PI3K/AKT genes. **Plosone**, v. 17, n. 10, p. e0276984, 2022.
- OKIN, D.; MEDZHITOV, R. Evolution of inflammatory diseases. **Current Biology**, v. 22, n. 17, p. R733-R740, 2012.
- OLA-DAVIES, O.E.; OYAGBEMI, A.A.; OMOBOWALE, T.O.; AKANDE, I.; ASHAFI, A. Ameliorative effects of *Annona muricata* Linn. (Annonaceae) against potassium dichromate-induced hypertension *in vivo*: involvement of Kim-1/p38 MAPK/Nrf2 signaling. **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology**, v. 30, n. 4, 2019.
- OLIVEIRA, Cecília Carvalho de. **Estudos toxicológicos pré-clínicos e antitumorais do extrato acetônico das folhas de *Annona muricata* L.** Tese (Doutorado em Farmacologia)– Universidade Federal do Ceará. Fortaleza. 2012.
- OLIVEIRA, Ricardo Bezerra de. **Atividade antiedematogênica, antnociceptiva e toxicidade do extrato aquoso de *Piper callosum* Ruiz & Pavon (Piperaceae).** Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) – Universidade Federal do Oeste do Pará. Santarém. 2015.
- OSHIRO JUNIOR, J. A.; ABUÇAFY, M.P.; MANAIA, E.B.; DA SILVA, B.L.; CHIARI-ANDRÉO, B.G.; CHIAVACCI, L.A. Drug delivery systems obtained from silica based organic-inorganic hybrids. **Polymers**, v. 8, n. 4, p. 91, 2016.
- OSHIRO JUNIOR, J.A.; CARVALHO, F.C.; SOARES, C.P.; CHORILLI, M.; CHIAVACCI, L.A. Development of cutaneous bioadhesive ureasil-polyether hybrid films. **International Journal of Polymer Science**, v. 2015, 2015.
- OSHIRO, J. A.; SCARDUELI, C.R.; DE OLIVEIRA, G.J.P.L.; MARCANTONIO, R.A.C.; CHIAVACCI, L.A. Development of ureasil–polyether membranes for guided bone regeneration. **Biomedical Physics & Engineering Express**, v. 3, n. 1, p. 015019, 2017.
- OSHIRO, J.A.; NASSER, N.J.; CHIARI-ANDRÉO, B.G.; CUBERES, M.T.; CHIAVACCI, L.A. Study of triamcinolone release and mucoadhesive properties of macroporous hybrid films for oral disease treatment. **Biomedical Physics & Engineering Express**, v. 4, n. 3, p. 035009, 2018.
- OYEKACHUKWU, A. R.; ELIJAH, J.P.; ESHU, O.V.; NWODO, O.F.C. Anti-inflammatory effects of the chloroform extract of *Annona muricata* leaves on phospholipase A2 and prostaglandin synthase activities. **Translational Biomedicine**, v. 8, n. 4, p. 0-0, 2017.

OYINLOYE, T.M.; YOON, W.B. Effect of freeze-drying on quality and grinding process of food produce: A review. **Processes**, v. 8, n. 3, p. 354, 2020.

PANDEY, A.; TRIPATHI, S. Concept of standardization, extraction and pre phytochemical screening strategies for herbal drug. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 2, n. 5, 2014.

PANDEY, S.; MISHRA, S.B. Sol-gel derived organic-inorganic hybrid materials: synthesis, characterizations and applications. **Journal of sol-gel science and technology**, v. 59, n. 1, p. 73-94, 2011.

PANYADEE, P.; BALSLEV, H.; WANGPAKAPATTANAWONG, P.; INTA, A. Medicinal plants in homegardens of four ethnic groups in Thailand. **Journal of ethnopharmacology**, v. 239, p. 111927, 2019.

PATEL, M.S.; PATEL, J.K. A review on a miracle fruits of *Annona muricata*. **Journal of Pharmacognosy and phytochemistry**, v. 5, n. 1, p. 137, 2016.

PEÑA-JUÁREZ, M.C.; GUADARRAMA-ESCOBAR, O.R.;ESCOBAR-CHÁVEZ, J.J. Transdermal delivery systems for biomolecules. **Journal of Pharmaceutical Innovation**, p. 1-14, 2021.

PEREIRA, H.N.; GUIMARÃES, G.P.; TROVÃO, D.M.M.; ALVES, H.S. Physicochemical characterization of the vegetal drug and nebulized extract of the roots from *Apodanthera congestiflora* Cogn. (Cucurbitaceae). **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 137, n. 2, p. 361-368, 2019.

PHATALE, V.; VAIPHEI, K.K.; JHA, S.; PATIL, D.; AGRAWAL, M.; ALEXANDER, A. Overcoming skin barrier through advanced transdermal drug delivery approaches. **Journal of Controlled Release**, v. 351, p. 361-380, 2022.

PRASAD, S.K.; VARSHA, V.; DEVANANDA, D. Anti-cancer properties of *Annona muricata* (L.): A Review. **Medicinal Plants**, v. 11, p. 123-134, 2019.

PRASESTI, G.K.; KURNIATI, N.F. Toxicity studies of *Centella asiatica* for drug development: Mini review. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, v. 12, p. 8081-8093, 2022.

QAZI, A.K.; SIDDIQUI, J.A.; JAHAN, R.; CHAUDHARY, S.; WALKER, L.A.; SAYED, Z.; JONES, D.T.; BATRA, S.K.; MACHA, M.A. Emerging therapeutic potential of graviola and its constituents in cancers. **Carcinogenesis**, v. 39, n. 4, p. 522-533, 2018.

QUAN, P.; JIAO, B.; SHANG, R.; LIU, C.; FANG, L. Alternative therapy of rheumatoid arthritis with a novel transdermal patch containing *Siegesbeckia* Herba extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 265, p. 113294, 2021.

QUILEZ, A. et al. Validation of ethnopharmacological use as anti-inflammatory of a decoction from *Annona muricata* leaves. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 12, p. 14-20, 2015.

R VASANTHI, H.; SHRISHRIMAL, N.; K DAS, D. Phytochemicals from plants to combat cardiovascular disease. **Current medicinal chemistry**, v. 19, n. 14, p. 2242-2251, 2012.

RADY, I.; BLOCH, M.B.; CHAMCHEU, R.C.N.; MBEUMI, S.B.; ANWAR, M.R.; MOHAMED, H.; BABATUNDE, A.S.; KUIATE, J.R.; NOUBISSI, F.K.; EL SAYED, K.A.; WHITFIELD, G.K.; CHAMCHEU, J.C. Anticancer properties of graviola (*Annona muricata*): a comprehensive mechanistic review. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2018, 2018.

RAMADON, D.; MCCRUDDEN, M.T.C.; COURTENAY, A.J.; DONNELLY, R.F. Enhancement strategies for transdermal drug delivery systems: Current trends and applications. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 12, n. 4, p. 758-791, 2022.

REKONDO, A.; FERNÁNDEZ-BERRIDI, M. J.; IRUSTA, L. Photooxidation and stabilization of silanised poly (ether-urethane) hybrid systems. **Polymer degradation and stability**, v. 92, n. 12, p. 2173-2180, 2007.

RICE, J.; WHITE, A.G.; SCARPATI, L.M.; WAN, G.; NELSON, W.W. Long-term systemic corticosteroid exposure: a systematic literature review. **Clinical therapeutics**, v. 39, n. 11, p. 2216-2229, 2017.

RODRIGUES, Fernanda et al. Obtenção de extratos de plantas do cerrado. **Enciclopédia biosfera**, v. 13, n. 23, 2016.

RODUAN, M.R.M.; HAMID, R.A.; CHEAH, Y.K.; MOHTARRUDIN, N. Cytotoxicity, antitumor-promoting and antioxidant activities of *Annona muricata* *in vitro*. **Journal of herbal medicine**, v. 15, p. 100219, 2019.

ROSA, B.L. **Uso de Aines associados à antileucotrienos em pacientes asmáticos: seus riscos e alternativas**. Trabalho de conclusão de curso (Especialização em Tecnologia Industrial Farmacêutica) – Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro. 2016.

ROSLIDA, A. H.; TAY, C. E. ; ZURAINI, A. ; CHAN, P. F. Anti-inflammatory and anti-nociceptive activities of the ethanolic extract of *Annona muricata* leaf. **Journal of Natural Remedies**, v. 10, n. 2, p. 97-104, 2010.

SABBAGH, F.; KIM, Beom Soo. Recent advances in polymeric transdermal drug delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 341, p. 132-146, 2022.

SANTOS, A. LE.; JÚNIOR, C.P.S.; NETO, R. N.M.; SANTOS, M.H.C.; SANTOS, V.F.; ROCHA, B.A.M.; SOUSA, E.M.; CARVALHO, E.C.; MENEZES, I.R.A.; OLIVEIRA, M.R.C.; DANTAS, L.B.R.; SILVA, T.M.; TEIXEIRA, C.S. *Machaerium acutifolium* lectin inhibits inflammatory responses through cytokine modulation. **Process Biochemistry**, v. 97, p. 149-157, 2020.

SANTOS, Simone Maria dos. **Estudo Etnofarmacológico de *Crotonadamantinus* MÜLL. ARG. (EUPHORBIACEAE)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Pernambuco. Recife. 2015.

SASIDHARAN, S.; CHEN, Y.; SARAVANAN, D.; SUNDRAM, K.M.; LATHA, L.Y. Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. **African journal of traditional, complementary and alternative medicines**, v. 8, n. 1, 2011.

SATO, T.S.; MEDEIROS, T.M.; HOSCHEID, J.; PROCHNAU, I.S. Proposta de formulação contendo extrato de folhas de *Eugenia involucrata* e análise da atividade antimicrobiana. **Revista Fitos**. 2018.

SCHERER, H.U.; HÄUPL, T.; BURMESTER, G.R. The etiology of rheumatoid arthritis. **Journal of autoimmunity**, v. 110, p. 102400, 2020.

SHUKRY, M.; EL-SHEHAWI, A.M.; EL-KHOLY, W.M.; ELSISY, R.A.; HAMODA, H.S.; TOHAMY, H.G.; ABUMANDOUR, M.M.; FARRAG, F.A. Ameliorative effect of graviola (*Annona muricata*) on mono sodium glutamate-induced hepatic injury in rats: Antioxidant, apoptotic, anti-inflammatory, lipogenesis markers, and histopathological studies. **Animals**, v. 10, n. 11, p. 1996, 2020.

SILVA, R.S.; DA SILVA, A.C.; LINHARES, J.F.P. Determinação dos teores de umidade e cinzas totais em erva-cidreira (*Lippia alba*) coletada na zona rural de São Luís–MA. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 9, p. 73800-73808, 2020.

SINGH, I.; MORRIS, A.P. Performance of transdermal therapeutic systems: Effects of biological factors. **International journal of pharmaceutical investigation**, v. 1, n. 1, p. 4, 2011.

SM, Abdul Wahab; HUSAIN, K.; JANTAN, I.; ARSHAD, L.; HAQUE, MA.; MOHD FAUZI, N.; NAFIAH, MA.S. Immunosuppressive Effects of *Annonamuricata* L. Leaf Extracton Cellular and Humoral Immune Responses in Male Wistar Rats. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, 2022.

SOKPE, A.; MENSAH, M.L.K.; KOFFUOR, G.A.; THOMFORD, K.P.; ARTHUR, R.; JIBIRA, Y.; BAAH, M.K.; ADEDI, B.; AGBEMENYAH, H.Y. Hypotensive and antihypertensive properties and safety for use of *Annona muricata* and *Persea americana* and their combination products. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2020, 2020.

SOUSA, Cássio Santos. **Materiais híbridos orgânico-inorgânicos siloxano-metacrilato como novos adsorventes para remoção do corante azul de metileno em meio aquoso**. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Sergipe. Sergipe. 2019.

SOUZA, L. K.; BRUNO, C.H.; LOPES, L.; PULCINELLI, S.H.; SANTILLI, C.V.; CHIAVACCI, L.A. Ureasil–polyether hybrid film-forming materials. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 101, p. 156-161, 2013.

SRIVASTANA, S.; SINGH, D.; PATEL, S.; PARIHAR, A. K. S.; SINGH, M. R. Novel carters and targeted approaches: way out for rheumatoid arthritis quandrum. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, Paris, v. 40, p. 125-135, 2017.

STONE, W.L.; BASIT, H.; BURNS, B. Patologia, Inflamação. **StatPearls** [Internet]. Publicação StatPearls, 2020.

SÜNTAR, Ipek. Importance of ethnopharmacological studies in drug discovery: role of medicinal plants. **Phytochemistry Reviews**, v. 19, n. 5, p. 1199-1209, 2020.

TISCHER, Bruna. **Avaliação do efeito de diferentes métodos de secagem, moagem e extração no óleo essencial de *Baccharis articulata* (Lam.) Pers.** Dissertação (Mestrado

em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria. 2014.

TRINDADE, M.A. L. **Nanotecnologia aplicada a sistemas transdérmicos**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) –Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias. Lisboa. 2017.

UĞURBAŞ, M.V.; OGURČÁKOVÁ, D.; HAUS, M.; BOROŇOVÁ, I.; ČUCHRÁČ, L.; VAŠKOVÁ, J. Effect of *Annonamuricata* aqueous leaf extract on reactive oxygen and nitrogen species. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 26, p. 6497-6504, 2022.

VAN DELFT, M. AM; HUIZINGA, T. WJ. An overview of autoantibodies in rheumatoid arthritis. **Journal of autoimmunity**, v. 110, p. 102392, 2020.

VANDEWALLE, J.; LUYPAERT, A.; BOSSCHER, K.; LIBERT, C. Therapeutic mechanisms of glucocorticoids. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 29, n. 1, p. 42-54, 2018.

VILLANOVA, J. CO; ORÉFICE, R.L.; CUNHA, A.S. Aplicações farmacêuticas de polímeros. **Pharmaceutical Applications of Polymers**, v. 20, p. 51-64, 2010.

WANG, T.; FU, X.; CHEN, Q.; PRATA, J.K.; WANG, D.; WANG, Z.; GAI, Z. Arachidonic acid metabolism and kidney inflammation. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 15, p. 3683, 2019.

YAJID, A.I.; RAHMAN, H.S.; KAI, M.W.P.; ZAIN, W.Z.W. Potential benefits of *Annona muricata* in combating cancer: A review. **The Malaysian journal of medical sciences: MJMS**, v. 25, n. 1, p. 5, 2018.

YANG, M.; FENG, X.; DING, J.; CHANG, F.; CHEN, X. Nanotherapeutics relieve rheumatoid arthritis. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 252, p. 108-124, 2017.

YAP, HY.; TEE, S. ZY.; WONG, M. MT.; CHOW, SK.; PEH, SC.; TEOW, SY. Pathogenic role of immune cells in rheumatoid arthritis: implications in clinical treatment and biomarker development. **Cells**, v. 7, n. 10, p. 161, 2018.

YERIMA, Abubakar; AKINTAYO, Richard; ADEBAJO, Adewale. Implications of a diagnosis of rheumatoid arthritis in resource-poor countries. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**, p. 101725, 2021.

YIN, Shi-Jun; ZHAO, Jing; YANG, Feng-Qing. Recent applications of magnetic solid phase extraction in sample preparation for phytochemical analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 192, p. 113675, 2021.

YTTERBERG, Steven R. et al. Cardiovascular and cancer risk with tofacitinib in rheumatoid arthritis. **New England Journal of Medicine**, v. 386, n. 4, p. 316-326, 2022.

YULIANTO, M.E.; PARAMITA, V.; AMALIA, R.; WAHYUNINGSIH, N.; NYAMIATI, R.D. Production of bioactive compounds from ginger (*Zingiber officinale*) dregs through subcritical water extraction. **Materials Today: Proceedings**, 2022.