



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
ESCOLA DE FARMÁCIA
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA**



ANA BEATRIZ FERREIRA ROMUALDO

**Desenvolvimento de um hidrogel nanoestruturado contendo extrato etanólico
bruto das folhas de *Protium spruceanum* e *Melaleuca leucadendra***

**OURO PRETO
2026**

ANA BEATRIZ FERREIRA ROMUALDO

**Desenvolvimento de um hidrogel nanoestruturado contendo extrato etanólico
bruto das folhas de *Protium spruceanum* e *Melaleuca leucadendra***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Farmácia da Universidade Federal de
Ouro Preto, como requisito para obtenção do título
de Bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Orlando David Henrique dos
Santos

Coorientadora: Dra. Viviane Flores Xavier

OURO PRETO
2026



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
REITORIA
ESCOLA DE FARMÁCIA
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA



FOLHA DE APROVAÇÃO

Ana Beatriz Ferreira Romualdo

**Desenvolvimento de um hidrogel nanoestruturado contendo extrato etanólico bruto das folhas de
Protium spruceanum e *Melaleuca leucadendra***

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia da Universidade Federal
de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de Farmacêutica

Aprovada em 17 de julho de 2026

Membros da banca

Prof. Dr. Orlando David Henrique dos Santos - Orientador - Universidade Federal de Ouro Preto
Dra. Viviane Flores Xavier - Coorientadora - Universidade Federal de Ouro Preto
Dra. Anieli dos Reis Teixeira - Universidade Federal de Ouro Preto
Ms. Lucas Resende Dutra Sousa - Universidade Federal de Ouro Preto

Prof. Dr. Orlando David Henrique dos Santos, orientador do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito na Biblioteca Digital de Trabalhos de Conclusão de Curso da UFOP em 29/07/2026



Documento assinado eletronicamente por **Orlando David Henrique dos Santos, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 29/07/2026, às 11:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1149173** e o código CRC **6560F98E**.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, por me permitir chegar até aqui e por ter me sustentado durante toda essa caminhada. Aos meus pais, por todo amor, cuidado e apoio ao longo dessa trajetória. Obrigada por todos os incentivos e por não medirem esforços para que eu alcançasse todos os meus objetivos. Nada disso seria possível sem a confiança que sempre colocaram em mim. Aos meus irmãos, agradeço por deixarem os dias de estudo mais leves e divertidos. À minha família pelas orações, carinho e apoio.

Ao Lucas, por caminhar ao meu lado durante essa trajetória e por sempre me incentivar a acreditar no meu potencial. Sua presença tornou tudo mais leve e especial. Aos amigos da Farmácia pelo companheirismo, risadas e todos os momentos que tornaram essa trajetória mais divertida, enriquecedora e inesquecível.

Ao meu orientador, Orlando, agradeço pela oportunidade de desenvolver esse trabalho, pela dedicação e incentivo. Seus ensinamentos foram cruciais para a minha formação acadêmica. À minha coorientadora, Viviane, por toda paciência e carinho ao longo dessa trajetória. Obrigada por esclarecer minhas dúvidas, compartilhar os seus conhecimentos e estar sempre disposta a ajudar, tornando cada desafio mais fácil.

A todos do laboratório de Fitotecnologia da Escola de Farmácia, agradeço pelos ensinamentos, convivência e colaboração durante o desenvolvimento deste trabalho. Aos órgãos de fomento CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo financiamento e incentivo a pesquisa, fundamentais para a realização deste estudo.

À República Atena, por ter sido meu lar durante todos esses anos. Obrigada por todo acolhimento e amizade. Levo comigo lembranças, aprendizados e laços que jamais serão esquecidos. Vocês foram essenciais para a conclusão desta etapa.

Por fim, agradeço a todos que fizeram parte desta trajetória. Cada contribuição, incentivo e aprendizado foram essenciais para que este momento se tornasse possível.

RESUMO

O estudo das plantas medicinais é cada vez mais importante devido às suas propriedades farmacológicas, demandando formulações que garantam maior segurança, estabilidade e biodisponibilidade. Entre elas, destacam-se a *Protium spruceanum* (breu), que possui efeitos anti-inflamatórios, analgésicos, cicatrizantes e expectorantes e a *Melaleuca leucadendra* (árvore de casca de papel), conhecida principalmente por suas atividades antioxidante, antimicrobiana e anti-inflamatória. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo desenvolver um hidrogel nanoestruturado contendo extrato etanólico bruto das folhas de *Protium spruceanum* e *Melaleuca leucadendra*. O hidrogel foi desenvolvido por meio da otimização com desenho experimental fatorial 3³, no qual avaliou-se a influência do Poloxamer 407, do extrato etanólico bruto de *Protium spruceanum* (EEBP) e do extrato etanólico bruto de *Melaleuca leucadendra* (EEBM) sobre o diâmetro hidrodinâmico médio de partícula (DHMP), índice de polidispersividade (IPD) e o potencial zeta, em três níveis de concentração. Os resultados foram analisados utilizando-se o software estatístico Minitab®. A formulação final obtida foi submetida ao teste de centrifugação, estabilidade preliminar e estabilidade de acompanhamento, avaliando-se sua estabilidade nas diferentes condições de armazenamento. Foram obtidas 27 formulações, com DHMP variando entre 38,71 e 695,1 nm, IPD entre 0,246 e 0,962 e potencial zeta de -10,9 a -24,0 mV. Após análise estatística, foi obtida a formulação otimizada composta por: 2% de EEBP, 1,3% de EEBM e 43% de Poloxamer 407. Esta formulação apresentou DHMP de 336,1 nm, IPD de 0,443, potencial zeta de -21,2 mV e permaneceu estável no teste de centrifugação, sem apresentar precipitação ou alterações visuais. Nos demais testes realizados a formulação desenvolvida apresentou estabilidade satisfatória. Além disso, foi realizado o ensaio de viabilidade celular, na qual foram utilizados fibroblastos murinos L929 através do método de Sulforodamina B. A formulação contendo extratos apresentou redução significativa da citotoxicidade quando comparada aos extratos na forma livre, indicando possível efeito protetor da formulação sobre as células. A formulação sem extrato não apresentou citotoxicidade, evidenciando a biocompatibilidade dos excipientes utilizados. Os resultados obtidos demonstram que o hidrogel desenvolvido possui potencial para a incorporação dos extratos. Em relação às principais atividades apresentadas por esses extratos: anti-inflamatória, antimicrobiana, antioxidante e cicatrizante, essa formulação poderá ser explorada futuramente para o desenvolvimento de novos produtos destinado ao tratamento de lesões cutâneas e processos inflamatórios após serem confirmados os estudos de eficácia.

Palavras-chave: hidrogel, otimização, *Protium spruceanum*, *Melaleuca leucadendra*, citotoxicidade.

ABSTRACT

The study of medicinal plants has become increasingly important due to their pharmacological properties, requiring formulations that ensure greater safety, stability, and bioavailability. Among these, *Protium spruceanum* (breu) stands out for its anti-inflammatory, analgesic, wound-healing, and expectorant effects, while *Melaleuca leucadendra* (paperbark tree) is mainly recognized for its antioxidant, antimicrobial, and anti-inflammatory activities. Therefore, the present study aimed to develop a nanostructured hydrogel containing crude ethanolic extracts from the leaves of *Protium spruceanum* and *Melaleuca leucadendra*. The hydrogel was developed through optimization using a 3³ factorial experimental design, in which the influence of Poloxamer 407, the crude ethanolic extract of *Protium spruceanum* (CEEPS), and the crude ethanolic extract of *Melaleuca leucadendra* (CEEML) on the mean hydrodynamic particle diameter (MHPD), polydispersity index (PDI), and zeta potential was evaluated at three concentration levels. The results were analyzed using Minitab® statistical software. The optimized formulation was subjected to centrifugation, preliminary stability, and accelerated stability tests to evaluate its stability under different storage conditions. A total of 27 formulations were obtained, with MHPD ranging from 38.71 to 695.1 nm, PDI from 0.246 to 0.962, and zeta potential from -10.9 to -24.0 mV. Statistical analysis identified the optimized formulation, composed of 2% CEEPS, 1.3% CEEML, and 43% Poloxamer 407. This formulation exhibited an MHPD of 336.1 nm, a PDI of 0.443, and a zeta potential of -21.2 mV. It remained stable during the centrifugation test, showing no precipitation or visible changes. Furthermore, the formulation demonstrated satisfactory stability throughout the remaining stability studies. Cell viability was also evaluated using murine L929 fibroblasts through the Sulforhodamine B (SRB) assay. The formulation containing the extracts showed a significant reduction in cytotoxicity compared with the free extracts, indicating a possible protective effect of the formulation on the cells. The formulation without extracts showed no cytotoxicity, demonstrating the biocompatibility of the excipients used. These findings indicate that the developed hydrogel has promising potential as a carrier system for the incorporation of these extracts. Considering the main biological activities of the extracts, including anti-inflammatory, antimicrobial, antioxidant, and wound-healing effects, this formulation may be further explored for the development of new products intended for the treatment of skin lesions and inflammatory processes, provided that its efficacy is confirmed through future studies.

Keywords: hydrogel, optimization, *Protium spruceanum*, *Melaleuca leucadendra*, cytotoxicity

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Exemplares de *M. leucadendra*, localizadas na Universidade Federal de Ouro Preto. 13
- Figura 2: Frutos, folhas e caule de *Protium*. 15
- Figura 3: Fórmula do poloxamer: x e y são os comprimentos das cadeias de Poli(óxido de etileno) (PEO) e Poli(óxido de propileno) (PPO). 16
- Figura 4: Otimização das concentrações de EEBP, EEBM e poloxamer no desenvolvimento da solução micelar. 31
- Figura 5: Formulação com extrato e branco antes do teste de centrifugação. 33
- Figura 6: Formulação com extrato e branco depois do teste de centrifugação. 33
- Figura 7: DHMP, IPD e potencial zeta no estudo de estabilidade preliminar. Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão. * Diferença significativa em relação ao 12º dia. Cinza: Formulação com extratos; Branco: Formulação sem extratos. 34
- Figura 8: DHMP, IPD e potencial zeta de amostras armazenadas em 40 ± 2 °C no estudo de estabilidade de acompanhamento. Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão. Cinza: Formulação com extratos; Branco: Formulação sem extratos. 35
- Figura 9: DHMP, IPD e potencial zeta de amostras armazenadas em 25 ± 5 no estudo de estabilidade de acompanhamento. Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão. Cinza: Formulação com extratos; Branco: Formulação sem extratos. 35
- Figura 10: DHMP, IPD e potencial zeta de amostras armazenadas em 5 ± 2 °C no estudo de estabilidade de acompanhamento. Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão. Cinza: Formulação com extratos; Branco: Formulação sem extratos. 36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Concentrações dos componentes da formulação utilizados no teste inicial.	20
Tabela 2: Matriz de ensaios.	21
Tabela 3: Composição das formulações.	21
Tabela 4: DHMP, IPD e potencial zeta das formulações iniciais.	26
Tabela 5: Caracterização das formulações por meio do desenho experimental fatorial no tempo de 24 horas.	27
Tabela 6: Caracterização da Formulação branco 19 no tempo de 24 horas.	32
Tabela 7: Valores de IC50 em porcentagem $\pm$ desvio padrão para fibroblasto murino L929.	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

DHMP – Diâmetro Hidrodinâmico Médio de Partícula

DMSO – Dimetilsulfóxido

EEBM – Extrato Etanólico Bruto de *Melaleuca leucadendra*

EEBP – Extrato Etanólico Bruto de *Protium spruceanum*

IC₅₀ – Concentração Inibitória Média

IPD – Índice de Polidispersividade

PBS – Phosphate Buffered Saline (Solução Tampão Fosfato Salina)

PEO – Poli(óxido de etileno)

PPO – Poli(óxido de propileno)

PVA – Poli(álcool vinílico)

PVP – Polivinilpirrolidona

rpm – Rotações por minuto

SRB – Sulforrodamina B

µg/L – Micrograma por litro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. JUSTIFICATIVA	11
3. REFERENCIAL TEÓRICO	12
3.1 Plantas medicinais	12
3.2 <i>Melaleuca leucadendra</i>	12
3.3 <i>Protium spruceanum</i>	14
3.4 Hidrogel	15
4. OBJETIVOS	18
4.1 Objetivo Geral:	18
4.2 Objetivos Específicos:	18
5. MATERIAIS E MÉTODOS	19
5.1 Desenvolvimento e otimização do hidrogel	19
5.1.1 Estudo preliminar de obtenção do hidrogel	19
5.1.2 Otimização do hidrogel por desenho experimental fatorial	20
5.2 Caracterização das formulações	22
5.3 Estudo de estabilidade preliminar da formulação desenvolvida	22
5.3.1 Teste de centrifugação	22
5.3.2 Estabilidade preliminar	23
5.3.3 Estabilidade de acompanhamento	23
5.4 Citotoxicidade em células L929	23
5.4.1 Cultivo celular e plaqueamento	23
5.4.2 Ensaio de Sulforodamina B	24
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
6.1 Desenvolvimento e otimização do hidrogel	25
6.1.1 Estudo preliminar e obtenção do hidrogel	25
6.1.2 Otimização do hidrogel por desenho experimental fatorial	27
6.2 Avaliação prévia da estabilidade da formulação desenvolvida	32
6.2.1 Teste de centrifugação	32
6.3 Estudo de estabilidade da formulação desenvolvida	33
6.3.1 Estabilidade preliminar	33
6.3.2 Estabilidade de acompanhamento	34
6.4 Citotoxicidade em células L929	37
7. CONCLUSÃO	40
8. REFERÊNCIAS	41

1. INTRODUÇÃO

Plantas medicinais são conhecidas como espécies vegetais cultivadas ou coletadas na natureza, utilizadas com o objetivo de amenizar ou tratar enfermidades (BRASIL, 2022). Elas são consideradas frescas, quando coletadas no momento em que serão empregadas, e secas, quando já passaram pelos processos de secagem e estabilização, contribuindo para o aumento da durabilidade do derivado vegetal. Dessa forma, desde os primórdios da humanidade, os produtos naturais se apresentam como uma das primeiras alternativas promissoras utilizadas pelo homem, com o intuito de solucionar as suas necessidades, auxiliando na melhora da qualidade de vida da população, tendo em vista o seu baixo custo e o fácil acesso. Nesse sentido, estudos que investigam a eficácia e segurança de produtos à base de fontes naturais possuem extrema importância, tendo em vista a capacidade de possuírem ampla alternativa terapêutica (BRANDELLI; MONTEIRO, 2017; SINGH, 2020).

Dentre as plantas medicinais com potencial terapêutico, pode-se destacar a *Melaleuca leucadendra* (*M. leucadendra*), pertencente à família Myrtaceae e originária da Oceania, é popularmente conhecida como “folha de papel branco” e “cajepute”. Ela possui extrema importância medicinal, podendo destacar seu amplo uso pelas populações aborígenes devido às suas extensas propriedades terapêuticas. Além disso, o óleo essencial é utilizado em vários produtos, dentre eles: cosméticos, materiais de limpeza e medicamentos (TJOKORDA et al., 2021).

Outra espécie crucial é o *Protium spruceanum* (*P. spruceanum*). Esta espécie pertence à família Burseraceae e é encontrada em biomas Amazônicos, Mata Atlântica e no Cerrado, sendo popularmente conhecida como “breu-branco, amescla, almecegueira ou resina mesca” (MENEZES FILHO et al., 2021). Devido, às suas propriedades anti-inflamatórias, antimicrobianas, antioxidantes e cicatrizantes, essa planta possui diversas utilidades na medicina tradicional (AMPARO et al., 2024).

Nesse sentido, devido a importância das plantas medicinais e a necessidade de produzir medicamentos que sejam mais eficientes e seguros, a nanotecnologia surge como uma alternativa promissora no mercado. Os sistemas nanoestruturados apresentam diversas vantagens como: aumentar a estabilidade dos ativos, eliminação

de odores desagradáveis, favorecimento da liberação controlada dos compostos, melhorando, assim, sua eficácia e prolongando seus efeitos (SILVA et al., 2020).

Ademais, pesquisas que envolvam a veiculação de extratos, em sistemas como hidrogéis, são fundamentais, pois podem proporcionar melhor liberação dos ativos, o que contribui para a redução dos efeitos adversos associados ao uso contínuo, tornando-se uma alternativa excelente para a entrega eficiente e segura de extratos vegetais tanto na área cosmética como na área farmacêutica (HAMIDI et al., 2008; SILVA et al., 2021).

2. JUSTIFICATIVA

As formulações nanoestruturadas se apresentam como alternativa de extrema importância na indústria farmacêutica e cosmética, tendo em vista que permitem a diminuição dos efeitos adversos e do número de aplicações, aumentando a estabilidade dos compostos e contribuindo, assim, para a melhor adesão ao tratamento.

Incorporar os extratos vegetais nestes sistemas torna-se essencial para fornecer benefícios significativos para a população, podendo aumentar o efeito terapêutico dos extratos, diminuir a toxicidade e melhorar a administração. Concomitante a isso, pesquisas que envolvam compostos de plantas medicinais se tornam extremamente relevantes, em especial a *M. leucadendra* e *P. spruceanum*. Ambas são espécies que possuem grande potencial farmacológico e apresentam necessidade de ampla pesquisa, pois possuem características medicamentosas essenciais, além da ausência de estudos relacionados às formulações contendo o extrato bruto das folhas de ambas espécies.

A associação dos extratos de *P. spruceanum* e *M. leucadendra* em uma única formulação foi proposta devido à complementaridade das propriedades farmacológicas de ambas. Embora apresentem atividades farmacológicas semelhantes descritas na literatura, possuem perfil fitoquímico distinto. Sendo assim, a combinação desses extratos pode ampliar o espectro de ação da formulação, favorecendo um efeito de sinergismo entre os metabólitos secundários, possibilitando o aumento no seu potencial terapêutico.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Plantas medicinais

Os compostos ativos das plantas são utilizados há séculos, através de conhecimentos empíricos e intuitivos, sendo de extrema importância para o desenvolvimento de novas formulações (VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005). Nos últimos levantamentos realizados, tem sido observado um aumento significativo na procura e no uso dos produtos naturais para tratar inúmeras enfermidades, não visando apenas o seu potencial curativo, mas também pelo fato de ser uma opção potencialmente mais barata e de fácil acesso, quando comparado com os medicamentos convencionais (BALKRISHNA et al., 2024).

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), as plantas medicinais são definidas como “aquelas que aliviam e curam doenças e têm longa tradição de uso como medicamentos em determinadas populações ou comunidades”. Elas também podem ser consideradas como drogas vegetais, tendo em vista que contêm substâncias ativas com propriedades medicamentosas que são essenciais na medicina fitoterápica no tratamento de diversas doenças (BRASIL, 2010). Desta forma, é evidente que estudos envolvendo fitoterápicos vem chamando a atenção, ganhando espaço e importância na produção de novos medicamentos (LEPSCH-CUNHA; FRICKMANN, 2023).

Nesse contexto, surge a necessidade de desenvolver estratégias capazes de contornar as limitações farmacotécnicas. Os extratos vegetais livres são conhecidos por apresentar baixa estabilidade química, podendo ser suscetíveis à degradação por fatores como a luz, temperatura e oxigênio, impactando na sua atividade biológica ao longo do tempo. Ademais, também podem apresentar baixa solubilidade em água, reduzindo, assim, a sua absorção. Nesse sentido, tais limitações vêm contribuindo para novos estudos e estratégias relacionados aos sistemas de liberação controlada, como os hidrogéis, com o intuito de melhorar a estabilidade, solubilidade e biodisponibilidade dos extratos vegetais (SOUZA; CASANOVA; COSTA, 2015).

3.2 *Melaleuca leucadendra*

A *M. leucadendra*, também conhecida como “folha de papel” ou “cajeput”, pertence à família Myrtaceae e possui amplo potencial terapêutico, sendo muito

utilizada na produção de óleos essenciais. Possui cerca de 3000 espécies, sendo encontradas em regiões tropicais e subtropicais quentes em todo o mundo (LEE et al., 2008).

Em relação a sua morfologia, a árvore dessa espécie apresenta altura de 15 a 40 metros, com tronco na coloração branco-acinzentado e textura esponjosa (**Figura 1**). As folhas, possuem tons verde escuro e as flores podem variar de branco a branco - cremoso, com frutos lenhosos, formato globoso e encapsulados (BLAKE, 1968).

Figura 1: Exemplares de *M. leucadendra*, localizadas na Universidade Federal de Ouro Preto.



Fonte: Elaborado pelo autor (2026)

Essa espécie apresenta amplo potencial terapêutico, contribuindo para que o seu perfil fitoquímico e as suas propriedades antimicrobianas despertem grande interesse científico, essenciais na medicina moderna (CARSON et al., 2006; IACOVELLI et al., 2023). Elas são utilizadas como componentes ativos para tratar infecções e outras condições de saúde em diversos países (BRUN et al., 2019). Além disso, seu material vegetal pode ser incorporado aos fitoterápicos, na qual sua importância e eficácia foram comprovados na literatura (PUJIARTI et al., 2011). Tal fato ocorre tendo em vista que as espécies desse gênero apresentam alta concentração de metabólitos secundários, em especial os terpenos e os compostos fenólicos, sendo esses responsáveis por diversas atividades farmacológicas descritas na literatura (SOUSA et al., 2024).

Entre os principais constituintes, destacam-se o terpinen-4-ol, 1,8-cineol, α -terpineol e γ -terpineno, que são os compostos que estão associados às atividades

antimicrobiana, anti-inflamatória, antioxidante e cicatrizante. Esses compostos explicam o destaque que vem ganhando esse material vegetal, favorecendo sua aplicação em sistemas como cremes, pomadas e formulações nanoestruturadas, com o intuito de melhorar a estabilidade, permeação cutânea e eficácia terapêutica dos ativos (SHAH et al., 2013; MONZOTE et al., 2020; SILVA et al., 2020).

Dessa forma, devido à presença desses metabólitos secundários, a *Melaleuca* pode ser utilizada no desenvolvimento de fitoterápicos, atuando como uma fonte natural capaz de promover efeitos terapêuticos. Após a planta passar pelo processo de extração, pode ser incorporada em diversos sistemas farmacêuticos, ampliando, assim, as suas possibilidades de utilização (SIMÕES et al., 2017).

Destaca-se também o óleo essencial, que é usado devido às suas propriedades bactericidas e antifúngicas contra vários patógenos. Em função dos maiores benefícios proporcionados em aplicações antibióticas e antifúngicas para seres humanos, a produção desse óleo é frequentemente realizada em processos de extração por hidrodestilação ou destilação de arraste a vapor, a fim de manter suas funções terapêuticas essenciais (GUSTAFSON et al., 1998; CARSON et al., 2006). No entanto, apesar de serem considerados naturais e apresentarem benefícios para a população, é importante ter cuidado ao utilizá-los, preferencialmente sob a supervisão de profissionais qualificados a fim de evitar efeitos colaterais e interações prejudiciais com outras drogas. Estudos demonstram que tais compostos podem causar irritação cutânea, reações alérgicas e até toxicidade sistêmica em casos de uso inadequado, reforçando, assim, a necessidade de um uso seguro e racional (CARSON et al., 2006; SANAJOU et al., 2024).

3.3 *Protium spruceanum*

P. spruceanum pertence à família Burseraceae que contém aproximadamente 16 gêneros e em torno de 800 espécies (RÜDIGER et al., 2007). Em relação aos constituintes químicos, têm destaque os taninos e flavonóides, possuindo contribuição para atividade cicatrizante e anti-inflamatória (RODRIGUES et al., 2013). Em relação a sua morfologia, trata-se de uma árvore semidecídua, com copa densa e arredondada, podendo atingir entre 8 e 14 metros de altura. O seu tronco é geralmente reto, tendo um diâmetro variando entre 25 e 40 cm (VIEIRA & CARVALHO, 2010). Já os frutos, são lisos, brilhantes e inicialmente de coloração

amarelada, tornando-se avermelhados quando maduros (**Figura 2**) (MENEZES FILHO, 2021).

Figura 2: Frutos, folhas e caule de *Protium*.



Fonte: Universidade de São Paulo (2026)

Ademais, essa espécie apresenta elevada relevância medicinal e econômica. Partes dessa planta são utilizadas na medicina popular pelas comunidades tradicionais, em especial devido a sua atividade anti-inflamatória (AMPARO et al., 2019). Outro ponto fundamental é em relação à atividade antimicrobiana atribuída aos extratos etanólicos brutos das folhas e galhos dessa espécie que apresentam amplo espectro de ação. Dessa forma, pesquisas demonstram atividade significativa contra 20 espécies de microrganismos, tendo como mais suscetíveis o *S. saprophyticus* e o *S. aureus* (AMPARO et al., 2017).

3.4 Hidrogel

Os hidrogéis são sistemas hidrofílicos constituídos por componentes interligados por ligações covalentes e/ou interações eletrostáticas, formando redes tridimensionais que são capazes de absorver grande quantidade de água ou fluidos biológicos sem se dissolverem. A resposta do hidrogel a mudanças externas, como variações de pH ou na concentração de analitos químicos, está relacionada à natureza de seus componentes. Já a sua capacidade absorptiva é atribuída à presença

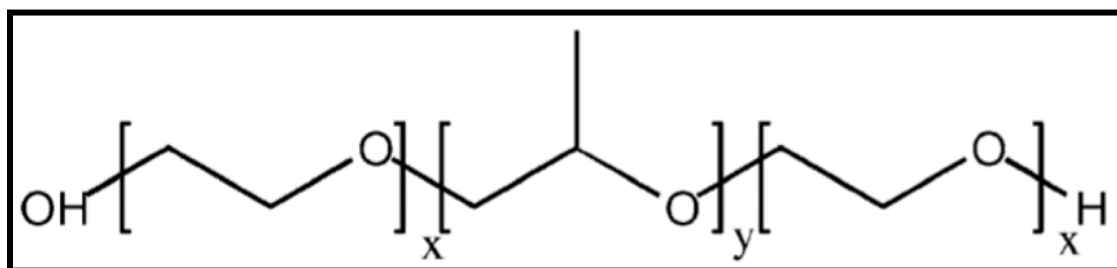
de grupos $-\text{OH}$, $-\text{CONH}-$, $-\text{CONH}_2-$, e $-\text{SO}_3\text{H}$ na estrutura dos polímeros que o formam (CAMPOS; GUILHERME, 2023).

Esse tipo de formulação pode ser muito utilizada com o objetivo de aumentar a eficácia e segurança dos medicamentos, tendo em vista que possui um sistema de entrega controlado dos fármacos. Também pode contribuir para menor número de aplicações do medicamento, uma vez que promove uma liberação localizada, sustentada e prolongada do fármaco através da pele (HAMIDI et al., 2008; LI; MOONEY, 2016).

Os hidrogéis podem ser obtidos a partir de polímeros naturais, como por exemplo as gelatinas, que são produzidas a partir de hidrolisados colágeno ou da fração polissacarídica de algas marinhas, ou de polímeros sintéticos, sendo eles, o poli(óxido de etileno) (PEO), o poli(álcool vinílico) (PVA) e a polivinilpirrolidona (PVP)¹⁴ (BUENO, 2010).

No presente estudo foi utilizado o Poloxamer 407 (P407), um copolímero tribloco não iônico sintético de óxido de polietileno. Cada molécula apresenta um bloco central hidrofóbico de Poli (óxido de propileno) (PPO) e dois blocos hidrofílicos de (PEO) (**Figura 3**). Tal estrutura faz com que o polímero seja altamente solúvel em água, biocompatível e com baixa toxicidade. Em soluções aquosas, ele apresenta comportamento termorresponsivo característico, na qual se mantém líquido em baixas temperaturas e forma um gel em temperaturas mais altas, tornando-se extremamente relevante e atrativo para sistemas de liberação controlada (CHEN et al; 2021).

Figura 3: Fórmula do poloxamer: x e y são os comprimentos das cadeias de Poli(óxido de etileno) (PEO) e Poli(óxido de propileno) (PPO).



Fonte: Chen et al (2021)

Em soluções aquosas, a baixas temperaturas, o P407 se organiza na forma de micelas esféricas, com o bloco central de PPO voltado para dentro, com as cadeias de PEO voltadas para fora. Com o aumento da temperatura e da concentração do polímero, as micelas vão se apresentando cada vez mais de uma forma organizada e próximas entre si, formando assim uma rede tridimensional que é responsável pela

transição sol-gel do sistema. Essa temperatura de transição do poloxamer 407 pode ocorrer, dependendo da concentração e presença de aditivos, próximo à temperatura fisiológica (cerca de 32–37 °C), tornando esse polímero extremamente relevante para aplicações farmacêuticas. Nesse sentido, a formulação pode ser aplicada na forma líquida, transformando-se em gel após entrar em contato com o organismo (CHEN et al., 2021).

A escolha do poloxamer 407 para o desenvolvimento deste hidrogel está relacionado com as propriedades farmacotécnicas desse polímero, bem como as características dos extratos vegetais utilizados. Os metabólitos secundários presentes podem apresentar instabilidade quando expostos à luz, temperatura e oxigênio, comprometendo as suas atividades farmacológicas. Dessa maneira, a incorporação desses compostos em uma matriz polimérica, pode protegê-los da degradação, diminuir o número de reaplicações e promover uma liberação gradual (CHEN et al., 2021).

Dessa maneira, esse estudo destaca-se devido ao seu caráter inovador, tendo em vista que faz a associação de duas espécies vegetais, *Melaleuca* e *Protium*, em uma única formulação farmacêutica associada ao desenvolvimento de um sistema nanoestruturado. Apesar do estudo de extratos vegetais ser amplo, na literatura, observa-se que existe uma lacuna em relação à combinação dessas espécies. Concomitantemente, não se tem relatos prévios envolvendo hidrogéis contendo extrato bruto combinado dessas espécies, reforçando, assim, o caráter inédito dessa proposta. Dessa forma, o trabalho apresenta-se como uma alternativa promissora, propondo uma estratégia que une fitoterapia e nanotecnologia, abrindo novas perspectivas para o desenvolvimento de formulações mais eficazes e seguras.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral:

Desenvolver um hidrogel nanoestruturado contendo extrato etanólico bruto das folhas de *P. spruceanum* e *M. leucadendra*.

4.2 Objetivos Específicos:

- Desenvolver e otimizar o hidrogel nanoestruturado;
- Caracterizar, por medida de tamanho de partículas, índice de polidispersão e potencial zeta, as formulações obtidas;
- Avaliar a estabilidade do hidrogel;
- Avaliar a citotoxicidade do hidrogel.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Desenvolvimento e otimização do hidrogel

Os extratos utilizados nesta pesquisa foram previamente obtidos conforme descrito por Cruz (2022) e Monteiro (2022). Para a extração, utilizou-se a técnica de percolação exaustiva. O solvente empregado foi o etanol a 70% (CRQ®) na preparação do extrato de *P. spruceanum* (EEBP), enquanto o etanol absoluto (Chemiflex®) foi utilizado para o extrato de *M. leucadendra* (EEBM).

As folhas de *P. spruceanum* (Benth.) Engler foram coletadas em 04 de agosto de 2020, no município de Lavras, MG, em área delimitada pelas coordenadas 21°17'33,6"S – 44°59'15,1"N e 21°18'11,9"S – 44°59'18,8". O material botânico foi identificado e registrado sob exsicata nº 16399 no Herbário HESAL da Universidade Federal de Lavras, com cadastro no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN): A2B5290.

Já as folhas de *M. leucadendra* foram obtidas em 08 de março de 2021, em Ouro Preto, MG, região compreendida entre as coordenadas -20°39'74,3"S – -43°50'73,7"N e -20°39'70,7"S – -43°50'82,8"N. O material foi depositado no Herbário Professor José Badini (DEBIO/ICEB/UFOP), sob o número de exsicata OUPR 29495, e o registro correspondente no SISGEN é A2CC35F.

5.1.1 Estudo preliminar de obtenção de hidrogel

Inicialmente, foi realizado o estudo preliminar com o objetivo de verificar se é possível obter uma solução micelar e posteriormente um hidrogel a partir da associação dos extratos. Para este estudo, foram testadas faixas de concentrações dos extratos e poloxamer utilizadas no estudo de Cruz (2022), o qual desenvolveu um hidrogel a partir do extrato de *P. spruceanum* e de Monteiro (2022), o qual desenvolveu um hidrogel a partir do extrato de *M. leucadendra*. A concentração de dimetilsulfóxido (DMSO) foi fixada em 2%. As concentrações testadas estão apresentadas na **Tabela 1**, abaixo.

Tabela 1: Concentrações dos componentes da formulação utilizados no teste inicial.

Identificação	EEBP (%)	EEBM (%)	Poloxamer (%)	DMSO (%)
01	3	1,5	41	2
02	3	1,5	42	2
03	1,5	0,8	41	2
04	1,5	0,8	38	2
05	1,5	0,8	36	2

Os extratos de *P. spruceanum* e *M. leucadendra* foram solubilizados em DMSO. Além disso, foi utilizado etanol absoluto em quantidade suficiente para complementar a solubilização. Em seguida, a quantidade previamente pesada de poloxamer 407 foi transferida para um balão, e posteriormente foi adicionado o extrato já solubilizado em DMSO e etanol, de acordo com a composição de cada formulação, descrita na **tabela 1**. Para remover pelo menos 75% do volume de etanol, utilizou-se o equipamento rotavapor à uma temperatura de 40 °C, visando reduzir o excesso de solvente orgânico que poderia ser capaz de interferir na formação do gel.

Ademais, foi adicionada à formulação água ultrapurificada em quantidade suficiente para completar o volume final previamente determinado. A agitação periódica foi realizada para evitar a formação de cristais e facilitar a dissolução completa do poloxamer. Posteriormente, o gel foi armazenado à 4°C por um período de 24 horas. A formulação com menor DHMP e IPD menor que 0,5 foi selecionada para a realização das etapas posteriores.

5.1.2 Otimização do hidrogel por desenho experimental fatorial

A otimização da formulação selecionada na etapa anterior foi realizada utilizando o software Minitab® 18 Statistical (Minitab Inc., State College, PA, USA) por meio do desenho experimental fatorial 3³. Este estudo avaliou a influência do Poloxamer 407, EEBP e do EEBM sobre DHMP, IPD e o potencial zeta, em três níveis de concentração descritos como mínimo (-), médio (0) e máximo (+), **Tabela 2**. Dessa forma, foram produzidas ao final 27 formulações com diferentes composições, **Tabela 3**. Os resultados obtidos foram submetidos ao software Minitab onde foi realizada a análise comparativa entre os parâmetros DHMP e IPD das 27 formulações e a formulação mais adequada foi apontada pelo software.

Tabela 2: Matriz de ensaios.

Nível de planejamento fatorial	EEBP (%)	EEBM (%)	Poloxamer (%)
1	2	1,3	43
0	1,5	0,8	38
-1	1	0,3	33

Tabela 3: Composição das formulações.

Formulação	EEBP(%)	EEBM(%)	Poloxamer (%)
1	1	0,8	33
2	1,5	0,8	38
3	1,5	0,8	33
4	1,5	1,3	38
5	1	0,3	38
6	1	0,8	43
7	1	0,3	43
8	2	0,3	38
9	1,5	0,8	43
10	2	0,3	33
11	2	0,8	38
12	1,5	0,3	38
13	1	1,3	33
14	1	0,3	33
15	1,5	1,3	43
16	1,5	1,3	33
17	1,5	0,3	33
18	2	0,8	43
19	2	1,3	43
20	1	1,3	38
21	1	1,3	43

22	1	0,3	43
23	1,5	0,3	43
24	2	0,8	33
25	2	1,3	33
26	2	1,3	38
27	2	0,8	38

5.2 Caracterização das formulações

A caracterização das formulações foi realizada utilizando-se o aparelho Zetasizer Nano (PN3702) - Malvern Panalytical, localizado no laboratório multiusuário do CIPHARMA. Por meio dessa técnica foram obtidas leituras como: DHMP, IPD e do potencial zeta. As leituras foram realizadas após diluição (1:1000) em água ultrapura e em triplicata, no período após 24 horas à realização da formulação. As análises foram conduzidas à temperatura de 25 °C, utilizando uma cubeta de quartzo, na qual as partículas são iluminadas com um laser dentro do equipamento, e então espalham a radiação, sendo que a intensidade da luz espalhada é influenciada pelo tamanho das partículas.

Essa caracterização é fundamental para garantir que as formulações possam atender as propriedades e os padrões de qualidade desejados, garantindo que o produto final seja estável.

5.3 Estudo de estabilidade preliminar da formulação desenvolvida

5.3.1 Teste de centrifugação

O teste de centrifugação foi realizado da forma estabelecida pela ANVISA, na qual foram utilizadas 1 mL da formulação com extrato e da formulação branco, composta pelos mesmos excipientes, porém sem a incorporação dos extratos. As formulações foram colocadas, em triplicata, em tubos de ensaio, e centrifugadas a 3000 rotações por minuto (rpm) por 30 minutos. Em seguida, as amostras foram avaliadas visualmente a fim de verificar aspectos que caracterizam instabilidade da

formulação como: presença de precipitado no fundo do tubo ou separação de fase das amostras (BRASIL, 2004).

5.3.2 Estabilidade preliminar

Neste estudo as formulações foram submetidas a condições de estresse, as quais consistiram em seis ciclos de 24 horas alternados de resfriamento ($5 \pm 2^\circ\text{C}$) e seis ciclos de 24 horas de aquecimento em ($40 \pm 2^\circ\text{C}$) em estufa, totalizando um período de 12 dias.

Nos dias 1, 7 e 12, as formulações foram caracterizadas conforme descrito no item 5.2.

5.3.3 Estabilidade de acompanhamento

As amostras foram armazenadas sob três condições distintas: temperatura ambiente ($25 \pm 5^\circ\text{C}$), geladeira ($5 \pm 2^\circ\text{C}$) e estufa ($40 \pm 2^\circ\text{C}$). Nos dias 1, 7, 15 e 30 dias foram caracterizadas conforme descrito no item 5.2.

5.4 Citotoxicidade em células L929

5.4.1 Cultivo celular e plaqueamento

A citotoxicidade foi avaliada utilizando cultura de fibroblastos murinos L929. As células foram mantidas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino e gentamicina ($60 \mu\text{g/L}$), ajustado para pH 7,22. As culturas permaneceram incubadas em estufa 37°C , sob atmosfera contendo 5% de CO_2 , por um período de 48 horas ou até atingirem aproximadamente 80% ou mais do crescimento celular, sendo o meio de cultura passando de róseo-alaranjado para amarelado.

Após o crescimento e expansão celular, preparou-se uma suspensão estoque na concentração de 5×10^5 células/mL em meio RPMI completo. Para isso, o meio foi descartado e as células foram retiradas do frasco de cultivo por raspagem com auxílio de um *cell scraper*. Ademais, foram adicionados aproximadamente 20 mL de meio RPMI completo para homogeneização da suspensão celular. O material foi centrifugado a 1300 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o pellet

ressuspenso em cerca de 20 mL de meio RPMI completo, com homogeneização em vórtex.

A contagem celular foi realizada após uma diluição de 20 vezes em azul de tripan. Dessa forma, uma alíquota de 10 μ L foi transferida para a câmara de Neubauer para a determinação da concentração celular. Em seguida, a suspensão foi ajustada com o intuito de obter 5×10^5 células em 1mL de meio RPMI. Foram distribuídos 100 μ L da suspensão em cada poço de placas estéreis de 96 poços, que permaneceram incubadas a 37 °C com 5% de CO₂ por 24 horas. Após esse tempo, o meio foi removido e os poços foram lavados com meio RPMI completo isento de fenol. Os ensaios de citotoxicidade foram realizados no Laboratório de Morfopatologia da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP).

5.4.2 Ensaio de Sulforodamina B

Após o cultivo e plaqueamento descritos anteriormente, foram adicionados 100 μ L de cada amostra, hidrogel com extrato e hidrogel sem extrato previamente solubilizadas em meio RPMI sem fenol, contendo 2,0% de DMSO, nas concentrações de 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56; 0,78; 0,39; 0,19; 0,098; 0,049 e 0,024%. As amostras foram testadas em quadruplicatas e as placas foram incubadas por 24, 48 e 72 horas.

Ao final de cada período experimental, o meio foi cuidadosamente removido e os poços foram lavados duas vezes com PBS (pH 7,2). Posteriormente, as células foram fixadas pela adição de 100 μ L de ácido tricloroacético a 20% previamente resfriado, permanecendo em média de 1 a 4 °C. Em seguida, foi utilizado água destilada para lavar as placas e foram deixadas para secagem em 25 ± 5 °C.

As células previamente fixadas foram coradas por 30 minutos com 40 μ L de Sulforodamina B (SRB) a 0,1%, preparada em ácido acético a 1%. Depois de passarem pela coloração, as placas foram lavadas com ácido acético a 1% com o intuito de remover o excesso de corante e novamente secas. Em seguida, adicionaram-se 200 μ L de tampão Tris 10 mM (pH 10,5) para a solubilização do corante ligado à proteína celular, mantendo-se as placas protegidas da luz. Decorridos 30 minutos à 25 ± 5 °C, a absorbância foi determinada a 490 nm em leitor de microplacas.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Desenvolvimento e otimização do hidrogel

6.1.1 Estudo preliminar de obtenção de hidrogel

Os extratos etanólicos utilizados foram solubilizados em DMSO, sendo este um solvente aprótico polar amplamente utilizado para dissolver compostos hidrofóbicos. O seu uso é justificado devido a sua alta capacidade de solubilização em diferentes sistemas, favorecendo, assim, a sua incorporação em sistemas aquosos, como os hidrogéis. Ele é amplamente utilizado em diversas formulações, visto que apresenta características essenciais como: alta penetração em membranas, analgesia local, vasodilatação, dissolução do colágeno, além de ação anti-inflamatória e anti-séptica (BRAYTON, 1986; BATISTUZZO et al., 2002).

Primeiramente, foi realizado o teste preliminar com o objetivo de avaliar a viabilidade da formação de hidrogel por meio da combinação dos extratos EEBP e EEBM. Em todas as concentrações analisadas, foi possível obter hidrogéis com aparência macroscópica satisfatória. As formulações se mostraram homogêneas, com coloração verde e sem sinais de instabilidade, como cremação, turvação ou precipitação.

Além dos aspectos macroscópicos, as formulações foram caracterizadas quanto ao DHMP e IPD. Nesse estudo, as formulações desenvolvidas com a associação dos extratos apresentaram partículas de tamanho nanométrico (**Tabela 4**). O tamanho das nanopartículas estão relacionados diretamente à sua estabilidade. Dessa forma, partículas muito pequenas tendem à aglomeração, enquanto as partículas muito grandes podem não ser tão eficientes para a aplicação desejada. Assim, ter um controle em relação ao tamanho garante uma distribuição uniforme, sendo fundamental para a estabilidade da formulação (NEMEN; LEMOS SENNA, 2011). Em geral, as formulações desenvolvidas e analisadas após 24 horas apresentaram resultados satisfatórios. A formulação 4 foi escolhida para prosseguirmos com os estudos, pois, a mesma apresentou o menor DHMP quando comparada às demais, IPD menor que 0,5 e potencial zeta maior que 20.

Tabela 4: DHMP, IPD e potencial zeta das formulações iniciais.

Identificação	DHMP (nm) $\pm$ DP	IPD $\pm$ DP	Potencial Zeta (mV)$\pm$ DP
01	141 $\pm$ 15,1	0,622 $\pm$ 12,6	-16,7 $\pm$ 13,4
02	456,4 $\pm$ 23,2	0,487 $\pm$ 19,2	-26,5 $\pm$ 9,1
03	257,3 $\pm$ 27,8	0,384 $\pm$ 18,2	-21,9 $\pm$ 4,11
04	114,8 $\pm$ 18,2	0,428 $\pm$ 41,3	-21,6 $\pm$ 7,44
05	272 $\pm$ 7,25	0,42 $\pm$ 19,8	-18,9 $\pm$ 29,3

Em relação aos procedimentos para obtenção da formulação, a etapa de remoção do etanol através do rotaevaporador foi crucial para evitar a interferência do solvente orgânico na organização micelar do poloxamer 407, contribuindo, assim, para uma formação adequada da rede polimérica, sendo esta responsável pelas propriedades de gelificação do sistema. Nesse sentido, estudos prévios demonstram que concentrações residuais de solventes podem levar a um comprometimento tanto da estabilidade, como também da segurança da formulação (SILVA et al., 2019).

Ademais, de acordo com a literatura, a organização micelar do poloxamer necessita fortemente da temperatura e da concentração, sendo essas variáveis essenciais para a obtenção de hidrogéis estáveis (ALMEIDA et al., 2020). Diante disso, pode-se observar que os resultados obtidos demonstram que a metodologia utilizada foi eficiente para incorporar os extratos vegetais em uma matriz nanoestruturada de poloxamer, tendo em vista que esse tipo de sistema é promissor para aplicações cosméticas e farmacêuticas.

6.1.2 Otimização do hidrogel por desenho experimental fatorial

Com o intuito de desenvolver um hidrogel contendo extrato de *P. spruceanum* e *M. leucadendra*, foram desenvolvidas 27 formulações, variando os seguintes parâmetros: concentração dos extratos e proporção do poloxamer. Os dados de caracterização em relação ao DHMP, IPD e potencial zeta encontram-se na **Tabela 5**.

Tabela 5: Caracterização das formulações por meio do desenho experimental fatorial no tempo de 24 horas.

Amostra	Tamanho de partícula (nm) (média±DP)	IPD	Potencial zeta (mV)
Formulação 1	89,14±8,902	0,447±0,164	-20,4±0,1
Formulação 2	91,68±44,63	0,258±0,076	-14,4±1,95
Formulação 3	106,7±32,29	0,362±0,202	-19,4±2,05
Formulação 4	107,6±19	0,455±0,066	-16,2±1,24

Formulação 5	434,3±309,4	0,563±0,206	-21,1±1,41
Formulação 6	308,9±78,86	0,426±0,07	-19,2±1,16
Formulação 7	108,7±42,16	0,481±0,217	-17,4±1,85
Formulação 8	108,5±27,8	0,568±0,192	-22,6±3,03
Formulação 9	106,2±32,26	0,399±0,049	-10,9±0,702
Formulação 10	122,2±114,4	0,331±0,151	-16,2±1,99
Formulação 11	203,4±82,5	0,568±0,214	-20,0±1,26
Formulação 12	71,11±17,14	0,962±0,066	-16,1±2,00
Formulação 13	120,2±31,15	0,356±0,09	-16,0±0,624
Formulação 14	125,0±120,4	0,495±0,229	-17,9±2,49
Formulação 15	84,91±21,98	0,418±0,179	-19,7±4,89
Formulação 16	287,6±132,6	0,418±0,054	-11,1±2,82
Formulação 17	137,9±1,909	0,246±0,026	-19,6±1,72
Formulação 18	292,9±65,16	0,388±0,068	-24,0±2,69
Formulação 19	336,1±23,8	0,443±0,034	-21,2±0,6
Formulação 20	627,0±61,67	0,610±0,05	-21,4±0,764
Formulação 21	191,0±489,3	0,843±0,143	-19,1±2,45
Formulação 22	695,1±258,8	0,732±0,257	-22,2±3,91
Formulação 23	310,8±184,9	0,42±0,089	-13,3±2,43
Formulação 24	414,4±208,3	0,696±0,064	-20,9±3,35
Formulação 25	112,9±52,3	0,476±0,08	-22,2±2,02

Formulação 26	38,71±0,187	0,589±0,034	-18,2±1,46
Formulação 27	98,15±22,88	0,351±0,086	-18,4±1,67

De acordo com a **Tabela 5**, as formulações apresentaram ampla variação no DHMP, com valores variando entre 38,71 nm (Formulação 26) e 695,1 nm (Formulação 22). Formulações com tamanhos inferiores a 200 nm são preferíveis para aplicações tópicas, tendo em vista que favorecem a absorção cutânea e proporcionam melhor estabilidade física do sistema (GUPTA et al., 2020; Garg et al., 2021). Já as partículas com o tamanho igual ou superior a 600 nm não conseguem levar o material encapsulado às camadas mais profundas da pele (DANAEI et al., 2018). Pode-se observar que nesse estudo a maior parte das formulações apresentam tamanho inferior a 200 nm. Esses resultados indicam que a aplicação tópica é promissora, tendo em vista que sistemas nanoestruturados dentro dessa faixa de tamanho ganham maior destaque, pois apresentam uma melhor espalhabilidade e maior liberação dos componentes ativos.

Comparando o estudo atual com o estudo de Sguizzato et al., (2020), pode-se observar semelhanças entre os resultados, na qual nanopartículas lipídicas sólidas contendo ácido cafeico foram incorporadas em hidrogel termossensível de poloxamer 407 para aplicação cutânea. As partículas obtidas apresentam um tamanho próximo de 200 nm, sendo este um valor adequado para sistemas nanoestruturados tópicos, contribuindo para uma maior estabilidade, melhor espalhabilidade e uma liberação controlada dos compostos ativos.

Em contrapartida, no presente trabalho, as formulações como Formulação 20 e Formulação 22, apresentaram um tamanho de partícula superior a 600 nm, mostrando, assim, uma diferença no comportamento relatado por Sguizzato et al. Tal aumento pode estar relacionado à uma agregação das nanoestruturas ou relacionado com as diferentes concentrações de extratos vegetais e de poloxamer presente nas formulações.

O IPD se baseia em um parâmetro que avalia a uniformidade do sistema, sendo considerado ideal aqueles mais próximos de 0, indicando uma distribuição monodispersa, enquanto valores mais próximos de 1 refletem instabilidade e tendência à agregação (DANAEI et al., 2018). Entre as 27 formulações, foi observado que algumas, como Formulação 12 (0,962), Formulação 8 (0,568), Formulação 11

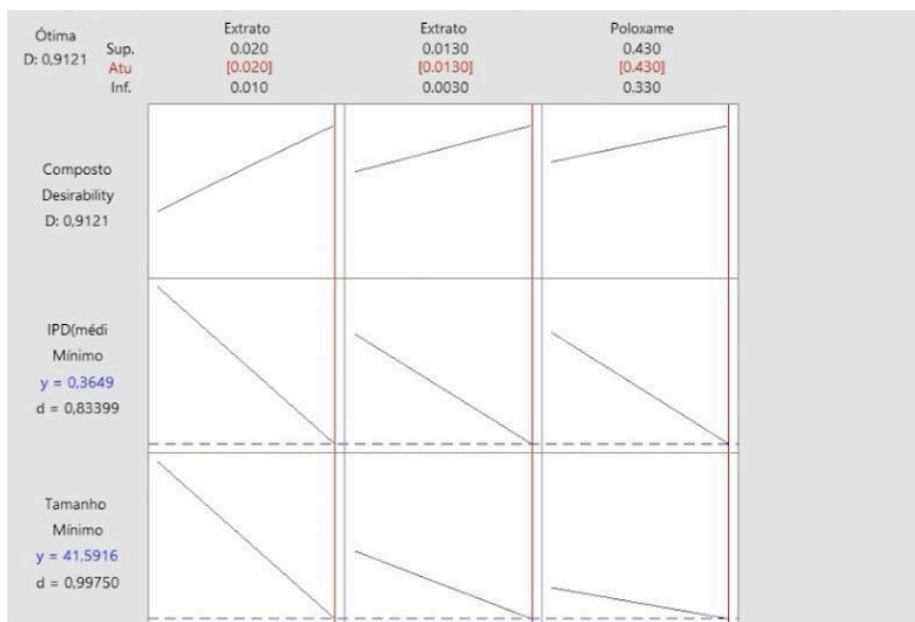
(0,568), Formulação 20 (0,610), Formulação 22 (0,732) e Formulação 24 (0,696), apresentaram valores elevados, o que indica heterogeneidade significativa e instabilidade. Esse comportamento pode estar relacionado diretamente com a estabilidade da formulação, tendo em vista que sistemas que apresentam maior índice de polidispersão tendem a sofrer agregação das partículas ao longo do tempo. A agregação ocorre principalmente devido às interações de van der Waals, provendo a atração entre partículas que são semelhantes. Quando o sistema não possui repulsão eletrostática suficiente para impedir essas aproximações, as partículas começam a formar aglomerados maiores. Partículas que apresentam tamanho muito diferente tendem a sofrer colisões intermoleculares e reduzir a uniformidade do sistema disperso, podendo contribuir para coalescência e presença de particulado durante o armazenamento (DANAEI et al., 2018).

O potencial zeta das formulações variou de -10,9 mV a -24,0 mV. Ele por sua vez, reflete a estabilidade eletrostática do sistema. Valores acima de ± 30 mV indicam sistemas altamente estáveis, enquanto valores entre ± 15 e ± 30 mV sugerem estabilidade moderada. Já valores abaixo de ± 15 mV indicam tendência à agregação e necessidade de otimização (DANAEI et al., 2018). Entretanto, além da estabilidade eletrostática, outro ponto de extrema importância é a estabilidade estérica. Nesse contexto, destaca-se o poloxamer com um papel crucial como um estabilizante estérico, tendo em vista à sua estrutura tribloco constituída por polioxietileno (PEO) e polioxipropileno (PPO). Dessa forma, mesmo formulações que possuem valores de potencial zeta inferiores a ± 30 mV podem apresentar estabilidade física adequada devido ao efeito estabilizante promovido pelo poloxamer (MCCLEMENTS, 2012; HONARY & ZAHIR, 2013; LY et al., 2024).

Com base na análise estatística utilizando o software Minitab foi possível identificar a melhor combinação das variáveis na concentração que produz uma resposta dentro da faixa desejada (menor DHMP e IPD). A formulação composta por 2% de EEBP, 1,3% de EEBM e 43% de poloxamer (Formulação 19) foi definida pelo software como a formulação que mais se ajusta dentro dos parâmetros previamente estabelecidos, sendo esta, a formulação final otimizada (**Figura 4**). Embora outras formulações, como 17 e 18, também tenham apresentado resultados adequados, como menor DHMP, menor IPD e um potencial zeta alto, não foram opções escolhidas pelo software. O planejamento experimental buscou pela combinação de fatores, que

tivesse o melhor desempenho, considerando simultaneamente todas as respostas de interesse.

Figura 4: Otimização das concentrações de EEBP, EEBM e poloxamer no desenvolvimento da solução micelar.



Parâmetros

Resposta	Meta	Inferior	Alvo	Superior	Peso	Importância
IPD(média) - 24horas	Mínimo		0,246	0,96	1	1
Tamanho de partícula (nm)	Mínimo		38,710	1191,00	1	1

Solução

Solução	Extrato Protium	Extrato Melaleuca	Poloxamer	IPD(média) - 24horas Ajuste	Tamanho de partícula (nm) Ajuste	Desirability Composta
1	0,02	0,013	0,43	0,364866	41,5916	0,912086

Predição de Múltiplas Respostas

Variável	Configuração
Extrato Protium	0,02
Extrato Melaleuca	0,013
Poloxamer	0,43

Resposta	Ajuste	EP do Ajustado	IC de 95%	IP de 95%
IPD(média) - 24horas	0,365	0,136	(0,081, 0,649)	(-0,104, 0,833)
Tamanho de partícula (nm)	42	172	(-319, 402)	(-554, 638)

Fonte: Elaborado pelo autor (2026)

Após a seleção da Formulação 19 como otimizada, foi desenvolvida a formulação branco utilizando as mesmas concentrações dos excipientes, porém sem a incorporação dos extratos. Essa formulação foi utilizada para controle nos ensaios posteriores, permitindo identificar alterações específicas decorrentes da presença dos extratos (**Tabela 6**).

Tabela 6: Caracterização da Formulação branco 19 no tempo de 24 horas.

Amostra	Tamanho de partícula (nm) (média±DP)	IPD	Potencial zeta (mV)
Formulação branco 19	241,4±17,33	0,443±0,119	-19,6±3,78

A caracterização físico-química da Formulação 19 branco foi realizada 24 horas após o preparo, avaliando os parâmetros do DHMP, IPD e potencial zeta. Tais parâmetros são cruciais para realizar a análise da estabilidade de sistemas nanoestruturados, bem como para a predição do comportamento do produto durante o armazenamento e aplicação. Dessa forma, a Formulação Branco 19, sem extratos, apresentou 241,4 nm. Já em relação ao IPD a formulação branco também apresenta valores moderados, indicando que a distribuição de tamanho não é totalmente uniforme, mas ainda se encontra dentro de um padrão aceitável. Em relação ao potencial zeta, a formulação branco também apresenta-se na faixa moderada de estabilidade, -19,6 mV. Essa caracterização é fundamental para garantir que as formulações possam atender as propriedades e os padrões de qualidade desejados, garantindo que o produto final seja estável.

6.2 Avaliação prévia da estabilidade da formulação desenvolvida

6.2.1 Teste de centrifugação

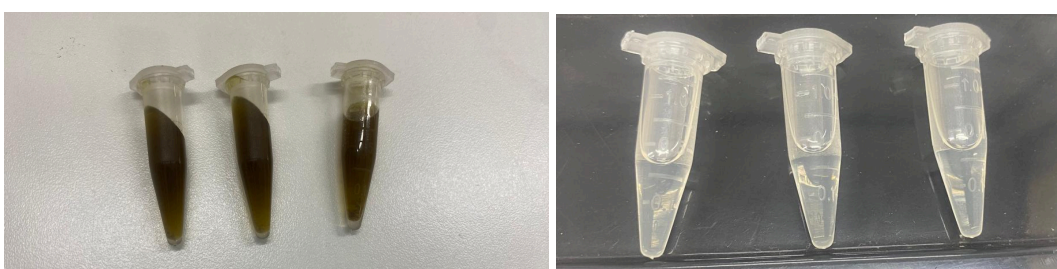
Após o teste de centrifugação, a formulação previamente desenvolvida e a formulação branco foram observadas e comparadas visualmente conforme as **Figuras 5 e 6**.

Figura 5: Formulação com extrato e branco antes do teste de centrifugação.



Fonte: Elaborado pelo autor (2026)

Figura 6: Formulação com extrato e branco depois do teste de centrifugação.



Fonte: Elaborado pelo autor (2026)

Verificou-se após o teste de centrifugação, que tanto a formulação com extrato, quanto a formulação branco permaneceram estáveis e íntegras, sendo estas estando de acordo com o guia de estabilidade da Anvisa. Tal teste apresenta como objetivo mimetizar, de forma acelerada, as condições de estresse que o produto pode sofrer durante o transporte e armazenamento, permitindo prever as possíveis instabilidades que podem ocorrer ao longo do tempo. Nesse sentido, a ausência de alterações visuais, pode indicar que o sistema apresenta boa compatibilidade entre os componentes. Sendo assim, o produto precisa permanecer estável, tendo em vista que, qualquer sinal de instabilidade é necessário a reformulação (ANVISA, 2004).

6.3 Estudo de estabilidade da formulação desenvolvida

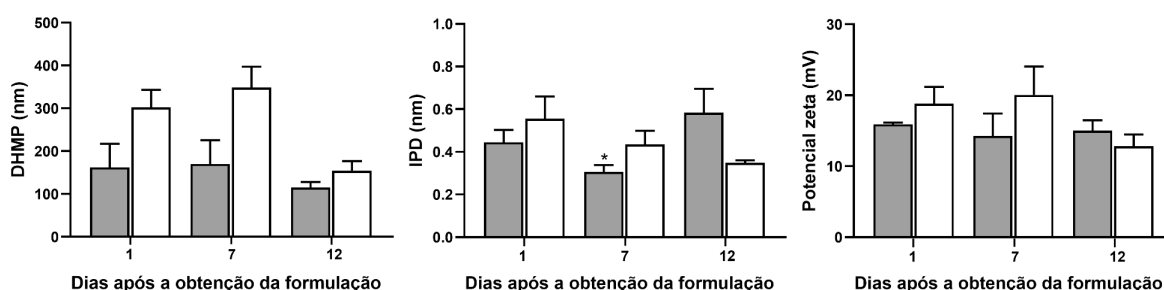
6.3.1 Estabilidade preliminar

O ensaio de estabilidade preliminar tem como finalidade acelerar o processo de degradação das substâncias presentes na formulação por meio da exposição a temperaturas extremas, permitindo avaliar os efeitos desses fatores de estresse sobre

a amostra. As análises das formulações foram conduzidas em ciclos alternados de 24 horas a 40 ± 2 °C e 24 horas a 5 ± 2 °C, ao longo de 12 dias, totalizando 6 ciclos.

Não foram observadas diferenças significativas entre os valores de DHMP e potencial zeta entre as amostras de formulação com extratos nos três tempos de análise (1°, 7° e 12° dia). Entretanto, o IPD no 7° dia de análise é significativamente menor quando comparado ao valor médio encontrado no 12° dia (**Figura 7**).

Figura 7: DHMP, IPD e potencial zeta no estudo de estabilidade preliminar. Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão. * Diferença significativa em relação ao 12° dia. Cinza: Formulação com extratos; Branco: Formulação sem extratos.

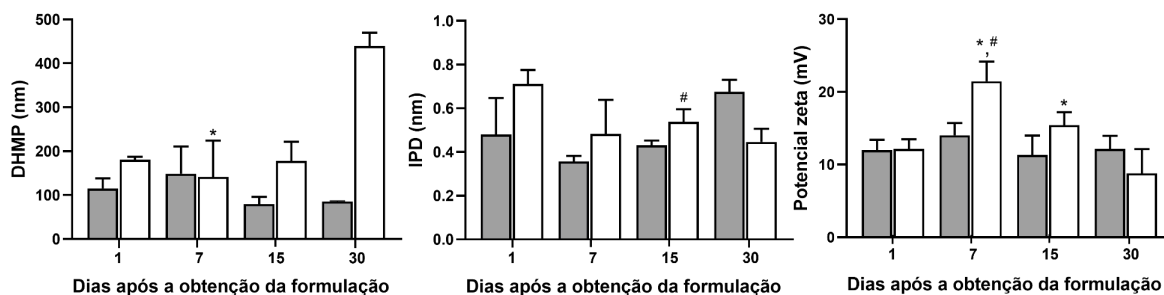


Fonte: Elaborado pelo autor (2026)

6.3.2 Estabilidade de acompanhamento

Durante 30 dias amostras das formulações foram armazenadas em diferentes temperaturas (25 ± 5 °C; 5 ± 2 °C e 40 ± 2 °C) e avaliadas quanto às características físico-químicas em tempos pré-determinados. Em relação às amostras de formulação com extratos armazenadas em 40 ± 2 °C não foram observadas diferenças significativas entre os valores de DHMP, IPD e potencial zeta das formulações nos tempos de análise (1°, 7°, 15° e 30° dia). Entretanto, a formulação sem extrato apresentou importantes diferenças nas mensurações realizadas. O DHMP no 7° dia de análise é significativamente menor quando comparado ao valor médio encontrado no 30° dia. O IPD no 15° dia de análise é significativamente menor quando comparado ao valor médio encontrado no 1° dia. Além disso, o potencial zeta no 7° dia de análise é significativamente maior quando comparado ao valor médio encontrado nos dias 1° e 30° de análise. Este mesmo parâmetro, no dia 15° é significativamente maior quando comparado ao valor médio encontrado no 30° dia (**Figura 8**).

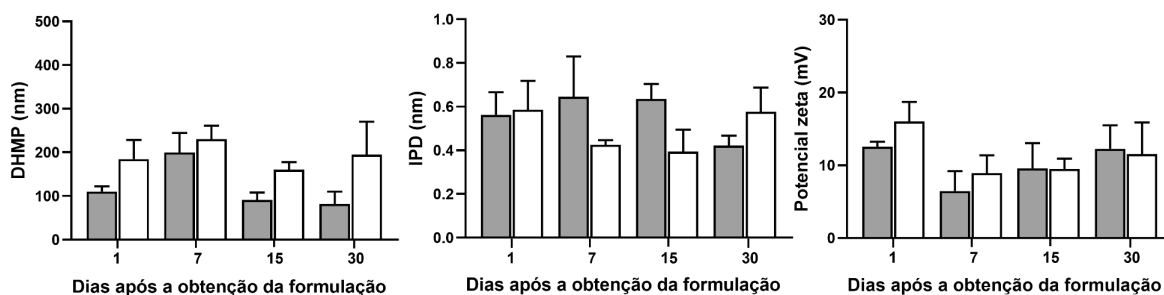
Figura 8: DHMP, IPD e potencial zeta de amostras armazenadas em $40 \pm 2^\circ\text{C}$ no estudo de estabilidade de acompanhamento. Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão.* Diferença significativa em relação ao 30º dia.# Diferença significativa em relação ao 1º dia. Cinza: Formulação com extratos; Branco: Formulação sem extratos.



Fonte: Elaborado pelo autor (2026)

Em relação às amostras armazenadas à $25 \pm 5^\circ\text{C}$ não foram observadas diferenças significativas entre os valores de DHMP, IPD e potencial zeta das formulações nos tempos de análise (1º, 7º, 15º e 30º dia) (**Figura 9**).

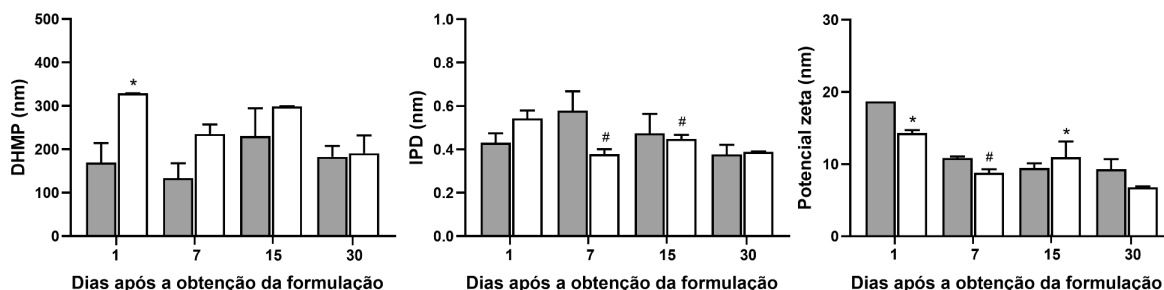
Figura 9: DHMP, IPD e potencial zeta de amostras armazenadas em $25 \pm 5^\circ\text{C}$ no estudo de estabilidade de acompanhamento. Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão. Cinza: Formulação com extratos; Branco: Formulação sem extratos.



Fonte: Elaborado pelo autor (2026)

Entretanto, as amostras armazenadas em $5 \pm 2^\circ\text{C}$ apresentaram importantes diferenças nos parâmetros avaliados. O DHMP no 1º dia de análise é significativamente maior quando comparado ao valor médio encontrado no 30º dia. O IPD nos 7º e 15º dias de análise é significativamente menor quando comparado ao valor médio encontrado no 1º dia. E o potencial zeta no 7º dia de análise é significativamente menor quando comparado ao valor médio encontrado no 1º dia e nos dias 1 e 15 é significativamente maior quando comparado ao valor médio encontrado no 30º dia (**Figura 10**).

Figura 10: DHMP, IPD e potencial zeta de amostras armazenadas em $5 \pm 2^\circ\text{C}$ no estudo de estabilidade de acompanhamento. Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão.* Diferença significativa em relação ao 30º dia.# Diferença significativa em relação ao 1º dia. Cinza: Formulação com extratos; Branco: Formulação sem extratos.



Fonte: De autoria própria

Embora tenham sido observadas diferenças significativas em alguns momentos durante o teste de estabilidade preliminar e de acompanhamento, esse comportamento já era esperado, tendo em vista que o hidrogel nanoestruturado apresenta um sistema dinâmico. Dessa forma as cadeias poliméricas do poloxamer encontram-se em constante reorganização, na qual ocorrem interações contínuas entre o polímero, a água e compostos que estão nos extratos, resultando em pequenas variações nas características das nanopartículas durante o armazenamento (CHEN et al., 2021; WHITE et al., 2023).

Ademais, tais diferenças significativas analisadas, não indicaram perda da integridade estrutural da formulação, tendo em vista que não foram observados sinais macroscópicos de instabilidade, como formação de precipitados ou alterações visuais que comprometessem a homogeneidade do sistema. Sendo assim, apesar das alterações observadas em alguns parâmetros de caracterização, a formulação manteve-se íntegra, indicando que foi capaz de suportar as condições de armazenamento avaliadas durante os testes de estabilidade (CHEN et al., 2021; WHITE et al., 2023).

O estudo de estabilidade tem como objetivo fornecer informações que possam indicar o grau de estabilidade relativa de um produto em várias condições que possam estar sujeitos, desde sua fabricação até o término de sua validade. Tal estabilidade é considerada relativa, tendo em vista que pode variar em função do tempo e de fatores que aceleram ou retardam as alterações nos parâmetros do produto. Sendo assim, modificações que estão dentro dos limites determinados podem não configurar motivo para reprovar o produto. Essa caracterização é fundamental para garantir que as formulações possam atender as propriedades e os

padrões de qualidade desejados, garantindo que o produto final seja estável (BRASIL, 2004).

Foram realizados dois estudos distintos com o objetivo de avaliar a estabilidade e segurança das formulações. O estudo de estabilidade preliminar tem como objetivo identificar de forma mais rápida e forçada as possíveis instabilidades físico-químicas e organolépticas. Dessa maneira, o produto é submetido a condições mais severas de armazenamento (MUNHOZ, A.J., et al., 2021). De acordo com o guia para a realização de estudos de estabilidade de produtos farmacêuticos, da Agência Nacional de Vigilância (2004), esse tipo de estudo fornece informações essenciais para dar prosseguimento ao desenvolvimento do produto. Já o estudo de acompanhamento possui como objetivo monitorar, ao longo do tempo, a manutenção das características de qualidade de produto nas condições recomendadas de armazenamento. Todavia, ambos são complementares e fundamentais para o controle de qualidade dos produtos farmacêuticos.

6.4 Citotoxicidade em células L929

O teste de citotoxicidade se baseia em um ensaio *in vitro* o qual é utilizado para avaliar o efeito que uma substância como por exemplo: formulação, extrato e composto químico, exerce sobre a viabilidade e a saúde das células após exposição à cultura celular. No desenvolvimento de novos fármacos a citotoxicidade é um parâmetro importante para a avaliação dos efeitos toxicológicos e biológicos de um determinado composto (THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2026). Este estudo consiste em colocar o material que será analisado em contato com a cultura de células e, em tempo apropriado, avaliar a ocorrência de alterações celulares induzidas pelo produto (MARTINEZ, 2011). Dessa forma, a avaliação da toxicidade possui extrema importância no desenvolvimento de novas formulações farmacêuticas, em especial quando se trata de produtos inéditos. Como a formulação desenvolvida não foi estudada e testada anteriormente, é crucial conhecer o seu perfil de toxicidade celular com o intuito de verificar possíveis danos às células. Assim, tal teste pode minimizar riscos e contribuir para possíveis ajustes nas composições das formulações, garantindo que o produto seja seguro para testes posteriores, como estudo em animais.

Os fibroblastos são células murinas aderentes e que possuem morfologia fusiforme, sendo amplamente empregados em ensaios de citotoxicidade *in vitro*, tendo em vista à sua facilidade de manipulação e também ao bom crescimento em meios de cultura padrão (ATCC, 2025). Eles se encontram como um dos maiores constituintes do tecido conjuntivo, sendo assim, avaliar os efeitos que a formulação pode causar, contribui para investigações de possíveis impactos em células semelhantes às encontradas no tecido cutâneo, garantindo que a formulação possa ser segura para a aplicação na pele (FARIAS, 2014).

Para a realização deste estudo, foram utilizados os fibroblastos como modelo celular, tendo em vista à sua relevância fisiológica no tecido cutâneo. Essas células são consideradas como uma dos principais componentes da derme e responsáveis pela integridade da pele (GAGOSIAN et al., 2025; RAHNAMA et al., 2024). O fato dessas células estarem diretamente relacionadas com o processo inflamatório e de cicatrização contribui para que elas sejam extremamente relevantes para o desenvolvimento de formulações com atividades anti-inflamatórias (PASCOAL et al., 2025). Concomitante a isso, existem também estudos atuais que dão um destaque para a sua aplicabilidade na análise de viabilidade celular, estresse oxidativo e resposta inflamatória em ensaios toxicológicos. Tais características reforçam sua adequação como modelo experimental para a investigação da segurança e biocompatibilidade de novas formulações farmacêuticas (FU et al., 2024).

Em todos os tempos de análise, o tratamento com a formulação contendo extratos promoveu aumento significativo da viabilidade celular quando comparado aos grupos experimentais tratados com as mesmas concentrações dos extratos na forma livre, indicando um possível efeito protetor e ou de melhoria na biodisponibilidade dos compostos ativos quando incorporados à formulação (**Tabela 7**).

Tabela 7: Valores de IC₅₀ em porcentagem $\pm$ desvio padrão para fibroblasto murino L929.

	IC ₅₀ (%)		
	24 horas	48 horas	72 horas
Formulação com extratos	33,3 $\pm$ 0,5	1,6 $\pm$ 0,2	33,5 $\pm$ 2,9
Formulação sem extratos	>100 $\pm$ 0,0	>100 $\pm$ 0,0	>100 $\pm$ 0,0
Extratos	9,4 $\pm$ 0,5	1,2 $\pm$ 0,3	1,4 $\pm$ 0,1

Adicionalmente, a formulação sem extrato não apresentou efeito citotóxico nos tempos avaliados, evidenciando a biocompatibilidade dos excipientes utilizados e demonstrando que os componentes da base não interferem negativamente na citotoxicidade celular. Esses achados reforçam que os efeitos observados estão diretamente relacionados à presença dos extratos na formulação, e não aos demais constituintes do sistema.

De maneira diferente dos extratos livres, que podem entrar em contato com a célula, os extratos incorporados em sistemas poliméricos tem uma melhor menor citotoxicidade, tendo em vista que favorecem uma liberação gradual dos compostos ativos. Esse fato ocorre porque a matriz polimérica atua como um reservatório, contribuindo para uma difusão lenta e controlada dos metabólitos para o meio celular, evitando, assim, altas concentrações dos compostos por meio de uma alta liberação. Dessa maneira, também pode ocorrer uma redução nos possíveis efeitos citotóxicos que estão relacionados às concentrações de metabólitos ativos. Ademais, a matriz da formulação, possui um papel fundamental atuando como uma barreira protetora, e diminuindo interações que possam ocorrer entre os constituintes dos extratos e a membrana celular. A literatura mostra que estudos utilizando derivados de PEG e hidrogéis à base de poloxamer mostram uma melhora promissora da viabilidade celular associada a encapsulação e a liberação controlada dos ativos (DOS SANTOS et al., 2015; INÁCIO et al., 2023; NICU et al., 2023).

7. CONCLUSÃO

O presente estudo possibilitou o desenvolvimento de um hidrogel nanoestruturado utilizando extrato etanólico bruto das folhas de *P. spruceanum* e *M. leucadendra*. A metodologia utilizada demonstrou ser eficiente para incorporação dos extratos na matriz polimérica de poloxamer, resultando em formulações estáveis e com características físico-químicas adequadas.

O estudo em questão reforça a importância da utilização de novas tecnologias, como a nanotecnologia, para o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada, que sejam capazes de potencializar a eficácia de extratos vegetais e reduzir efeitos adversos, contribuindo, assim, para o avanço na pesquisa de formulações inovadoras.

8. REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, H. et al. Poloxamer hydrogels for biomedical applications. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 199, p. 111575, 2020.
- AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION (ATCC). NCTC clone 929 [L cell, L-929, derivative of Strain L] (CCL-1). Manassas, VA: ATCC, 2025.
- AMPARO, T. R. et al. Antibacterial activity of extract and fractions from branches of *Protium spruceanum* and cytotoxicity on fibroblasts. *Natural Product Research*, v. 32, p. 34-43, 2017.
- AMPARO, T. R. et al. Anti-inflammatory activity of *Protium spruceanum* (Benth.) Engler is associated with immunomodulation and enzyme inhibition. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 241, p. 112024, 2019.
- AMPARO, T. R. et al. *Protium spruceanum* extract enhances mupirocin activity when combined with nanoemulsion-based hydrogel: a multi-target strategy for treating skin and soft tissue infections. *Pharmaceutics*, v. 16, n. 6, p. 700, 2024.
- ANTON, N.; BENOIT, J. P.; SAULNIER, P. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates – A review. *Journal of Controlled Release*, v. 128, p. 185-199, 2008.
- BALKRISHNA, A. et al. Exploring the safety, efficacy, and bioactivity of herbal medicines in contemporary healthcare. *Future Integrative Medicine*, v. 3, n. 1, 2024.
- BATISTUZZO, J.A.O.; Itaya.M. Eto.Y. Formulário Médico-Farmacêutico. Tecnopress: São Paulo, 2ª ed. 2002.
- BRANDELLI, C. L. C. Plantas medicinais: histórico e conceitos. In: MONTEIRO, S. C.; BRANDELLI, C. L. C. Farmacobotânica. Porto Alegre: Artmed, 2017. cap. 1, p. 1-13.
- BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Farmacopeia brasileira. 6. ed. Brasília: ANVISA, 2019.
- BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. *Guia de estabilidade de produtos cosméticos*. Brasília: ANVISA, 2004.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. *Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira*. Brasília, DF: ANVISA, 2010.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Plantas medicinais – fitoterapia. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2022.
- BRAYTON, C. F. Dimethyl sulfoxide (DMSO): a review. *The Cornell Veterinarian*, Ithaca, v. 76, n. 1, p. 61-90, 1986.
- BRUN, P.; BERNABÉ, G.; FILIPPINI, R.; PIOVAN, A. In vitro antimicrobial activities of commercially available tea tree (*Melaleuca alternifolia*) essential oils. *Vestnik Otorinolaringologij*, v. 84, n. 1, p. 108–116, 2019.

BUENO, V. A. B. Produção de hidrogéis micro e nanoestruturados. 2010. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

CAMPOS, J. A. de; GUILHERME, M. R. Desenvolvimento de hidrogéis baseados em polímeros naturais. In: *ENCONTRO ANUAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA (EAIC)*, 2023, Maringá. Anais... Maringá: UEM, 2023.

CARSON, C. F.; HAMMER, K. A.; RILEY, T. V. Melaleuca alternifolia (Tea Tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 19, p. 50-62, 2006.

CASTRO, R. M. L. Emulsão: uma revisão bibliográfica. Trabalho de Conclusão de Curso (Farmácia) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2015.

CHE MARZUKI, N. H.; WAHAB, R. A.; ABDUL HAMID, M. *An overview of nanoemulsion: concepts of development and cosmeceutical applications. Biotechnology & Biotechnological Equipment*, v. 33, n. 1, p. 779–797, 2019. .

CHEN, Y. et al. An overview on thermosensitive oral gel based on Poloxamer 407. *Materials*, v. 14, p. 4522, 2021.

COSTA GAGOSIAN, V. S. *et al.* In vitro skin models as non-animal methods for dermal drug development and safety assessment. *Pharmaceutics*, v. 17, p. 1342, 2025.

DANAEI, M. et al. Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. *Pharmaceutics*, v. 10, p. 57, 2018.

DOS SANTOS, A. C. et al. Poloxamer-based binary hydrogels for delivering tramadol hydrochloride: sol-gel transition studies, dissolution-release kinetics, in vitro toxicity, and pharmacological evaluation. *International Journal of Nanomedicine*, v. 10, p. 2391-2401, 2015.

FARIAS, M. P. Citotoxicidade de medicações intracanaís em fibroblastos L929. 2014. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade Federal de Sergipe, Aracaju, 2014.

FERNÁNDEZ, P. et al. Nanoemulsion formation by emulsion phase inversion. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 251, p. 53-58, 2004.

FU, M.; YANG, Y.; ZHANG, X.; LEI, B.; CHEN, T.; CHEN, Y. In Vitro Profiling of Toxicity Effects of Different Environmental Factors on Skin Cells. *Toxics* 2024, v.12, p. 108, 2024.

GONZÁLEZ, O. et al. Application of accelerated predictive stability studies in extemporaneously compounded formulations of chlorhexidine. *Molecules*, v. 28, n. 23, p. 7925, 2023.

GUPTA, P. K. et al. Nanoemulsion: a novel approach for enhancement of bioavailability of nutraceuticals. *International Journal of Pharma Sciences and Research*, v. 11, n. 1, p. 1-10, 2020.

GUSTAFSON, J. E. et al. Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology*, v. 26, p. 194-198, 1998.

HAMIDI, M.; AZADI, A.; RAFIEI, P. Hydrogel nanoparticles in drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 60, p. 1638-1649, 2008.

HONARY, S.; ZAHIR, F. Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems – A review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, v. 12, n. 2, p. 255-264, 2013.

IACOVELLI, F. et al. Deciphering the broad antimicrobial activity of *Melaleuca alternifolia* tea tree oil. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, p. 12432, 2023.

INÁCIO, C. R. et al. Controlled release and cell viability of ketoconazole incorporated in PEG 4000 derivatives. *Polymers*, v. 15, n. 11, p. 2513, 2023.

LEE, C.-J.; CHEN, L.-W.; CHEN, L.-G.; CHANG, T.-L.; HUANG, C.-W.; WANG, C.-C. Correlations of the components of tea tree oil with its antibacterial effects and skin irritation. *Journal of Food and Drug Analysis*, v. 16, n. 2, p. 169-176, 2008.

LEÃO, J.; KLAFKE, A. T.; SOARES, J. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade físico-química de formulações fitocosméticas contendo óleo essencial de melaleuca. *Revista Fitos*, v. 16, n. 4, p. 443-455, 2022.

LEPSCH-CUNHA, N.; FRICKMANN, F. S. S. Potenciais fitoterápicos nas perspectivas da regulamentação e da pesquisa e desenvolvimento no Brasil com enfoque em plantas medicinais amazônicas. *Revista Fitos*, Rio de Janeiro, supl. 1, 2023.

LI, J.; MOONEY, D. J. Designing hydrogels for controlled drug delivery. *Nature Reviews Materials*, v. 1, n. 12, p. 16071, 2016.

LIMA, T. A. A. C. et al. Aspectos morfológicos e químicos de *Protium spruceanum*. *Scientia Amazonia*, v. 3, n. 2, p. 6-10, 2014.

LY, P. D.; LY, K. N.; PHAN, H. L.; NGUYEN, H. H. T.; DUONG, V. A.; NGUYEN, H. V. Recent advances in surface decoration of nanoparticles in drug delivery. *Frontiers in Nanotechnology*, v. 6, p. 1456939, 2024.

MARTINEZ, C. R. Caracterização química e citotoxicidade da própolis de *Apis mellifera*. 2011. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2011.

MCCLEMENTS, D. J. Nanoemulsions versus microemulsions. *Soft Matter*, v. 8, p. 1719-1729, 2012.

MENEZES FILHO, A. C. P. et al. Avaliação fitoquímica, físico-química e atividades antioxidante e antibacteriana de *Protium spruceanum*. *Journal of Biotechnology and Biodiversity*, v. 9, p. 48-59, 2021.

MONZOTE, L. et al. Essential oil from *Melaleuca leucadendra*: antimicrobial and cytotoxic assessment. *Molecules*, v. 25, p. 5514, 2020.

MUNHOZ, A.J. et al. Desenvolvimento de uma formulação de água micelar com extrato de *Galdieria sulphuraria*. 2021. 94 f. Monografia (Graduação em Engenharia Química) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, 2021.

NEMEN, D.; LEMOS-SENNA, E. Preparation and characterization of resveratrol loaded lipid-based nanocarriers. *Química Nova*, v. 34, p. 408-413, 2011.

NICU, R. et al. 3D matrices for enhanced encapsulation and controlled release. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, p. 4213, 2023.

PASCOAL, C.; GRANJO, P.; MEXIA, P.; GALLEGOS, D.; LOURENÇO, R. A.; SHARMA, S.; PÉREZ, B.; CASTRO-CALDAS, M.; GROSSO, A. R.; FERREIRA, V. R.; VIDEIRA, P. A. *Unraveling the biological potential of skin fibroblast: responses to TNF- α , highlighting intracellular signaling pathways and secretome*. *Immunology Letters*, v. 276, p. 107057, 2025.

PORTO, A. S.; ALMEIDA, I. V.; VICENTINI, V. E. P. Nanoemulsões para uso tópico: síntese e toxicidade. *Revista Fitos*, v. 14, p. 513-527, 2020.

PUJIARTI, R; OHTANI, Y.; ICHIURA, H. Physicochemical properties and chemical compositions of *Melaleuca leucadendron* leaf oils taken from the plantations in Java, Indonesia. *The Japan Wood Research Society*, 57, 446-451, 2011.

RAHNAMA, M. et al. *A comprehensive evaluation of dermal fibroblast therapy...* *Stem Cell Research & Therapy*, 2024.

RODRIGUES, I. V. et al. Antiedematogenic and antinociceptive effects of leaves extracts from *Protium spruceanum* Benth. (Engler). *Pharmacognosy Journal*, v. 5, n. 1, p. 6-12, 2013.

RÜDIGER, A. L.; SIANI, A. C.; VEIGA JUNIOR, V. F. The chemistry and pharmacology of the South American genus *Protium* Burm. f. (Burseraceae). *Pharmacognosy Reviews*, v. 1, n. 1, p. 93-104, 2007.

SANAJOU, S. et al. Segurança e riscos do óleo da árvore do chá. *Revista de Farmácia de Istambul*, 2024.

SGUIZZATO, M. et al. Nanoparticulate gels for cutaneous administration. *Nanomaterials*, v. 10, p. 961, 2020.

SHAH, G. et al. Pharmacognostic standardization of leaves of *Melaleuca leucadendron*. *Pharmacognosy Journal*, v. 5, n. 4, p. 143-148, 2013.

SILVA, A. et al. Hydrogels for biomedical and cosmetic applications. Elsevier, 2021.

SILVA, C. M. et al. Influence of residual solvents on stability of pharmaceutical formulations. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 108, p. 1724-1732, 2019.

SILVA, L. S. B. et al. *Melaleuca leucadendron* flower extract exhibits antioxidant and photoprotective activities. *Free Radical Biology and Medicine*, 2020.

SIMÕES, C. M. O. et al. Farmacognosia: do produto natural ao medicamento. Porto

Alegre: Artmed, 2017.

SINGH, R. Medicinal plants: a review. *Journal of Plant Sciences*, 2020.

SOLANS, C. et al. Nanoemulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, v. 10, p. 102-110, 2005.

SOUZA, J. E. et al. Biodisponibilidade de compostos fenólicos. *Revista Fitos*, v. 9, n. 1, p. 55-72, 2015.

SOUZA, L. R. D. et al. Nanoemulsified essential oil of *Melaleuca leucadendron* leaves. *Pharmaceuticals*, v. 17, p. 721, 2024.

THERMO FISHER SCIENTIFIC. *Cytotoxicity Assays*. Waltham, MA, 2026.

TJOKORDA, I. et al. Enhancement of essential oil yield from *Melaleuca leucadendra*. *Journal of Bioresources and Bioproducts*, v. 6, p. 379-386, 2021.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO (USP). *Protium spruceanum*. Guia do Igapó s.d.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? *Química Nova*, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

VIEIRA, F. A.; CARVALHO, D. Reproductive biology of *Protium spruceanum*. *Revista Brasileira de Botânica*, v. 33, n. 4, p. 711-715, 2010.

WHITE, J. M. et al. Engineering the structure and rheological properties of P407 hydrogels via reverse poloxamer addition. *Langmuir*, v. 39, n. 14, p. 5084–5094, 2023.