



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
ESCOLA DE FARMÁCIA



**DESENVOLVIMENTO DE UMA FORMULAÇÃO MICELAR CONTENDO
EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DAS FOLHAS DE *Protium spruceanum* E
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA**

DÉBORA MARIANO MONTEIRO

OURO PRETO - MG

2022

DÉBORA MARIANO MONTEIRO

**DESENVOLVIMENTO DE UMA FORMULAÇÃO MICELAR CONTENDO
EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DAS FOLHAS DE *Protium spruceanum* E
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA**

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.º Dr. Gustavo Henrique
Bianco de Souza

Coorientadora: Ms. Viviane Flores Xavier

OURO PRETO - MG

2022

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

M775d Monteiro, Debora Mariano.

Desenvolvimento de uma formulação micelar contendo extrato etanólico bruto das folhas de *Protium spruceanum* e avaliação da atividade antimicrobiana. [manuscrito] / Debora Mariano Monteiro. - 2022.

53 f.: il.: color., tab..

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Henrique Bianco de Souza.

Coorientadora: Ma. Viviane Flores Xavier.

Monografia (Bacharelado). Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. Graduação em Farmácia .

1. Plantas medicinais. 2. *Protium spruceanum*. 3. Agentes anti-infecciosos. 4. Medicamentos- Estabilidade. I. Souza, Gustavo Henrique Bianco de. II. Xavier, Viviane Flores. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU 615.3

Bibliotecário(a) Responsável: Soraya Fernanda Ferreira e Souza - SIAPE: 1.763.787



FOLHA DE APROVAÇÃO

Débora Mariano Monteiro

Desenvolvimento de uma formulação micelar contendo extrato etanólico bruto das folhas de *Protium spruceanum* e avaliação da atividade antimicrobiana

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

Aprovada em 10 de junho de 2022.

Membros da banca

Pro. Dr. Gustavo Henrique Bianco de Souza - Orientador Escola de Farmácia - UFOP
Doutoranda Viviane Flores Xavier - Co-orientadora - Biotecnologia - UFOP
Prof. Dr. Luiz Fernando de Medeiros Teixeira - Escola de Farmácia - UFOP
Doutora Juliana Cristina dos Santos Almeida - Escola de Farmácia - UFOP

Prof. Dr. Gustavo Henrique Bianco de Souza, orientador do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito na Biblioteca Digital de Trabalhos de Conclusão de Curso da UFOP em 15/07/2022



Documento assinado eletronicamente por **Gustavo Henrique Bianco de Souza, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 15/06/2022, às 16:28, 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 **0346283** e o código CRC **B2A322EF**.

Todas as revoluções que eu desejo, começam em mim – Ryane Leão.

Dedico à minha família, amigos e ao meu orientador e coorientadora por toda colaboração, paciência e ajuda durante o desenvolvimento deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por toda ajuda, carinho e dedicação todos esses anos e por não medirem esforços para que eu alcançasse todos os meus objetivos e chegasse até aqui. Essa conquista é nossa. Aos meus irmãos por sempre estarem ao meu lado e me inspirarem a ser sempre melhor. À minha família por todo apoio e por viverem esse sonho comigo.

Ao meu orientador, Gustavo, por ter me dado a oportunidade de realizar este projeto, pelo apoio e conhecimento adquirido.

À Viviane por toda paciência, ensinamento e amizade que construímos durante esse período. Ao laboratório de Fitotecnologia pela oportunidade. Ao Prof. Orlando por toda ajuda concedida para que este trabalho se desenvolvesse. Ao Lucas Apoiinario Chinli, pela identificação e coleta das folhas da espécie *P. Spruceanum* (Benth.) Engler. À Isabelle e ao Prof. Luiz Fernando por contribuírem com o experimento e terem dedicado seu tempo. Ao laboratório de Microbiologia, por conceder seu espaço para realizar os testes de atividade antimicrobiana. À Escola de Nutrição, por disponibilizar a estrutura necessária para os testes de caracterização do pó. À Juliana pela companhia, amizade e por ter participado dessa caminhada.

Ao João Paulo, por me incentivar, apoiar e viver todos esses momentos ao meu lado. Sem dúvidas chegar até aqui foi mais fácil com você por perto.

Aos amigos da Escola de Farmácia, pelas conversas, histórias e por tornarem esses anos mais leves, em especial às amigas do 17.1.

À República Cafófo, por ser meu segundo lar, pelo apoio e ajuda em todos os momentos. Vocês foram essenciais para a conclusão desta etapa.

A todos que dê certa forma contribuíram para conclusão deste trabalho e para que eu chegasse até aqui, muito obrigada!

RESUMO

Atualmente, as plantas medicinais constituem uma importante fonte de inovação em saúde, pelo grande potencial que apresentam no desenvolvimento de novos fitoterápicos e protótipos para diversos fármacos mais específicos e eficientes, devido à sua diversidade estrutural e química. Dentre as plantas medicinais com importantes atividades biológicas, a *Protium spruceanum* apresenta grande destaque, por conta de suas atividades anti-inflamatória, analgésica, cicatrizante, antioxidante, antimicrobiana, dentre outras. Na medicina popular é utilizada para o tratamento de sintomas da gripe e como expectorante. O desenvolvimento de formulações que permitam veicular o extrato da planta medicinal, para aumentar a eficácia e segurança dos produtos naturais, é um grande desafio. O hidrogel, é um exemplo de formulação que facilita a liberação localizada, sustentada e prolongada do medicamento, diminuindo assim o número de aplicações e efeitos colaterais. Além de ser um fármaco inovador na classe dos antimicrobianos, tornando seu desenvolvimento muito importante para diminuir os casos de resistência bacteriana por medicamentos prescritos usualmente. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi desenvolver uma formulação micelar contendo extrato etanólico bruto das folhas de *Protium spruceanum* e avaliar sua atividade antimicrobiana. Inicialmente foi realizada a coleta e seleção do material vegetal, o qual foi seco à temperatura ambiente, pulverizado e caracterizado quanto ao teor de umidade, perda por dessecação, teor de cinzas e granulometria. A extração foi realizada por percolação utilizando etanol P.A. como solvente extrator. O desenvolvimento da formulação, foi iniciado com o teste preliminar para obtenção da solução micelar, em seguida foi realizada a otimização dessa solução por desenho experimental fatorial e por último, foi selecionada a formulação final que consiste em um hidrogel. Após a obtenção da formulação final, foram realizados testes de estabilidade e a triagem de atividade antimicrobiana por microdiluição em caldo. O material apresentou teor de umidade igual a 6,8%, perda por dessecação de 7,9% e 9,95% de cinzas totais. No teste de análise granulométrica o material teve uma maior percentagem de retenção na malha de 0,590 mm, correspondendo a 50,96 %. Obteve-se o extrato etanólico bruto com rendimento de 26,32 %. A formulação desenvolvida apresentou características aceitáveis de tamanho de partícula, em escala nanométrica (155-43 nm), índice de polidispersão abaixo de 0.52, pH levemente ácido e potencial zeta de -13,1 a -21,7 mV. Apesar da formulação não ter apresentado atividade bactericida em nenhuma das concentrações testadas, a concentração 3,90 µL/mL apresentou atividade bacteriostática. Contudo, foi possível desenvolver uma formulação micelar, com características desejáveis, a partir do extrato etanólico bruto de *Protium spruceanum*.

Palavras chave: *Protium spruceanum*, extrato, formulação, caracterização, estabilidade, atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

Currently, medicinal plants are an important source of innovation in health, the great potential they have in the development of new herbal medicines and prototypes for several more specific efficient drugs, due to their structural and chemical diversity. Among the medicinal plants with important biological activities, *Protium spruceanum* is of great importance, because of its anti-inflammatory, analgesic, healing, antioxidant, antimicrobial activities, among others. In folk medicine it is used for the treatment of flu symptoms and as expectorant. Developing formulations that allow the medicinal plant extract to be used to increase the efficacy and safety of natural products, it's a big challenge. Hydrogel, is an example of formulation that facilitates localized, sustained and prolonged release of the drug, thus decreasing the number of applications and side effects. In addition to being an innovative drug in the antimicrobial its development is very important to decrease of bacterial resistance by prescription drugs usually. Thus, the object of this study was to develop a micellar formulation containing crude ethanol extract from *Protium spruceanum* leaves and evaluate its antimicrobial activity. Initially, the collection and selection of plant material was performed, which was dried at room temperature, sprayed and characterized for moisture content, loss by desiccation, ash content and granulometry. The extraction was performed by percolation using P.A. ethanol as extractor solvent. The development of the formulation was initiated with preliminary test to obtain the micellar solution, then the optimization of this solution was performed by factorial experimental design and finally, the final formulation consisting of a hydrogel was selected. After the final formulation, stability test and screening of antimicrobial activity by microdilution in broth were performed. The material presented moisture content equal to 6,8%, loss by desiccation of 7,9% and 9,95% of total ash. In the granulometric analysis test, the material had a higher retention percentage in the mesh of 0,590 nm, corresponding to 50,96%. The crude ethanol extract with yield of 26,32% was obtained. The developed formulation showed acceptable characteristics of particle size, on a nanometric scale (155-43nm), polydispersion index below 0,52, slightly acidic pH and zeta potential of -13,1 to -21,7 mV. Although the formulation did not present bactericidal activity in any of the concentrations tested, concentration of 3,90 µL/mL showed bacteriostatic activity. However, it was possible to develop a micellar formulation, with desirable characteristics, from the crude ethanol extract of *Protium spruceanum*.

Key words: *Protium spruceanum*, extract, formulation, characterization, stability, antimicrobial activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Frutos, caule e folhas de <i>Protium spruceanum</i>	14
Figura 2 - Aplicações da nanotecnologia em diferentes áreas do conhecimento.	16
Figura 3 - Representação de um sistema micelar em meio polar	17
Figura 4 - Representação esquemática de um sistema micelar em meio apolar.....	17
Figura 5 - Representação esquemática de um tensoativo	18
Figura 6 – Formulação antes do teste de centrifugação.....	40
Figura 7 – Formulação depois do teste de centrifugação.	40
Figura 8 - pH (A), temperatura de gelificação (B), tamanho de partícula (C), IPD (D) e potencial zeta (E) da formulação no estudo de estabilidade preliminar.....	42
Figura 9 - Estrutura química do Poloxamer 407	43
Figura 10 - Representação do crescimento bacteriano dos poços da microplaca na placa de Petri.	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentrações de extrato etanólico bruto da planta <i>Protium spruceanum</i> e tensoativo utilizados no teste inicial.	24
Tabela 2 - Matriz de ensaios.....	25
Tabela 3 - Valores obtidos referente a perda de massa de material vegetal no teste de teor de umidade.	29
Tabela 4 - Valores obtidos referente a perda de massa de material vegetal no teste de perda por dessecação.	30
Tabela 5 - Valores de massa depositada em cada malha do tamis.	31
Tabela 6 - Valores obtidos referente a perda de massa de material vegetal no teste de análise de cinzas.	32
Tabela 7 - Concentrações de extrato etanólico bruto da planta <i>P. spruceanum</i> e tensoativo utilizados no teste inicial.	33
Tabela 8 - Tamanho de partículas e IPD obtidos com o planejamento fatorial 3 ³ em formulações contendo 1%.	35
Tabela 9 - Tamanho de partículas e IPD obtidos com o planejamento fatorial 3 ³ em formulações contendo 1,25%.	36
Tabela 10 - Tamanho de partículas e IPD obtidos com o planejamento fatorial 3 ³ em formulações contendo 1,5%.	36
Tabela 11 - Parâmetros avaliados no desenvolvimento do hidrogel.	38
Tabela 12 – Parâmetros avaliados no teste de estabilidade preliminar do hidrogel.	41
Tabela 13 - Organização das diluições do extrato, formulação e controles na microplaca.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS

CBM – Concentração bactericida mínima

CIM – Concentração inibitória mínima

CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CMC – Concentração micelar crítica

DMSO – Dimetilsulfóxido

IPD – Índice de polidispersão de partículas

mm – Milímetros

N - Normal

nm – Nanômetros

rpm – Rotações por minuto

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 JUSTIFICATIVA	12
1.2 REFERENCIAL TEÓRICO	12
1.2.1 Produtos naturais	12
1.2.2 <i>Protium spruceanum</i> (Burseraceae)	14
1.2.3 Formulações nanoestruturadas	15
1.2.4 Formulações micelares	17
1.2.4.1 Hidrogel	19
2 OBJETIVOS	20
2.1 OBJETIVO GERAL	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3 MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1 COLETA DE <i>P. spruceanum</i>	21
3.2 SECAGEM DAS FOLHAS	21
3.3 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO MATERIAL PULVERIZADO	21
3.3.1 Teor de umidade	21
3.3.2 Perda por dessecação	22
3.3.3 Análise Granulométrica	22
3.3.4 Análise de Cinzas	22
3.4 OBTENÇÃO DO EXTRATO	23
3.5 DESENVOLVIMENTO DA FORMULAÇÃO CONTENDO EXTRATO BRUTO DE <i>P. spruceanum</i>	23
3.5.1 Obtenção da solução inicial: Micelar	23
3.5.2 Otimização da solução micelar por desenho experimental fatorial	24
3.5.3 Obtenção da formulação final: Hidrogel	25
3.6 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DA FORMULAÇÃO	26
3.6.1 Teste de centrifugação	26
3.6.2 Estabilidade preliminar	26
3.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA POR MICRODILUIÇÃO EM CALDO	27
3.7.1 Determinação da CIM	27
3.7.2 Determinação da CBM	27
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	29

4.1 CARACTERIZAÇÃO DO MATERIAL PULVERIZADO	29
4.2.1 Teor de umidade	29
4.2.2 Perda por dessecação	30
4.2.3 Análise Granulométrica	31
4.2.4 Análise de Cinzas	32
4.3 DESENVOLVIMENTO DA FORMULAÇÃO CONTENDO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DE <i>P. spruceanum</i>	32
4.3.1 Obtenção da solução inicial: Micelar	32
4.4 OTIMIZAÇÃO DA SOLUÇÃO MICELAR POR DESENHO EXPERIMENTAL FATORIAL	34
4.5 OBTENÇÃO DA FORMULAÇÃO: HIDROGEL	37
4.6 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DA FORMULAÇÃO	39
4.6.1 Teste de centrifugação	39
4.6.2 Estabilidade preliminar	40
4.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA POR MICRODILUIÇÃO EM CALDO	45
5 CONCLUSÃO	48
REFERÊNCIAS	49

1 INTRODUÇÃO

Os produtos naturais estão presentes desde a evolução da humanidade e estão intimamente ligados com a química orgânica, por isso estão bem consolidados e reconhecidos até os dias atuais. Tendo em vista que estes produtos apresentam grande importância devido ao grande potencial para se tornarem medicamentos fitoterápicos. O Brasil possui uma ampla biodiversidade e muitos pesquisadores desenvolvem projetos que envolvem biodiversidade, com a finalidade de investigar o potencial dos produtos naturais na busca de novos medicamentos (BORGES *et al.*, 2017).

A *Protium spruceanum* (*P. spruceanum*), também conhecida popularmente como “breu”, pertence à família *Burseraceae* e é encontrada no Brasil nos biomas Amazônico, Mata Atlântica e no Cerrado. Essa espécie é aromática, com resina oleosa, apresenta coloração esbranquiçada quando entra em contato com o oxigênio do ambiente e cristaliza no tronco. Muitos efeitos farmacológicos já foram descritos na literatura, como antioxidante, cicatrizante, antibacteriano e anti-inflamatório, na medicina popular apresenta diversos usos, como no tratamento de sintomas da gripe, analgesia, efeito cicatrizante e expectorante (MENEZES FILHO *et al.*, 2021).

Outros estudos relatam atividade antibacteriana e antioxidante para o extrato etanólico de *P. spruceanum*. O microrganismo que apresenta mais relatos com a ação do extrato é *Staphylococcus aureus*, uma bactéria Gram-positiva considerada a principal responsável por infecções de pele, e por conta dessa ocorrência, cada vez mais se tornam resistentes aos antibióticos já conhecidos e utilizados comumente (SVENT-KUCINA *et al.*, 2015).

Cada vez mais a pesquisa em estudos na área de nanotecnologia, manipulação e aplicação das estruturas nanométricas, tem importância na sociedade atual, devido aos diversos benefícios que traz, além de inovações no mercado. Com a criação do Programa Nacional de Nanotecnologia em 2002, com o intuito de ampliar o conhecimento e financiar projetos que naquela época já eram reconhecidos como vantajosos, o desenvolvimento desta área se tornou reconhecido. Contudo essa área no Brasil teve um avanço lento e apenas recentemente se tornou mais intensa a pesquisa de inovações neste meio (SILVA *et al.*, 2021).

No geral, a população brasileira é preocupada com a saúde e o bem estar, e por conta disso o mercado de fitoterápicos e cosméticos tem grande potencial para avançar tecnologicamente. Formulações nanoestruturas e sistemas micelares ganham espaço neste meio por apresentar alta tecnologia associada a benefícios, como a eficácia e segurança demonstrada pelo uso de plantas medicinais (RAMOS *et al.*, 2020).

O hidrogel é um exemplo de formulação utilizada para aumentar a eficácia e segurança de ativos, além disso, apresenta um sistema de entrega controlada de fármacos. O hidrogel facilita a liberação localizada, sustentada e prolongada do medicamento, diminuindo assim o número de aplicações e evitando efeitos colaterais (HAMIDI *et al.*, 2008; GAO *et al.*, 2016; OMELCHENKO *et al.*, 2018).

Portanto, este estudo buscou propor uma alternativa aos problemas relacionados à resistência bacteriana, a falta de produtos que possuam tal efeito, além de trazer inovação nesta área de pesquisa.

1.1 JUSTIFICATIVA

Com o avanço da nanotecnologia e o reconhecimento de medicamentos fitoterápicos, a encapsulação de extratos vegetais em sistemas nanoestruturados vem sendo amplamente estudadas. Com a maior procura de produtos desta natureza, há uma corrida do mercado mundial por sistemas que proporcionem ao paciente toda essa tecnologia associada a um efeito terapêutico seguro e eficaz.

É importante ressaltar que, o desenvolvimento de formulações é essencial para veiculação do extrato, pois podem influenciar no aumento da biodisponibilidade e biocompatibilidade. Além de aumentar a eficácia, reduzir a toxicidade e proporcionar uma melhor aplicação do produto.

Devido a atividade antibacteriana já demonstrada com o extrato etanólico bruto das folhas de *P. spruceanum*, mais estudos são necessários para saber qual o potencial antimicrobiano deste produto quando incorporado à formulação.

1.2 REFERENCIAL TEÓRICO

1.2.1 Produtos naturais

Na última década, foi observado o crescimento de terapias integrativas e utilização de produtos naturais. No Sistema Único de Saúde (SUS) observam-se ações que reconhecem e apoiam o uso pela população, por conta dos benefícios e inovações que trazem e por serem descritos como práticas populares desde a pré-história (DE LARA *et al.*, 2019).

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, as plantas medicinais são também denominadas drogas vegetais e apresentam princípio ativo em sua composição, e devido a isso

proporcionam uso terapêutico no tratamento da causa ou dos sintomas de doenças, ou seja, “as plantas medicinais são aquelas capazes de aliviar ou curar enfermidades e têm tradição de uso como remédio em uma população ou comunidade” (BRASIL, 2020).

Os produtos naturais podem ser plantas medicinais ou fitoterápicos. No entanto, fitoterápicos são medicamentos obtidos a partir de matérias-primas vegetais exclusivamente e que apresentam segurança, eficácia e qualidade garantidas por meio de evidências clínicas (BRASIL, 2014). Podem ser manipulados em farmácias magistrais autorizadas pela vigilância sanitária. Esses medicamentos passam pelo processo de industrialização para garantir a qualidade e evitar contaminações por micro-organismos ou outras substâncias estranhas que causam malefícios para o paciente. Outros aspectos da industrialização é garantir a padronização da dose e da forma de administração, proporcionando maior segurança de uso, uma vez que as plantas medicinais normalmente são utilizadas na forma de infusão ou chá e não há um controle da dose utilizada (BRASIL, 2020).

O uso irracional de plantas medicinais ou fitoterápicos traz danos à saúde como qualquer fármaco sintético, quando do uso indiscriminado. Os pacientes não estão livres de reações adversas, contra indicações e toxicidade por serem naturais, devido à grande quantidade de compostos presente. Como todo medicamento, podem interagir com outros fármacos e potencializar ou inibir os efeitos deste, além de alimentos, e dessa forma podem levar a uma piora do paciente (DE LARA *et al*, 2019).

O sexo feminino é o que mais demonstra interesse neste tipo de terapia. O uso pelas mulheres está muito relacionado com o avanço da idade (ZENI *et al.*, 2017). Geralmente o uso de plantas medicinais é passado entre as gerações e isto é um problema, pois não há controle com a dose e a forma de administração no uso de plantas medicinais.

Atualmente esses produtos desempenham um papel relevante na medicina moderna. Cada vez mais produtos naturais são utilizados pela população, e o Brasil, com uma população preocupada com saúde e bem estar, além de deter da segunda maior base de dados de produtos naturais, não fica atrás nessa corrida por medicamentos fitoterápicos. Segundo a Fundação Araucária, há um compilado com informações detalhadas sobre mais de 54 mil substâncias da biodiversidade brasileira, ficando atrás somente da China (FAPESP, 2020).

A partir dos dados demonstrados anteriormente sobre a posição do Brasil na pesquisa e desenvolvimento de produtos naturais e pela biodiversidade, este território se situa em posição privilegiada. Associado a tudo isso, o Brasil apresenta um grande corpo de pesquisadores, principalmente das universidades federais, que incentivam a pesquisa científica para o avanço da química de produtos naturais no Brasil (BERLINK *et al.*, 2017).

1.2.2 *Protium spruceanum* (Burseraceae)

A *Protium spruceanum* é uma espécie da família Burseraceae que apresenta em torno de 16 gêneros, com aproximadamente 800 espécies (GONÇALVES, 2017). Formada exclusivamente de espécies arborícolas e arbustos em regiões tropicais, está presente na África, Malásia e América do Sul. No Brasil, o bioma Amazônico é o que apresenta maior diversidade, com 73 espécies identificadas, sendo 42 endêmicas dessa região (MENEZES FILHO, 2021) e as principais *Bursera*, *Commiphora*, *Crepidospermum*, *Dacryodes*, *Protium*, *Tetragastris* e *Trattinnickia* (Flora do Brasil, 2018). A espécie *Protium spruceanum* (Benth.) Engler apresenta porte arbóreo com dossel, altura média de 20 metros, auge das inflorescências nos meses de setembro a novembro e frutificação de outubro a março, com frutos lisos, brilhantes, coloração amarela a vermelha quando maduro (MENEZES FILHO, 2021), deiscente e aromático, podendo ter um ou mais pirênios uniloculares separados. Apresenta raque com 2 a 3 pares de folíolos, membranáceos e elípticos, com margem inteira, a nervura principal se encontra na face interior com tricomas finos e eretos, podendo ser denso a esparso. Tem copa grande e caracteriza-se por apresentar uma resina incolor que quando seca se torna um pó branco (GONÇALVES, 2017). Na figura 1 as partes da planta, como folhas, caule e frutos estão representados.

Figura 1 - Frutos, caule e folhas de *Protium*



Fonte: http://ecologia.ib.usp.br/guiaigapo/familias/burseraceae/protium_spruceanum/protium_spruceanum.html>
 acesso em: 23/07/2021.

Dentre os constituintes químicos da *P. spruceanum* (Benth.) Engler, pode-se destacar os taninos e flavonoides. Estes contribuem para atividade cicatrizante. Outra atividade já

demonstrada foi a anti-inflamatória no uso tópico. Na medicina tradicional foi observada ação expectorante e atividade antibacteriana contra o microrganismo patogênico *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) com o uso de extratos e frações de *P. spruceanum*. As folhas apresentam atividade anti-inflamatória e analgésica (RODRIGUES *et al.*, 2013).

É importante ressaltar que as atividades anti-inflamatória, antioxidante, cicatrizante e antibacteriana representam grande importância no tratamento de infecções de pele, como impetigo, foliculites, celulites, abscessos e infecções de feridas e queimaduras (AMPARO, 2018).

Uma alternativa cada vez mais procurada para tratamento de doenças são os produtos naturais, pois possuem diversas atividades farmacológicas devido à grande diversidade estrutural e química desses produtos. Tendo em vista essa procura, estes são potenciais protótipos com ação mais específica e eficiente a fármacos já existentes (BRASIL *et al.*, 2018), além de serem uma alternativa de escolha de sucesso para fármacos sintéticos com resistência para o tratamento contra bactérias.

A atividade antimicrobiana atribuída aos extratos etanólicos brutos de folhas e galhos dessa espécie apresentam amplo espectro. Foram relatadas atividades contra 20 espécies de microrganismos sendo o *S. saprophyticus* e *S. aureus* os mais susceptíveis (AMPARO *et al.*, 2017). As frações acetato de etila e hidrometanólica apresentaram maior atividade antibacteriana e estão relacionadas à presença de cumarinas, flavonóides e taninos (AMPARO, 2016).

1.2.3 Formulações nanoestruturadas

As formulações nanoestruturas têm demonstrado grande potencial como formas farmacêuticas eficientes para o tratamento de inúmeras doenças (GONÇALVES, 2017) e são associadas a uma melhor estabilidade (RITTES *et al.*, 2016). Para este sistema, o tamanho de partícula se encontra na faixa de 1 a 100 nanômetros (DESMARAIS, 2018 *apud.* NSET, 2000). Na área farmacêutica, as nanopartículas apresentam dimensões entre 100-600 nm, porém partículas de tamanho entre 60-70 nm ou até mesmo inferiores a 50 nm podem ser utilizadas (DESMARAIS, 2018 *apud.* FRONZA *et al.*, 2007). Formulações nanoestruturas podem estar presentes em diversos sistemas, como nanocápsulas, microemulsões, nanoesferas, nanoemulsões, lipossomas, nanopartículas lipídicas sólidas, etossomas e niossomas (GUTERRES *et al.*, 2007).

O sistema micelar possibilita maior tempo de ação no local de aplicação, assim diminui os efeitos indesejados por absorção por outras células, além de impedir a degradação prematura dos fármacos e menor toxicidade (GRIMALDI *et al.*, 2016; SHAO *et al.*, 2016). Outro benefício das nanoestruturas é a diminuição das doses, alternativa terapêutica, controle de liberação do fármaco, proteção contra instabilidades do organismo favorecendo uma concentração plasmática constante (PORTO *et al.*, 2020). Além de ser uma alternativa na área farmacêutica, apresentam aplicações na área cosmética e de nutracêuticos (RIBEIRO *et al.*, 2020).

Este sistema é associado a diversas vantagens e a principal é a entrega controlada da dose do fármaco, porém para utilização de moléculas nanométricas para incorporação do ativo deve-se considerar diversos parâmetros, como tamanho de partícula, distribuição de tamanho, polimorfismo, além de garantir, ao final da formulação, estabilidade a mesma (RIBEIRO *et al.*, 2020).

A nanotecnologia apresenta caráter interdisciplinar (Figura 2), pois pode ser empregada em diversas áreas da ciência e tecnologia, incluindo a medicina, química, física, engenharia, informática, biologia e farmácia (DESMARAIS, 2018 *apud*. DURÁN & DE AZEVEDO, 2004; FRONZA *et al.*, 2007; LEE, 2004).

Figura 2 - Aplicações da nanotecnologia em diferentes áreas do conhecimento.



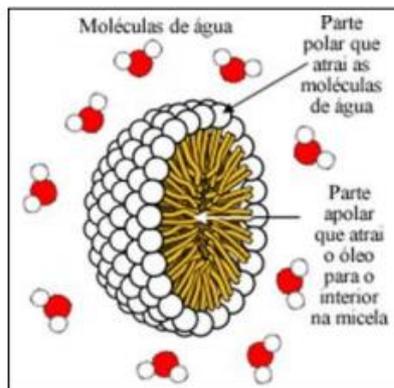
Fonte: <http://tricosmetologiacapilar.blogspot.com.br/2013/08/nanotecnologia-em-cosmeticos.html>.

Acesso em 23/09/2021

1.2.4 Formulações micelares

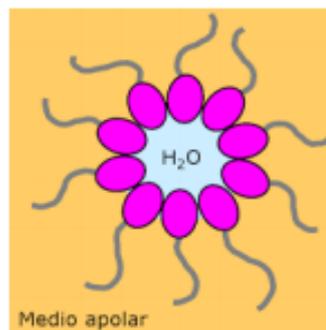
Com o avanço da ciência e mais oportunidades na medicina aliada a nanotecnologia, estratégias alternativas de transporte de fármacos têm sido desenvolvidas com promissor potencial na incorporação e solubilização de fármacos, como os sistemas micelares (RAQUEL; FIGUEIRAS, 2016). Estes sistemas são anfifílicos em solução e apresentam parte hidrofóbica e hidrofílica, representado na figura 3 e 4, tem tamanho de partícula variando entre 200 a 300 nm para aplicação cutânea (CONTRI, R.V., 2010), com acúmulo do fármaco nas células de interesse e estrutura com alta estabilidade, solubilidade em água, baixa toxicidade, incorporação de diversos tipos de fármacos liberação controlada e proteção de substâncias encapsuladas da degradação pelo organismo (GEROLA, 2013).

Figura 3 - Representação de um sistema micelar em meio polar.



Fonte: <https://www.ufjf.br/quimica/files/2015/10/LABORAT%20RIO-DE-QU%20MICA-DOS-ELEMENTOS-QUI081-2017-SAB%20ES-E-DETERGENTES-1.pdf> acesso em: 23/07/2021.

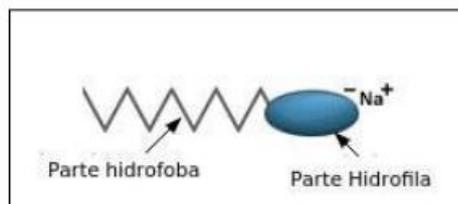
Figura 4 - Representação esquemática de um sistema micelar em meio apolar.



Fonte: <https://www.ufjf.br/quimica/files/2015/10/LABORAT%20RIO-DE-QU%20MICA-DOS-ELEMENTOS-QUI081-2017-SAB%20ES-E-DETERGENTES-1.pdf> acesso em: 23/07/2021.

As micelas, devido ao baixo peso molecular e por possuírem em sua composição polímeros anfifílicos, quando em meio aquoso, se juntam formando micelas poliméricas que ultrapassam uma concentração micelar crítica (CMC) (CHIAPPETTA & SOSNIK, 2007). Essas micelas poliméricas são nanossistemas e se apresentam estruturalmente com um núcleo hidrofóbico e uma camada externa hidrofílica, como representado na figura 5 (MAZZAFERRO, BOUCHEMAL & PONCHEL, 2013; YUAN *et al.*, 2010).

Figura 5 - Representação esquemática de um tensoativo.



Fonte: <https://www.ufjf.br/quimica/files/2015/10/LABORAT%c3%93RIO-DE-QU%c3%8dMICA-DOS-ELEMENTOS-QUI081-2017-SAB%c3%95ES-E-DETERGENTES-1.pdf>> acesso em: 23/07/2021.

O núcleo hidrofóbico quando em contato com compostos da mesma natureza apresenta capacidade para encapsular, o que contribui para uma melhora da solubilidade aquosa deste composto, em contrapartida a camada externa hidrofílica serve como interface estabilizante entre o meio aquoso e o interior hidrofóbico (MAZZAFERRO, BOUCHEMAL & PONCHEL, 2013). Portanto, este sistema é essencial para transporte de fármacos hidrofóbicos, uma vez que estes são instáveis e insolúveis em meio fisiológico (RAQUEL; FIGUEIRAS, 2016).

Os tensoativos são essenciais para a formação deste sistema, pois dependem diretamente de características estruturais deste componente para determinar o tamanho das regiões polares, apolares, características iônicas ou não iônicas. As micelas são formadas após uma concentração micelar crítica (CMC) de tensoativo (SANTOS, 2017). Um tensoativo amplamente utilizado é o Poloxamer, este é um copolímero com capacidade de gelificação termoresponsivo. O ponto de gelificação depende da concentração de polímero adicionado à solução aquosa e da temperatura. Após a adição, organiza-se em micelas aumentando a viscosidade da formulação (FERREIRA, 2019).

Atualmente existe a necessidade de aumentar a biodisponibilidade de vários fármacos devido a baixa solubilidade em meio aquoso e as micelas estão diretamente relacionadas a essa melhora, pois podem aumentar a biodisponibilidade diante da baixa solubilidade, funcionar

como nanocarreadores seletivos em determinados sítios de ação para minimizar os efeitos adversos e como sistema de liberação controlada de fármacos (SANTOS, 2017).

1.2.4.1 Hidrogel

O hidrogel é um material de base polimérica de rede tridimensional com altíssima capacidade de absorver água, microestrutura parecida com a matriz extracelular (MEC) (MA *et al.*, 2016) e relevante biocompatibilidade (GONG, 2006). Apresenta características hidrofílicas por conta de grupos como: -OH, -COOH, -CONH, serem moles, elásticos e solúveis em água e incham na presença desta, apresentam grande resistência mecânica, tem boa interação com tecidos vivos, por isso é muito utilizado na medicina, além de apresentarem biocompatibilidade e terem liberação controlada de fármacos (PEÑARANDA *et al.*, 2009).

Na área farmacêutica tem grande importância na utilização como liberadores de drogas por conseguirem transportar substâncias com alto poder tecnológico com doses menores, prolongar o tempo de ação e minimizar os efeitos adversos (PEÑARANDA *et al.*, 2009; CORRALES *et al.*, 2006).

Os hidrogéis são muito versáteis e podem encapsular um grande número de fármacos e por isso são bons candidatos para tratar tipos de doenças diferentes (DORADO, 2018).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver uma formulação micelar contendo extrato etanólico bruto das folhas de *P. spruceanum* e avaliar a atividade antimicrobiana.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver uma formulação micelar a partir de extrato etanólico bruto;
- Avaliar a estabilidade da formulação obtida;
- Avaliar a atividade antimicrobiana da formulação.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 COLETA DE *P. spruceanum*

As folhas e galhos da espécie *P. spruceanum* foram coletados no campus da Universidade Federal de Lavras pelo pesquisador colaborador do projeto Lucas Apoiinario Chinli e enviados para o campus Morro do Cruzeiro da Universidade Federal de Ouro Preto.

Uma exsicata foi depositada no Herbário da Universidade Federal de Lavras sob número de registro 16399 HESAL. Foi realizada também o registro no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN), sob número A2B5290.

A partir do recebimento do material coletado, os galhos foram descartados e as folhas passaram por processo de seleção com o objetivo de eliminar as que contêm sujidades, fungos, dentre outros aspectos anormais.

3.2 SECAGEM DAS FOLHAS

As folhas previamente selecionadas foram submetidas a processo de secagem à temperatura ambiente, por 30 dias.

3.3 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO MATERIAL PULVERIZADO

Após secagem, as folhas foram trituradas, até o estado de pó fino, em moinho de facas (MR Manesco®, Brasil). Posteriormente, o pó foi caracterizado quanto ao teor de umidade, perda por dessecação, análise granulométrica e análise de cinzas.

3.3.1 Teor de umidade

A análise do teor de umidade, segundo Nichelle e colaboradores (2018) serve para determinar a quantidade de água em uma substância. Está relacionada à estabilidade, qualidade e composição do produto, pois pode afetar a vida útil (estocagem), processabilidade e qualidade do produto (NICHELLE *et al.*, 2018).

Para a realização deste teste foi pesado 1g da amostra em triplicata em cadinhos, previamente pesados vazios e dessecados. Estes contendo a amostra foram levados à estufa, a

105 °C por 15 minutos, posteriormente foram transferidos para dessecador com sílica até o resfriamento. Após o resfriamento, os cadinhos com a amostra foram pesados novamente.

3.3.2 Perda por dessecação

A determinação da perda por dessecação é um parâmetro analisado para determinar a quantidade de material volátil que é perdida sobre condições específicas e foi realizada segundo o método descrito na Farmacopéia Brasileira (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, VI, 2010b).

Neste ensaio foi pesado 1g da amostra em triplicata em cadinhos, que também foram pesados previamente vazios. Após a pesagem, a amostra foi transferida para os cadinhos e levados à estufa, à temperatura de 105 °C por 2 horas, e em seguida transferidos para o dessecador com sílica até o resfriamento, sob vácuo. Depois de realizar este processo, os cadinhos foram pesados contendo a amostra.

3.3.3 Análise Granulométrica

O ensaio de granulometria, segundo a Farmacopéia Brasileira 6ª Ed., é um procedimento realizado para que se possa determinar a distribuição granulométrica de uma certa substância, ou seja, determinar o percentual em peso que cada malha do tamis irá representar no total de massa seca utilizada para o ensaio, a partir da amostra obtida (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, VI, 2010b).

Inicialmente foram pesados 25 g do pó triturado e posteriormente transferidos para a maior malha do tamis, que a princípio foi pesado vazio, cada tamis. Com o pó no tamis, foi realizada a agitação por vibração por 30 minutos. Posteriormente foi pesada cada malha do tamis com sua respectiva fração, em que a massa obtida foi subtraída do peso da malha vazia e foi obtido o valor da massa em gramas.

3.3.4 Análise de Cinzas

A análise de cinzas determina a fração de “cinzas” residuais que não são destruídas pela queima do produto, de acordo com Nichelle e colaboradores. Depende da temperatura e do tempo em que pode submeter a amostra a este teste (NICHELLE *et al.*, 2018).

Para a realização da análise de cinzas, os cadinhos foram lavados e secos em estufa à 550°C, por 4 horas. Em seguida, foram retirados da estufa e levados para o dessecador e foi aguardado o resfriamento por aproximadamente 1 hora. Para iniciar o procedimento, pesamos

e anotamos a massa de cada cadinho vazio, adicionamos 5 g das folhas secas e trituradas de *P. spruceanum* e pesamos novamente os cadinhos individualmente, com a amostra. Na etapa seguinte, os cadinhos com a amostra foram levados para a estufa à temperatura de 550 °C, aumentando gradativamente, por 5 a 6 horas, e depois para resfriar no dessecador. Ao final, os cadinhos foram pesados novamente e a porcentagem de resíduo foi calculada.

3.4 OBTENÇÃO DO EXTRATO

Para este procedimento, foram pesados aproximadamente 400 g das folhas secas e trituradas de *P. spruceanum* que, em seguida, foram umedecidas com álcool etílico absoluto e colocadas em um percolador com solvente, álcool 70%. Este sistema ficou em repouso por 48 horas até que se pudessem iniciar as extrações. Após 48 horas, foi realizada a primeira extração no sistema.

Para a obtenção do extrato, o filtrado foi levado ao rotaevaporador, sob pressão reduzida à temperatura de 40 °C e o concentrado obtido foi levado para estufa, à temperatura de aproximadamente 25°C por 30 dias, em placa de Petri, previamente pesada vazia, para se obter uma maior evaporação do solvente. Após esta etapa, a placa de Petri com o extrato bruto foi pesada novamente para calcular o rendimento.

3.5 DESENVOLVIMENTO DA FORMULAÇÃO CONTENDO EXTRATO BRUTO DE *P. spruceanum*

3.5.1 Obtenção da solução inicial: Micelar

Inicialmente foi realizada a solubilização do extrato com 10 mL de etanol 99,8% P.A e do Poloxamer 407 com 10 mL etanol 99,8% P., sem a utilização do DMSO a princípio, para observar o comportamento do extrato. As concentrações de extrato e poloxamer utilizadas estão demonstradas na tabela 1. Após a solubilização, ambos foram vertidos para um mesmo balão de fundo redondo e o solvente foi evaporado em rotavapor à temperatura de 40°C e sob pressão reduzida.

Quando ocorreu a formação do filme polimérico foi adicionada água MiliQ, em quantidade suficiente para completar o volume final de 20 mL da formulação. Em seguida, foi realizada a homogeneização em agitador magnético, levemente, para que não fosse produzido grande volume de espuma. A solução micelar foi armazenada em geladeira por até 72 horas

para reduzir a espuma. Os aspectos macroscópicos da formulação, como cor e odor foram observados.

Tabela 1 - Concentrações de extrato etanólico bruto da planta *P. spruceanum* e tensoativo utilizados no teste inicial.

Extrato (%)	Poloxamer (%)	Água q.s.p.
0,5	13	20mL
1,0	13	20mL
1,5	13	20mL

A etapa seguinte foi a leitura do tamanho de partícula e índice de polidispersão (IPD) por meio do aparelho Zetasizer (PN3702) - Software: Zetasizer, utilizando-se cubeta de quartzo. Em todas as leituras as amostras foram analisadas após diluição (1:1000) em água MilliQ e em triplicata. As medidas foram executadas em ângulo de retroespalhamento de 173° C, à temperatura de 25 °C. Os dados foram expressos como a média \pm desvio padrão. Foram selecionadas para a próxima etapa as formulações que apresentaram o tamanho de partícula em escala nanométrica e baixo índice de polidispersão nas leituras realizadas 24 horas e 7 dias após a obtenção das soluções.

3.5.2 Otimização da solução micelar por desenho experimental fatorial

A otimização das soluções micelares obtidas na etapa anterior foi realizada por meio do desenho experimental fatorial. Para este desenho, foi utilizado o planejamento fatorial 3², onde foi analisada a influência das diferentes concentrações de extrato, tensoativo (Poloxamer) e DMSO, que a partir deste momento passou a ser utilizado para ajudar na solubilização do extrato, visto a dificuldade de solubilização do mesmo em etanol absoluto, sobre o tamanho das partículas e o IPD. Neste caso, o DMSO foi utilizado para se obter uma melhor solubilidade do extrato e consequentemente avaliar se este possui impacto positivo no desenvolvimento da formulação.

Foram produzidas nove formulações para cada concentração de extrato (1.0, 1.25 e 1.5%), Poloxamer 407 (13, 14 e 15) e DMSO (0, 1 e 2) em estudo, sendo o volume final ajustado para 5 mL, e foram avaliadas 3 variáveis diferentes, cada uma a três níveis descritos

como mínimo (-), médio (0) e máximo (+), dados apresentados na Tabela 2. Dessa forma, foram produzidas ao final 27 formulações diferentes.

Tabela 2 - Matriz de ensaios.

Nível de planejamento fatorial	Extrato (%)	Variáveis	
		Poloxamer (%)	DMSO (%)
-	1,0	13	0
0	1,25	14	1
+	1,50	15	2

A leitura do tamanho de partícula e IPD foi realizada no aparelho Zetasizer (PN3702) - Software: Zetasizer, utilizando-se cubeta de quartzo. Em todas as leituras as amostras foram analisadas após diluição (1:1000) em água MiliQ. Sendo cada análise realizada em triplicata, as medidas foram executadas em ângulo de retroespalhamento de 173°, à temperatura de 25 °C. Os dados foram expressos como a média \pm desvio padrão. As análises estatísticas dos dados e as curvas de superfície de resposta foram realizadas usando o software Minitab® 18 Statistical Software (Minitab Inc., State College, PA, USA) para representar os valores das respostas.

3.5.3 Obtenção da formulação final: Hidrogel

Após a análise estatística e seleção da formulação com menor tamanho de partícula e IPD esta foi testada com diferentes concentrações de poloxamer com o objetivo de se obter uma formulação final com a seguinte característica: à temperatura ambiente a formulação estará no estado líquido e, em contato com a pele a mesma passará para o estado gelificado. Para verificar o comportamento da formulação frente às variações de temperatura, foram realizados testes de exposição das mesmas a diferentes temperaturas, e foi selecionada a formulação que se tornou sólida à temperatura próxima à 35°C. As formulações foram colocadas em água quente e a temperatura foi monitorada utilizando-se um termômetro digital, a temperatura do banho foi aumentada a cada 2°C e, a cada aumento da temperatura foi observada as alterações de viscosidade da formulação até a passagem para o estado gelificado.

Posteriormente foi realizada a leitura do tamanho de partícula, IPD e potencial zeta da formulação final com o auxílio do aparelho Zetasizer (PN3702) - Software: Zetasizer, utilizando-se cubeta de quartzo. Em todas as leituras as amostras foram analisadas após diluição

(1:1000) em água MiliQ. Sendo cada análise realizada em triplicata, as medidas foram executadas em ângulo de retroespalhamento de 173° , à temperatura de 25°C . Os dados foram expressos como a média \pm desvio padrão.

As análises estatísticas dos dados foram feitas utilizando o *software GraphPad Prism 5* (*Prism Software, Irvine, CA, USA*), sendo as diferenças consideradas significativas quando os valores de p foram inferiores a 0,05 ($p < 0,05$). O teste *Shapiro-Wilk* foi realizado para verificar os padrões de normalidade. Para os dados classificados como paramétricos foram realizadas análises de variância (ANOVA *one-way*).

3.6 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DA FORMULAÇÃO

3.6.1 Teste de centrifugação

O teste de centrifugação foi realizado em triplicata e foram utilizados 1,0 mL das amostras, as quais foram colocadas em tubos de microcentrífuga, centrifugadas a 3000 rotações por minuto (rpm) por 30 minutos. Esta foi uma análise qualitativa, em que após o término do processo, cada uma das três amostras foi avaliada visualmente, com o intuito de observar a presença de precipitado no fundo do tubo ou separação de fases na amostra.

3.6.2 Estabilidade preliminar

Este estudo de estabilidade preliminar ou estabilidade forçada teve duração de 12 dias e as formulações foram submetidas a condições de estresse, 6 ciclos de 24 horas alternados de resfriamento ($5^\circ\text{C} \pm 2$) em refrigerador e aquecimento ($40^\circ\text{C} \pm 2$) em estufa, com o intuito de acelerar o surgimento de possíveis sinais de instabilidade e/ou mudanças físicas em condições forçadas de armazenamento.

Nos dias 0, 6° e 12° foram realizadas leituras dos tamanhos de partícula, IPD e potencial zeta com o auxílio do aparelho Zetasizer (PN3702) - Software: Zetasizer, utilizando-se cubeta de quartzo. As amostras foram analisadas, em todas as leituras, após diluição (1:1000) em água MiliQ. Sendo cada análise realizada em triplicata, as medidas foram executadas em ângulo de retroespalhamento de 173° , à temperatura de 25°C . Os dados foram expressos como a média \pm desvio padrão. Nesses dias foram avaliadas também as características organolépticas (cor, odor e aspecto), o pH de uma solução aquosa (1:10) e a temperatura de solidificação da amostra.

3.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA POR MICRODILUIÇÃO EM CALDO

3.7.1 Determinação da CIM

Para a determinação da concentração inibitória mínima foi utilizado o método de microdiluição em caldo, conforme as orientações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), com modificações (CLSI, 2012).

As amostras de extrato etanólico bruto de *P. spruceanum* foram solubilizadas em dimetilsulfóxido (DMSO) a 2% e água ultrapurificada (sistema MiliQ®), de forma a obter uma solução de concentração igual a 100 mg/ml e a formulação foi diluída para se obter a concentração de 500 µg/ml. O microrganismo testado foi a bactéria *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e o antibiótico utilizado como controle positivo foi a tetraciclina com concentração de 50 µg/ml.

Inicialmente a bactéria foi repicada em placa de Petri contendo Ágar Mueller Hinton e incubada à 37 ± 2 °C por 24 horas. A preparação do inóculo foi feita em salina, de modo a se obter suspensão de turvação referente ao tubo 0,5 da escala McFarland (1×10^8 UFC/mL). As suspensões foram diluídas de (1:100) em caldo Mueller Hinton, para obter uma suspensão a 1×10^6 UFC/ml, para que a concentração final de micro-organismo no teste fosse 5×10^5 UFC/ml.

Posteriormente, a microplaca de poliestireno de 96 poços de fundo U de 280 µL foi preparada utilizando-se diluição seriada na razão de 1:2 tanto para o extrato bem como para a formulação, sendo 12 diluições para cada um e estas diluições foram realizadas em triplicata. A cada diluição com volume de 50 µL, foi adicionado 50 µL de inóculo em todos os poços, perfazendo um volume final de 100 µL.

A diluição seriada do extrato começou com a concentração de 100 mg/ml e se estendeu até obtermos uma concentração de 0,049 mg/ml e assim ter uma área maior de concentrações para testarmos a atividade antimicrobiana. O mesmo ocorreu para a formulação, em que se iniciou com uma concentração de 500 µg/ml e finalizou a 0,24 µg/ml. Esta microplaca foi incubada à 37 ± 2 °C por 24 horas. Nos últimos poços foram feitos os controles em triplicata: meio e inóculo (Controle de Crescimento), Controle de DMSO, Controle de Antibiótico e Controle de Meio.

Finalizando o período de incubação foi possível determinar a concentração inibitória mínima (CIM) no poço da microplaca em que não houve crescimento bacteriano, porém na placa de Petri ocorreu crescimento da bactéria *S. aureus*.

3.7.2 Determinação da CBM

Depois do tempo de incubação de 24 horas da microplaca, as suspensões, referente a cada poço, foram inoculadas em Placa de Petri contendo ágar Mueller Hinton incubadas por 24 horas em estufa a 37 ± 2 °C. Finalizado o período de incubação foi observado crescimento para determinação da concentração bactericida mínima (CBM).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO

Para obtenção do extrato, foram utilizados 600 mL de álcool etílico absoluto, para umectar as folhas secas e trituradas de *P. spruceanum* e posteriormente o pó foi adicionado ao percolador com 1.050 mL de solvente, álcool 70%. Após 48 horas em repouso, foi realizada a primeira filtração no sistema. Foram necessárias 16 filtrações para que todas as substâncias fossem obtidas no extrato, totalizando 12.900 mL de solvente utilizados.

Foram utilizados 400 g do material vegetal triturado e ao final de todo o processo foram obtidos 105,2773 g de extrato etanólico bruto, totalizando um rendimento de 26,32 %. Ao comparar com a extração realizada no trabalho de Amparo e colaboradores (2016), onde os autores também utilizaram *P. spruceanum* colhida no mesmo local, o valor de rendimento do extrato etanólico bruto obtido está acima do que foi encontrado pelo método de maceração, que apresentou rendimento de 16,93% (AMPARO, 2016).

É importante realizar uma comparação entre espécies iguais e de mesmo solo e região, pois a diferença de rendimento entre os extratos pode ser atribuída à diferença da disponibilidade de componentes extraíveis, que pode variar entre as plantas, até entre as suas partes (SULTANA *et al.*, 2009).

4.2 CARACTERIZAÇÃO DO MATERIAL PULVERIZADO

4.2.1 Teor de umidade

Os cadinhos inicialmente com 1g da amostra foram submetidos à 105°C por 15 minutos e posteriormente ao resfriamento, foram pesados para posterior análise do teor de umidade que esta amostra contém de acordo com a massa perdida. Os dados detalhados estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3 - Valores obtidos referente a perda de massa de material vegetal no teste de teor de umidade.

Replicata	Cadinho vazio	Amostra	Cadinho pós resfriamento	Perda	%
1	19,5857 g	1 g	20,5197 g	0,066 g	6,6 %
2	19,8502 g	1 g	20,7833 g	0,0669 g	6,69 %
3	18,7315 g	1 g	19,6604 g	0,0711 g	7,11 %

Média e DP	0,068 g ±	6,8 %
=	0,002	

*DP: Desvio padrão

Com o aquecimento da amostra, houve uma perda média de 6,8% da massa total, que é equivalente a 0,068 g do peso inicial. Segundo a Farmacopeia Brasileira 6ª edição (2019), o limite de teor de umidade estabelecido é de 8 a 14%. Assim, de acordo com os dados da Tabela 2, nenhuma das três replicatas cumpriu com o teste. Este resultado baixo de teor de umidade pode ser decorrente de um excesso de tempo no momento da secagem das folhas na bancada. Entretanto, mesmo com esse valor fora da especificação, podemos garantir que não houve crescimento microbiano por conta da umidade presente da amostra, pois o pó das folhas se apresentou com teor de umidade abaixo do normal, ou seja, apresenta menor quantidade de água em sua composição.

4.2.2 Perda por dessecação

Os cadinhos inicialmente com 1g da amostra foram submetidos a uma temperatura de 105°C por 2 horas e após o resfriamento foram pesados para verificar o valor perdido em gramas referente a perda por dessecação devido ao aquecimento. Os dados detalhados estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4 - Valores obtidos referente a perda de massa de material vegetal no teste de perda por dessecação.

Replicata	Cadinho vazio	Amostra	Cadinho pós resfriamento	Perda	%
1	18,9372 g	1 g	19,8592 g	0,078 g	7,8 %
2	20,1590 g	1 g	21,0793 g	0,0797 g	7,97 %
3	19,1954 g	1 g	20, 1158 g	0,0796 g	7,96 %
Média e DP				0,0791 g ±	7,91 %
=				0,0001	

*DP: Desvio padrão

De acordo com a tabela acima (Tabela 4), houve uma perda média de 7,91% da massa total, que é equivalente a 0,0791 g do peso inicial. Segundo a Farmacopeia Brasileira 6ª edição (2019), o limite de perda por dessecação estabelecido é de 8 a 12%. Assim, de acordo com os dados da Tabela 4, nenhuma das três amostras cumpriu com o teste e este resultado baixo de perda por dessecação pode ser decorrente do ganho de massa no momento do resfriamento no dessecador, caso a base de apoio do dessecador não estivesse totalmente limpa, ou até mesmo pela umidade do clima na cidade de Ouro Preto - MG, que contribui para o ganho de massa.

4.2.3 Análise Granulométrica

25 g do pó triturado foi transferida para a maior malha do tamis, 1.19 mm, e foi realizada a agitação por vibração por 30 minutos. Posteriormente foi pesada cada malha do tamis com sua respectiva fração, em que a massa obtida foi subtraída do peso da malha vazia e foi obtido o valor da massa em gramas. Os dados de todas as malhas estão descritos na tabela abaixo (Tabela 5).

Tabela 5 - Valores de massa depositada em cada malha do tamis.

Malhas selecionadas (mm)	Peso vazio	Peso cheio	Massa	%
0,125	885,40 g	886,87 g	1,47 g	5,88 %
0,21	883,24g	887,56 g	4,32 g	17,28 %
0,42	819,79 g	822,51 g	2,72 g	10,88 %
0,5	908,30 g	910,67 g	2,37 g	9,48 %
0,59	934,85 g	947,59 g	12,74 g	50,96 %
1,19	953,90 g	954,06 g	0,16 g	0,64%

De acordo com a Tabela 5, 50.96% das folhas trituradas em forma de pó passaram pela malha de 1,19 mm do tamis e se depositam na malha de 0,590 mm. Portanto, de acordo com a Farmacopeia Brasileira 6ª edição (2019) a amostra se encaixa nos termos de pó grosso, pois as partículas passam em sua totalidade pelo tamis com abertura nominal de malha de 1,70 mm, e este valor de malha é o que mais se aproxima da utilizada (1,19 mm). Definir o tamanho do pó da amostra é importante, para manter a reprodutibilidade da formulação e de estudos futuros, pois este valor caracteriza a amostra utilizada para obter estes resultados, uma vez que granulometria muito maiores ou menores do que a utilizada vai acarretar em diversas mudanças, como no rendimento de extração e atividade biológica/farmacológica.

4.2.4 Análise de Cinzas

Aos cadinhos inicialmente dessecados e vazios foi adicionado 5g da amostra e estes foram submetidos a uma temperatura de 505°C por 5 a 6 horas e a temperatura foi aumentada gradativamente. Após o resfriamento, os três cadinhos foram pesados para verificar a porcentagem de resíduo. Os dados detalhados estão descritos na Tabela 6.

Tabela 6 - Valores obtidos referente a perda de massa de material vegetal no teste de análise de cinzas.

Replicata	Cadinho vazio	Amostra	Cadinho pós resfriamento	Perda	%
1	37,0123 g	5,0002 g	37,5063 g	4,5062 g	9,88%
2	43,8395 g	5,0000 g	44,3290 g	4,5105 g	9,79%
3	42,6517 g	5,0002 g	43,1576 g	4,4943 g	10,12%
4	42,5888 g	5,0010 g	43,0898 g	4,4991 g	10,02%
Média e DP =				4,5025 g ± 0,006	9,95 %

*DP: Desvio padrão

Segundo a Farmacopeia Brasileira 6ª edição (2019), o limite para este teste é não exceder 12% de resíduo e conforme descrito na tabela acima (Tabela 6), houve uma perda média de 90,05% da massa total, dessa forma restou 9,95% em média de resíduo nos cadinhos. Portanto, a amostra cumpre o teste e valida a baixa presença de matérias inorgânicas no extrato, pois toda matéria orgânica é incinerada na mufla, restando apenas resíduos inorgânicos.

4.3 DESENVOLVIMENTO DA FORMULAÇÃO CONTENDO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DE *P. spruceanum*

4.3.1 Obtenção da solução inicial: Micelar

Inicialmente foi realizado um teste preliminar com o objetivo de verificar se seria possível obter uma solução micelar a partir do extrato etanólico bruto de *P. spruceanum*. Neste teste, verificou-se que, para a solubilização do extrato e poloxamer foram necessários aproximadamente 10 mL de etanol 99,8% P.A. Ao fazer a retirada do solvente, foi possível

observar o desenvolvimento do filme polimérico, o qual ao ser reidratado, levou à formação da solução micelar.

Desta forma, após verificar que é possível obter a solução micelar a partir do poloxamer, utilizando como ativo o extrato etanólico bruto de *P. spruceanum*, verificou-se a concentração máxima de extrato possível a ser incorporada à formulação. Nesse sentido, a incorporação de até 1.5% de extrato à formulação permitiu obter soluções que macroscopicamente apresentaram-se homogêneas, coloração verde e com ausência de sinais de instabilidade como cremação, precipitação ou separação de fases.

Além dos aspectos macroscópicos, as formulações foram caracterizadas quanto ao tamanho de partícula e IPD. A medida de tamanho médio de partícula é importante para definir a faixa de tamanho que reflete diretamente nas propriedades desejadas da formulação. Neste estudo, as formulações apresentaram partículas de tamanho nanométrico (Tabela 7). Em geral, as formulações desenvolvidas e analisadas após 24 horas e 7 dias, apresentaram resultados satisfatórios.

Tabela 7 - Concentrações de extrato etanólico bruto da planta *P. spruceanum* e tensoativo utilizados no teste inicial.

Extrato (%)	Poloxamer (%)	Tamanho(nm) (Leitura: 24hrs)	IPD (Leitura: 24hrs)	Tamanho (nm) (Leitura: 7dias)	IPD (Leitura: 7dias)
0,5	13	229,4 ± 29,75	0,374 ± 0,014	133,3 ± 27,05	0,223± 0,039
1,0	13	213,7±129,6	0,422± 0,091	126,2± 61,36	0,267± 0,056
1,5	13	152,2±69,59	0,241± 0,095	95,04± 29,32	0,245± 0,068

Valores reduzidos de diâmetro de partícula, como encontrado neste estudo em torno de 250 nm são fundamentais para que aconteça uma boa absorção *in vivo* da formulação. Algumas propriedades físicas e químicas dos fármacos, como a biodisponibilidade, uniformidade de conteúdo e estabilidade são afetadas pela distribuição do tamanho de partículas. Assim, o tamanho de partícula das formas farmacêuticas afeta diretamente a eficácia terapêutica (ALLEN JR, et al, 2007).

Em relação ao índice de polidispersão, esse parâmetro fornece informações sobre a homogeneidade da distribuição dos tamanhos de partículas que varia de 0 a 1. Alguns estudos mostram que, um bom índice de polidispersão é aquele que apresenta valor inferior a 0,2, o que

indica a presença de partículas com elevada homogeneidade. Um índice elevado sugere uma ampla distribuição do tamanho ou mesmo a existência de várias populações de diferentes tamanhos de partículas (MORAES, 2009; ALVES *et al.*, 2017).

Outros autores dizem que, populações de partículas monodispersas apresentam $IPD \leq 0,5$, que indica pequena variação de distribuição entre os diâmetros médio das partículas (DAN *et al.*, 2011). As formulações apresentaram $IPD < 0,5$, sendo assim, o diâmetro médio das partículas é estreito.

Como foi dito anteriormente, todas as formulações apresentam $IPD < 0,5$. Na formulação que contém 0,5% de extrato, na leitura realizada 24 horas e 7 dias após o desenvolvimento observou-se uma maior variação dos resultados de tamanho de partícula, com 96,10 nm de variação. Já o IPD variou de 0,374 a 0,223, respectivamente. A formulação com 1% de extrato, na leitura realizada de 24 horas e 7 dias após o desenvolvimento observou-se uma variação intermediária dos resultados de tamanho de partícula, com 87,5 nm de variação. Já o IPD variou de 0,422 a 0,267, respectivamente. E por fim, a formulação com 1,5% de extrato, na leitura realizada de 24 horas e 7 dias após o desenvolvimento observou-se uma menor variação dos resultados de tamanho de partícula, com 57,16 nm de variação. Já o IPD variou de 0,422 a 0,267, respectivamente.

4.4 OTIMIZAÇÃO DA SOLUÇÃO MICELAR POR DESENHO EXPERIMENTAL FATORIAL

A partir dos resultados obtidos no teste anterior, foram escolhidas as melhores condições para o planejamento fatorial 3^3 , sendo estas condições um menor tamanho de partícula e IPD, maior concentração do fármaco na formulação. O planejamento fatorial é uma estratégia analítica útil e sua principal aplicação consiste na triagem das variáveis mais relevantes de um determinado sistema analítico.

Como no estudo realizado anteriormente foi verificado que as concentrações de extrato 0,5, 1,0 e 1,5%, permitiram obter formulações com parâmetros macro e microscópicos desejáveis, os estudos posteriores foram realizados utilizando concentrações dentro dessa faixa. Para o planejamento fatorial 3^2 , as concentrações de extrato testadas foram 1,0, 1,25 e 1,5%.

O planejamento fatorial 3^2 foi utilizado para avaliar a influência das diferentes concentrações de tensoativo (Poloxamer) e DMSO sobre o tamanho das partículas e o IPD. As concentrações de extrato foram mantidas constantes. É importante ressaltar que, nessa etapa o DMSO foi adicionado à formulação, pois, verificou-se que este auxilia na solubilização do

extrato. As variáveis tensoativo e DMSO foram avaliadas a três níveis descritos como mínimo (-), médio (0) e máximo (+), para ver a influência do Poloxamer e do DMSO em todas as concentrações e assim obter resultados conclusivos.

Desta forma, foram obtidas nove formulações para cada concentração de extrato. Os resultados encontram-se nas Tabelas 8, 9 e 10. Em relação às formulações que contém 1% de extrato, na leitura realizada de 24 horas observou-se uma maior variação dos resultados de tamanho de partícula, os quais variaram de 33,23 nm a 349,8 nm. Já o IPD variou de 0,236 a 0,434. Na leitura realizada de 7 dias após o desenvolvimento da formulação a variação do tamanho de partícula foi de 115,2 nm a 408,8 nm e a variação do IPD foi de 0,274 a 0,476.

Tabela 8 - Tamanho de partículas e IPD obtidos com o planejamento fatorial 3³ em formulações contendo 1%.

Matriz	Extrato (%)	Poloxamer (%)	DMSO (%)	Tamanho (nm) (Leitura 24hrs)	IPD (Leitura : 24hrs)	Tamanho (nm) (Leitura: 7 dias)	IPD (Leitura: 7 dias)
1	1	13	0	141,3± 14,90	0,236± 0,016	199,5± 50,84	0,291± 0,030
2	1	13	1	61,88± 14,98	0,242± 0,065	173,2± 25,52	0,300± 0,011
3	1	13	2	99,46± 48,72	0,299± 0,039	272,0± 44,04	0,356± 0,017
4	1	14	0	287,9± 91,43	0,371± 0,074	205,7± 41,41	0,368± 0,085
5	1	14	1	163,5± 37,99	0,259± 0,021	260,5± 144,9	0,476+ 0,289
6	1	14	2	349,8± 168,7	0,434± 0,152	408,8± 131,2	0,468± 0,134
7	1	15	0	33,23± 6,972	0,312± 0,116	121,9± 36,59	0,339± 0,079
8	1	15	1	125,6± 31,89	0,339± 0,098	127,9± 35,60	0,353± 0,058
9	1	15	2	61,59± 33,55	0,340± 0,131	115,2± 21,23	0,274± 0,033

As formulações contendo 1,25% de extrato, apresentaram na leitura realizada de 24 horas tamanho de partícula que variaram de 27,94 nm a 175,0 nm. Já o IPD variou de 0,155 a 0,461. Na leitura realizada de 7 dias após o desenvolvimento da formulação a variação do tamanho de partícula foi de 31,51 nm a 407,1 nm e a variação do IPD foi de 0,278 a 0,468.

Tabela 9 - Tamanho de partículas e IPD obtidos com o planejamento fatorial 3³ em formulações contendo 1,25%.

Matriz	Extrato (%)	Poloxamer (%)	DMSO (%)	Tamanho (nm) (Leitura 24hrs)	IPD (Leitura: 24hrs)	Tamanho (nm) (Leitura: 7 dias)	IPD (Leitura: 7 dias)
1	1,25	13	0	54,80± 6,719	0,460±0,105	100,1± 9,097	0,305± 0,056
2	1,25	13	1	108,1± 61,68	0,271±0,065	261,7± 68,18	0,468± 0,048
3	1,25	13	2	175,0± 30,98	0,412±0,247	407,1± 23,70	0,462± 0,022
4	1,25	14	0	58,71± 20,16	0,266±0,093	259,4± 71,91	0,383± 0,043
5	1,25	14	1	48,73± 11,47	0,461±0,170	134,1± 28,41	0,307± 0,039
6	1,25	14	2	64,78± 26,56	0,356±0,211	75,07± 44,46	0,314± 0,180
7	1,25	15	0	114,3± 24,10	0,222±0,029	34,01± 4,887	0,406± 0,145
8	1,25	15	1	45,15± 10,95	0,155±0,044	31,51± 6,497	0,300± 0,124
9	1,25	15	2	27,94± 5,315	0,273±0,131	80,0± 33,56	0,278± 0,023

Entretanto, as formulações contendo 1,5% de extrato, apresentaram na leitura realizada de 24 horas tamanho de partícula que variaram de 42,58 nm a 188,2 nm. Já o IPD variou de 0,153 a 0,279. Na leitura realizada de 7 dias após o desenvolvimento da formulação a variação do tamanho de partícula foi de 24,40 nm a 153,6 nm e a variação do IPD foi de 0,177 a 0,333.

Tabela 10 - Tamanho de partículas e IPD obtidos com o planejamento fatorial 3³ em formulações contendo 1,5%.

Matriz	Extrato (%)	Poloxamer (%)	DMSO (%)	Tamanho (nm) (Leitura 24hrs)	IPD (Leitura: 24hrs)	Tamanho (nm) (Leitura: 7 dias)	IPD (Leitura: 7 dias)
1	1,5	13	0	63,79± 22,99	0,244± 0,035	152,0± 49,42	0,333± 0,122
2	1,5	13	1	106,3± 87,79	0,202± 0,052	51,84± 17,30	0,217± 0,049
3	1,5	13	2	56,96± 29,33	0,205± 0,050	24,40± 6,056	0,314± 0,083
4	1,5	14	0	188,2± 170,4	0,279± 0,150	132,0± 80,67	0,228± 0,019

5	1,5	14	1	42,58± 12,61	0,227± 0,117	29,98± 4,071	0,297± 0,136
6	1,5	14	2	103,1± 20,48	0,153± 0,017	64,72± 58,33	0,295± 0,151
7	1,5	15	0	56,31± 7,128	0,182± 0,037	58,37± 16,72	0,198± 0,013
8	1,5	15	1	117,8± 124,2	0,202± 0,099	153,6± 114,1	0,224± 0,093
9	1,5	15	2	83,20± 32,56	0,223± 0,048	77,71± 11,25	0,177± 0,026

Os resultados de tamanho de partícula e IPD obtidos nas leituras realizadas de 24 horas e 7 dias após o desenvolvimento da formulação, foram submetidos ao software Minitab o qual por meio de análise estatística identifica a combinação das variáveis que produz a melhor resposta dentro da faixa desejada (menor tamanho de partícula e IPD). Dentre as formulações que contém 1% de extrato, a que apresentou o melhor resultado dentro dos parâmetros estabelecidos é a formada por 13% de poloxamer e 0% de DMSO. Em relação às formulações que contém 1, 25% de extrato, a que apresentou o melhor resultado dentro dos parâmetros estabelecidos é a formada por 15% de poloxamer e 1% de DMSO. E dentre as formulações que contém 1,5% de extrato, a que apresentou o melhor resultado dentro dos parâmetros estabelecidos é a formada por 15% de poloxamer e 2% de DMSO.

Porém, para prosseguir com os demais experimentos foi escolhida apenas uma formulação. Ao realizar a análise comparativa no software Minitab entre as 27 formulações estudadas, ou seja, entre todas as formulações, a formulação constituída por 1,5% de extrato, 15% de poloxamer e 2% de DMSO é a que apresentou, dentre todas as formulações, o melhor resultado dentro dos parâmetros estabelecidos, portanto, foi a formulação final escolhida.

4.5 OBTENÇÃO DA FORMULAÇÃO: HIDROGEL

O hidrogel foi obtido a partir da formulação com 1,5% de extrato, 15% de poloxamer e 2% de DMSO, desenvolvida anteriormente e consistiu apenas no aumento da concentração de Poloxamer. O estudo realizado anteriormente demonstrou que, maiores concentrações de tensoativo não promovem aumento significativo de tamanho de partícula e IPD quando comparado às formulações que possuem menores concentrações. Desta forma, não foi realizado um novo delineamento experimental para a obtenção do hidrogel, visto que o objetivo desta etapa foi apenas aprimorar a formulação desenvolvida anteriormente, considerando um ponto de gelificação ideal, em que a formulação se apresentasse no estado líquido à temperatura

ambiente, e quando em contato com a pele, se tornasse gelificada. O tamanho de partícula e IPD foram medidos nos tempos 24 horas e 7 dias após a obtenção dos hidrogéis. Os resultados estão demonstrados na Tabela 11.

A concentração 18% de Poloxamer proporcionou a formação do hidrogel à temperatura de 32°C, temperatura que mais se aproximou da temperatura alvo (35°C). Em relação às demais concentrações de poloxamer testadas, estas gelificaram a uma temperatura muito abaixo (19, 20 e 21%) ou muito acima da temperatura alvo (15, 16 e 17%).

Tabela 11 - Parâmetros avaliados no desenvolvimento do hidrogel.

Poloxamer (%)	Leitura 24h		Leitura 7dias		Temperatura de solidificação		
	Tamanho (nm)	IPD	Tamanho (nm)	IPD	24°C	32°C	36°C
15	139,6± 2,873	0,463± 0,081	138,2± 1,716	0,434± 0,058	Líquido	Líquido	Líquido
16	129,2± 17,52	0,239± 0,043	79,69± 4,433	0,346± 0,028	Líquido	Líquido	Líquido
17	191,5± 2,49	0,343± 0,064	234,6± 5,209	0,362± 0,067	Líquido	Líquido	Líquido
18	180,8± 5,28	0,337± 0,026	191,8± 11,74	0,345± 0,026	Líquido	Gelificado	Gelificado
19	152,0± 28,03	0,333± 0,045	135,4± 47,99	0,259± 0,025	Gelificado	Gelificado	Gelificado
20	152,6± 18,02	0,339± 0,066	168,5± 64,18	0,312± 0,051	Gelificado	Gelificado	Gelificado
21	209,3± 5,41	0,296± 0,041	260,1± 105,4	0,353± 0,078	Gelificado	Gelificado	Gelificado

A partir dos resultados obtidos, podemos observar a importância de estudos de encapsulação de extrato vegetal em sistemas nanoestruturados, sendo possível disponibilizar no mercado novos medicamentos que possuam alta tecnologia, eficácia e segurança em um único produto. Além do que, a procura por produtos naturais está aumentando no país, pois os consumidores estão se preocupando mais com a sua saúde e bem estar, com isso um estudo que traz inovação na área de medicamentos fitoterápicos proporciona ao paciente um produto com mais benefícios à saúde.

No caso do desenvolvimento dessa formulação micelar foram necessárias muitas etapas e inúmeros testes até chegar no produto final com concentração adequada de princípio ativo e com características pré-definidas para facilitar sua aplicação. Para realizar no planejamento

experimental foi utilizado o software MiniTab que permite avaliar a significância estatística das variáveis em estudo, bem como os efeitos de interação entre elas. Além disso, permite diminuir o número de experimentos a serem executados, o tempo e o consumo de reagente (FERREIRA *et al.*, 2007).

Na Tabela 11 foi possível observar que o aumento da temperatura leva à gelificação da formulação e conseqüentemente maior facilidade de aplicação via tópica. Já a diminuição da temperatura diminui a viscosidade, levando a alterações macroscópicas, mas que não interferem na estabilidade do sistema.

Segundo UR-REHMANA e colaboradores, a temperatura de gelificação que foi encontrada está relacionada com os componentes desta formulação, pois o uso de poloxamer e DMSO colaboraram para obter um gel à temperatura corporal, uma vez que em baixas concentrações, o DMSO influencia a micelização e gelificação do poloxamer de uma forma dependente da concentração e reduz a temperatura na qual as micelas e os géis são formados. E o poloxamer proporciona a formulação um processo reversível, ou seja, os géis voltam a soluções de fluxo livre quando a temperatura cai (UR-REHMANA, *et al.*, 2010).

O DMSO pode ser utilizado em baixas concentrações ($\leq 5\%$) sem apresentar riscos e em contato com o gel de poloxamer, este apresenta efeitos menores na dissolução e no perfil de liberação do tensoativo, dessa forma contribui para a terapêutica, pois facilita o tratamento e a quantidade de aplicação, além de não afetar a termo-reversibilidade do poloxamer (UR-REHMANA, *et al.*, 2010).

4.6 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DA FORMULAÇÃO

4.6.1 Teste de centrifugação

O hidrogel obtido, com 18% de Poloxamer, como demonstrado na tabela 10, foi submetido ao teste de centrifugação em triplicata com 1,5 ml de amostra em tubos de microcentrífuga e centrifugados à 3000 rpm por 30 minutos com o intuito de avaliar a estabilidade da formulação, pois não pode haver separação de fases e caso aprovado neste teste, o produto poderá ser submetido ao teste de estabilidade acelerada (DECCACHE, 2006).

Figura 6 – Formulação antes do teste de centrifugação.



Figura 7 – Formulação depois do teste de centrifugação.



A formulação desenvolvida permaneceu estável e íntegra, como observado nas figuras 6 e 7, portanto foi possível dar continuidade aos testes e não sendo necessária a reformulação da mesma.

4.6.2 Estabilidade preliminar

A formulação final foi submetida ao estudo de estabilidade preliminar ou triagem, seguindo os parâmetros descritos no Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos (ANVISA, 2004), com modificações. Este teste tem como objetivo acelerar o surgimento de possíveis sinais de instabilidade em condições forçadas e não pode ser utilizado para estimar a validade do produto (MUNHOZ, A.J., *et al.*, 2021).

Este teste teve duração de 12 dias e o hidrogel foi submetido, em triplicata, a condições de estresse, sendo 6 ciclos de 24 horas alternados de resfriamento ($5^{\circ}\text{C} \pm 2$) em refrigerador e aquecimento ($40^{\circ}\text{C} \pm 2$) em estufa.

Na tabela 12 podemos observar as alterações presenciadas nos dias 0, 6° e 12° do teste.

Tabela 12 – Parâmetros avaliados no teste de estabilidade preliminar do hidrogel.

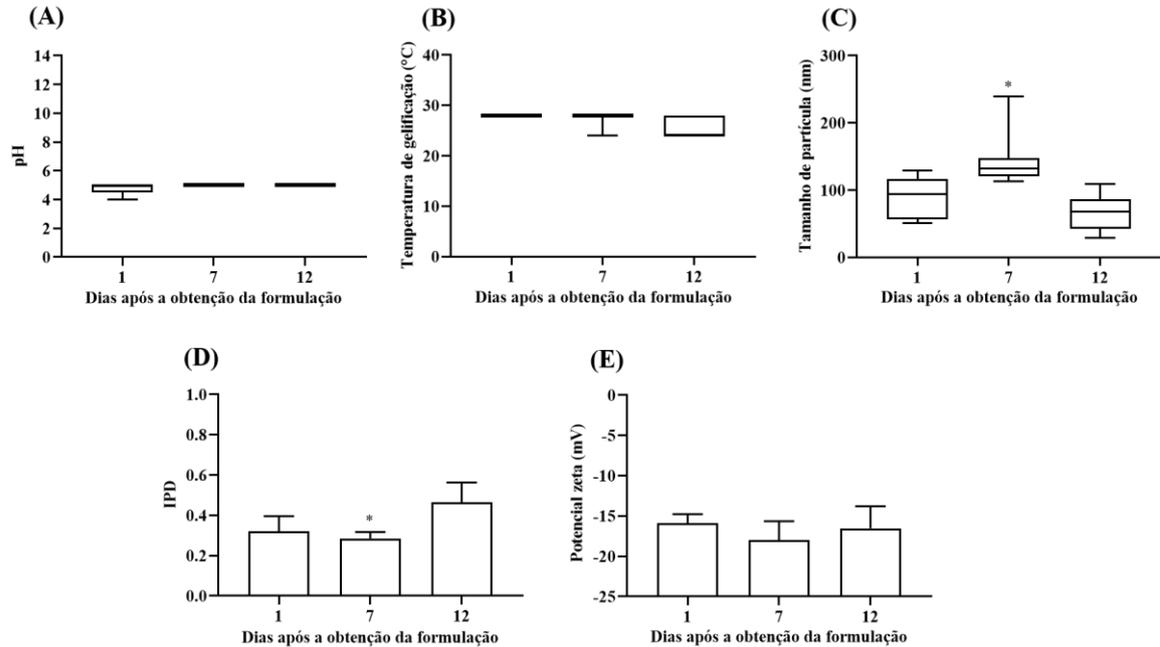
Leitura	Análises	TRIPLICATA 1			TRIPLICATA 2			TRIPLICATA 3		
		TP1.1	TP1.2	TP1.3	TP2.1	TP2.2	TP2.3	TP3.1	TP3.2	TP3.3
24h	Aspectos visuais	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	pH	5,00	4,00	5,00	5,00	4,00	5,00	5,0	5,0	5,0
	Temperatura de solidificação	28°C								
	Tamanho de partícula	118,1 ± 65,92	114,5 ± 84,14	61,69 ± 56,29	94,27 ± 82,54	51,33 ± 4,62	50,73 ± 34,53	129,6 ± 114,4	90,20 ± 55,83	108,8 ± 72,49
	IPD	0,273 ± 0,076	0,285 ± 0,067	0,329 ± 0,064	0,446 ± 0,195	0,447 ± 0,069	0,272 ± 0,104	0,282 ± 0,066	0,310 ± 0,141	0,239 ± 0,056
	Potencial zeta	-15,6 ± 5,48	-15,0 ± 3,48	-18,1 ± 5,32	-14,6 ± 6,84	-16,20 ± 0,04	-15,6 ± 0,8	-17,1 ± 3,65	-14,9 ± 1,21	-16,1 ± 34
7 dias	Aspectos visuais	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	pH	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Temperatura de solidificação	28°C								
	Tamanho de partícula	154,8 ± 69,67	239,8 ± 172,1	132,2 ± 66,94	120,4 ± 48,74	113,4 ± 14,84	134,7 ± 35,09	123,6 ± 34,45	121,6 ± 12,43	141,6 ± 34,31
	IPD	0,301 ± 0,046	0,334 ± 0,151	0,298 ± 0,101	0,288 ± 0,072	0,236 ± 0,020	0,238 ± 0,067	0,308 ± 0,047	0,262 ± 0,054	0,301 ± 0,044
	Potencial zeta	-16,1 ± 2,01	-13,1 ± 2,10	-18,9 ± 2,10	-20,2 ± 5,06	-20,4 ± 3,48	-19,1 ± 3,33	-16,9 ± 6,30	-19,1 ± 0,462	-17,9 ± 3,65
12 dias	Aspectos visuais	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	pH	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Temperatura de solidificação	28°C								
	Tamanho de partícula	43,05 ± 4,257	28,79 ± 1,921	82,97 ± 51,55	76,10 ± 7,387	108,9 ± 103,0	90,16 ± 31,19	68,16 ± 22,17	42,59 ± 1,662	68,04 ± 14,14
	IPD	0,533 ± 0,013	0,511 ± 0,087	0,413 ± 0,165	0,434 ± 0,013	0,256 ± 0,096	0,483 ± 0,163	0,563 ± 0,135	0,569 ± 0,088	0,420 ± 0,161
	Potencial zeta	-15 ± 3,13	-18,3 ± 12,5	-21,7 ± 9,95	-18,6 ± 9,15	-17,0 ± 7,14	-16,1 ± 0,306	-13,1 ± 3,44	-13,2 ± 3,27	-15,7 ± 5,44

N: Normal; IPD: Índice de polidispersão.

Não foram observadas diferenças significativas entre os valores de pH (Figura 8.A), temperatura de gelificação (Figura 8.B) e potencial zeta (Figura 8.E) das formulações nos três

tempos de análise (1°, 7° e 12° dia). O tamanho de partícula (Figura 8.C) no 7° dia de análise é significativamente maior quando comparado ao valor médio encontrado no 12° dia. Em relação ao IPD (Figura 8.D), o valor médio encontrado no 7° dia de análise é significativamente menor quando comparado ao valor encontrado no 12° dia.

Figura 8 - pH (A), temperatura de gelificação (B), tamanho de partícula (C), IPD (D) e potencial zeta (E) da formulação no estudo de estabilidade preliminar.



Resultados expressos como média \pm erro padrão para os dados paramétricos e como mediana para dados não paramétricos. * Diferença significativa em relação ao 12° dia.

Os dias em que foram realizadas as análises e leitura da amostra a mesma se encontrava em geladeira em resfriamento de $5^{\circ}\text{C} \pm 2$ e após as análises estas seriam submetidas a estufa à $40^{\circ}\text{C} \pm 2$. Portanto, em todos os dias de análise as amostras se encontravam sob as mesmas condições, porém foram notadas alterações em parâmetros como tamanho de partícula, IPD e potencial zeta, pois esta é uma formulação micelar caracterizada por ser um sistema dinâmico.

Durante esse processo de aquecimento e resfriamento as moléculas vão sofrendo alterações, uma vez que em temperaturas mais altas a água presente no meio se volatiliza, e sendo esta uma formulação de base aquosa a mesma se torna mais viscosa, por conta da perda de água e pela atração entre as cadeias hidrofóbicas.

As características organolépticas durante os 12 dias não se alteraram muito, foram observadas pequenas modificações na viscosidade quando esta estava armazenada em alta temperatura. Segundo Ferreira (2019), pequenas alterações, quando submetida a temperaturas

elevadas, são aceitas. As formulações testadas acima apresentaram aspecto estável macroscopicamente.

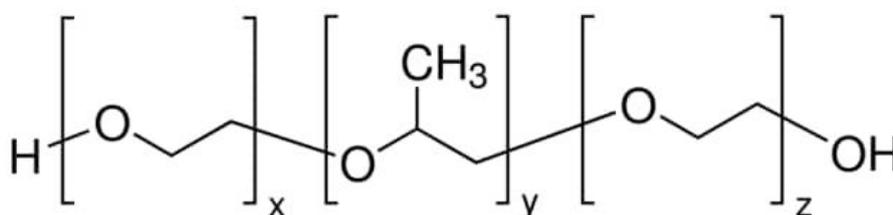
O valor de pH é importante ser analisado, pois seu valor deve estar compatível com a administração cutânea, uma vez que a formulação desenvolvida é um hidrogel de uso tópico. Durante o estudo de estabilidade, o pH da formulação se manteve levemente ácido (pH 5,0). O pH cutâneo é em média de 5,0 a 5,5 e para uma boa administração na pele o pH da formulação deve ser compatível (DE MELO, M.O., *et al.*, 2016). O pH no presente trabalho foi lido com tiras indicadoras de pH (papel de tornassol), portanto a primeira casa decimal não foi possível determinar, mas o pH da solução se mostrou dentro do valor ideal e compatível para a administração do hidrogel (ALMEIDA, J.S., *et al.*, 2010).

A temperatura de solidificação se manteve constante, e isso é importante, pois demonstra que a formulação passou do estado de sistema micelar para hidrogel, e o objetivo era obter uma formulação que em temperatura ambiente se encontrava em forma de solução, para facilitar a administração. E em contato com a pele formaria uma camada mais espessa, forma de hidrogel, para que não ocorra a perda de amostra.

A figura 8 se refere ao polímero utilizado para no desenvolvimento da formulação. Este polímero apresenta alterações relacionadas a temperatura de armazenamento, pois em temperaturas baixas ou até a temperatura ambiente, este se apresenta na forma de solução, porém em temperatura mais altas, como a temperatura corporal, este apresenta transição para a forma hidrogel. Isso ocorre pois, a uma temperatura mais baixa e em base aquosa, um filme de hidratação envolve as moléculas do poloxamer, tornando-o solúvel a frio, porém com o aquecimento, essa estrutura, que apresenta características hidrofílicas e hidrofóbicas, aproxima as partes hidrofóbicas e as mesmas se agregam e ficam circundadas pelas extremidades hidrofílicas da cadeia (DEWAN *et al.*, 2015).

Os parâmetros de tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta estão intimamente relacionados a essa mudança de característica do polímero em detrimento da temperatura de armazenamento.

Figura 9 - Estrutura química do Poloxamer 407



Fonte: Sigma – Aldrich

O tamanho de partícula mede o diâmetro das moléculas presentes na formulação, e para o produto desenvolvido neste trabalho, por ser um sistema micelar, foi definido um tamanho em escala nanométrica, por serem mais fáceis de atravessar as barreiras celulares, devido ao seu menor diâmetro, o que contribui para a administração tópica e a absorção do fármaco. Para partículas em escala nanométrica, o ideal é que apresentem diâmetro médio de partícula de 300 nm (MAIA, G. A. R, *et. al.*, 2016). De acordo com a tabela 12, os diâmetros obtidos variaram entre 43 – 240 nm. Houve uma variação considerável, porém nas leituras de cada dia, não ocorreu uma variação tão significativa.

De acordo com Maia (2016), os valores obtidos encontram-se abaixo do valor especificado para escala nanométrica, porém esta é uma formulação com potencial antibacteriano e o ideal é que a derme consiga absorver o fármaco para garantir que a ação antimicrobiana seja exercida, portanto valores menores são aceitáveis neste caso, podendo variar de 100 – 500 nm, uma vez que valores muito abaixo podem favorecer que o fármaco atravesse as barreiras celulares facilmente e não exerça a ação tópica adequadamente.

Índice de polidispersão é um parâmetro que descreve o quanto o diâmetro da partícula está variando em populações. Valores altos de IPD indicam uma formulação heterogênea, com grande variação de populações de tamanhos diferentes em suspensão (SOUZA, P.M.S., *et al.*, 2012). Essa variação do diâmetro das partículas não é benéfica para a formulação, pois não a torna reprodutível para produção, por não garantir atividade terapêutica e biológica igual, uma vez que tamanhos maiores de partículas não apresentam o mesmo grau de absorção cutânea que valores menores. Valores de IPD mais próximos a 0 indicam populações monodispersas, enquanto valores mais próximos de 1 demonstram ampla variação de populações (SOUZA, P.M.S., *et al.*, 2012). Na literatura muitos autores relatam que índices de polidispersão inferiores a 0,2 sugerem uma estreita distribuição do diâmetro das partículas, porém Raquel (2017) em seu estudo relata que $IPD \leq 0,5$ indica uma pequena faixa de distribuição de diâmetros das partículas e como observado na tabela 12, os valores de IPD variaram de 0,236 a 0,569, portanto estão, em sua maioria, entre a faixa para populações monodispersas.

O potencial zeta de sistemas nanométricos depende principalmente da natureza química do polímero, do estabilizador e do pH do meio (MORA-HUERTAS, C. E., *et. al.*, 2009). Este parâmetro sugere a carga superficial da molécula, como a micela neste estudo. É um potencial elétrico que é definido a partir da superfície de cisalhamento da partícula e pode ser utilizado para mensurar a carga da partícula e sua repulsão eletrostática. É um parâmetro indireto da

estabilidade da suspensão. Um bom potencial zeta deve se apresentar entre -30 e 30 mV (LAKSHMI, K., 2010). Quanto maior a carga, positiva ou negativa, mais estável será a micela, por conta da maior repulsão entre uma partícula e outra. O quanto menor este valor e mais próximo de 1, maior a chance do sistema se coalescer e as moléculas se agruparem. Formulações com valores maiores (menos negativos), indicam estabilidade menor do sistema, pois haverá menor repulsão entre as nanopartículas, e maior probabilidade de agregação (MORA-HUERTAS, C. E., *et. al.*, 2009). Os valores obtidos com as leituras da formulação desenvolvida neste trabalho variaram entre - 13,1 e - 21,7 mV, dessa forma é possível verificar que apresentam boa estabilidade, pois tem valor moderado referente ao potencial de agregação, e conseguem manter repulsão entre as moléculas deste sistema de forma que se mantem distantes para não ocorrer coalescência entre as mesmas.

4.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA POR MICRODILUIÇÃO EM CALDO

Para a realização da atividade antimicrobiana foi utilizado o método de microdiluição em caldo com o extrato e a formulação das folhas de *P. spruceanum*. Este teste é de extrema importância para a pesquisa de novos agentes que possuem potencial antimicrobiano, para possibilitar novas oportunidades farmacológicas por conta da resistência, cada vez maior, de microrganismos às infecções.

Na tabela 13 está representado o esquema de organização da microplaca de 96 poços.

Tabela 13 - Organização das diluições do extrato, formulação e controles na microplaca de 96 poços.

	Extrato						Formulação					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	100 mg/mL			0,39 mg/mL*			500 µg/mL*			1,95 µg/mL*		
B	50mg/mL			0,20 mg/mL*			250 µg/mL*			0,98 µg/mL*		
C	25 mg/mL			0,098 mg/mL*			125 µg/mL*			0,49 µg/mL*		
D	12,5 mg/mL			0,049 mg/mL*			62,5 µg/mL*			0,24 µg/mL*		
E	6,25 mg/mL			/			31,25 µg/mL*			Controle de Crescimento*		
F	3,13 mg/mL						15,63 µg/mL*			Controle de DMSO*		
G	1,56 mg/mL						7,81 µg/mL*			Controle de Antibiótico		
H	0,78 mg/mL						3,90 µg/mL*			Controle do Meio		

*Presença de crescimento microbiano.

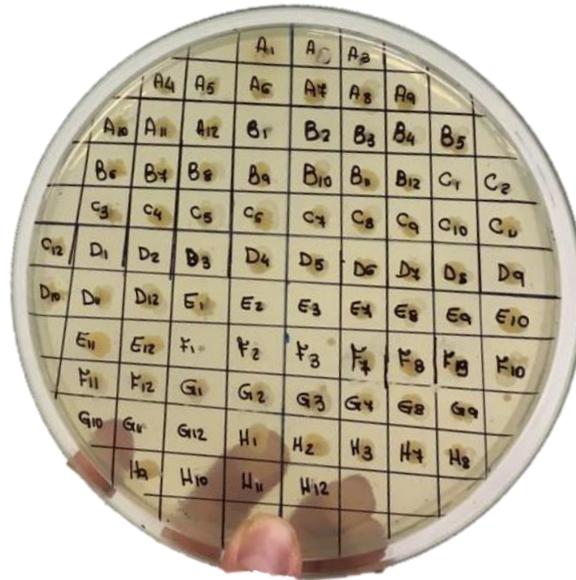
Esta microplaca com o extrato, formulações e controles foi incubada por 24 horas à $37^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ em estufa, e foi observado crescimento bacteriano nos campos representados na tabela acima. Com estes resultados, foi preparada uma placa de Petri com ágar Mueller Hinton. Esta placa foi perfurada em pequenos orifícios e inoculada com as suspensões referente a cada poço da placa de 96 poços, contendo 50 μl das soluções das amostras. Esta placa de Petri foi incubada por 24 horas em estufa a $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Finalizado o período de incubação foi possível observar a concentração em que não houve crescimento bacteriano (CIM). Este determina a menor quantidade de substância necessária para inibir o crescimento do microrganismo, já a concentração bactericida mínima (CBM), determina a concentração mínima de princípio ativo capaz de matar as bactérias. Com esses parâmetros é possível constatar se foi obtido o resultado esperado com o extrato e a formulação.

Para extrato a CIM foi observada na concentração de 0,78 mg/ml, poço H1, H2 e H3, pois foi a concentração mínima em que não houve crescimento na microplaca, porém na placa de Petri houve crescimento, ou seja, as bactérias não morreram, o que ocorreu foi uma inibição do crescimento. Portanto nesta concentração foi observada atividade bacteriostática, porém não bactericida. Já nos poços F1, F2 e F3, obteve-se a CBM, pois esta foi a concentração mínima em que não houve crescimento na placa de Elisa e isso se manteve na placa de Petri após as 24 horas de incubação.

Para a formulação, houve crescimento bacteriano na placa de Petri desde a concentração de 500 $\mu\text{g/ml}$, poços A7, A8, A9. Portanto, tanto a atividade bacteriostática quanto atividade bactericida não foi observada nas concentrações testadas para a bactéria *Staphylococcus aureus*, assim deveria se testar concentrações maiores de extrato para evidenciar atividade antibacteriana, e isto pode ser explicado pela dificuldade em se incorporar o extrato a formulação sem perda significativa da eficácia na atividade terapêutica, já que o objetivo de se desenvolver formulações a partir de extratos é obter uma eficácia de encapsulação satisfatória, uma vez que este produto será útil quando estiver presente nele uma quantidade terapêutica do fármaco encapsulado (DIOGO, R.A., 2021).

Figura 10 - Representação do crescimento bacteriano dos poços da placa de Elisa na placa de Petri.



5 CONCLUSÃO

Foi possível desenvolver uma formulação micelar, com características desejáveis, a partir do poloxamer utilizando como ativo o extrato etanólico bruto de *P. spruceanum*. A mesma apresentou características organolépticas apropriadas, valores de pH, tamanho de partícula, IPD e potencial zeta aceitáveis.

A formulação não apresentou atividade bacteriostática quanto bactericida contra o microrganismo avaliado. No entanto, outras atividades são relatadas nos extratos de *P. spruceanum*, como atividade cicatrizante e anti-inflamatória, dessa forma a formulação ainda apresenta atividades relevantes para o seu uso.

Sugere-se que esse resultado é devido à dificuldade em se manter a mesma atividade do extrato ao encapsular o mesmo, ou seja, obter uma eficácia de incorporação satisfatória em que seja vantajoso a produção da formulação. No entanto, o extrato apresenta outros benefícios terapêuticos com potencial atividade anti-inflamatória, antioxidante e cicatrizante, o que a torna promissora e favorável para próximos estudos.

REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Farmacopéia Brasileira**. 2010. 545 f. Governo Federal. volume 1. 5ª Ed. Brasília: ANVISA, 2010.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC N° 26, de 13 de maio de 2014**. Governo Federal. Brasília: ANVISA, 2014.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. 2004. 34 f. **Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos**. Governo Federal. 1ª Ed. Brasília: ANVISA, 2004.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Medicamentos fitoterápicos e plantas medicinais**. 2020. Governo Federal. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/medicamentos/fitoterapicos> acesso em: 21 de maio de 2021.
- ALMEIDA, J. S. *et al.* **Formulações nanoestruturadas contendo rutina: desenvolvimento, atividade antioxidante in vitro e efeito sobre a cicatrização cutânea**. 2010. 139 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.
- AMPARO, T. R. **Análise fitoquímica e bioprospecção para atividade antimicrobiana de *Protium spruceanum* (Benth.) Engler**. 2016. 151 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2016.
- AMPARO, T. R. **Avaliação in vitro do potencial de *Protium spruceanum* (Benth.) Engler para tratamento de infecções de pele e tecidos moles**. 2018. 132 f. Dissertação (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2018.
- AMPARO, T. R. *et al.* **Antibacterial activity of extract and fractions from branches of *Protium spruceanum* and cytotoxicity on fibroblasts**. *Natural Product Research, Minas Gerais*, v. 32, p. 34-43, 2017.
- BORGES, W. DE S. *et al.* **A Química de Produtos Naturais do Brasil no Século XXI**. *Química Nova*, v. 40, p. 706-710, 2017.
- BRASIL, M. C. O. *et al.* **Essential Oil Content and Composition of Almescla Resin (*Protium spruceanum* (Benth.) Engl., Burseraceae)**. *Journal of Agricultural Science*, v. 10, p. 442-450, 2018.
- CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition**. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012.

CONTRI, R.V. **Incorporação de nanocápsulas contendo capsaicinóides em hidrogel de quitosana destinado ao uso tópico: caracterização das formulações e estudo de liberação *in vitro***. 2020. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

CORRALES, F, V. *et al.* **Síntesis y estudio de hidrogeles de acrilamida/ácido metacrílico y su aplicación en la liberación de fármacos**. El Hombre y la Máquina, p.100-107, 2006.

DECCACHE, D. S. **Formulação dermocosmética contendo DMAE glicolato e filtros solares: desenvolvimento de metodologia analítica, estudo de estabilidade e ensaio de biometria cutânea**. 2006. 152f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro.

DE LARA, A. C. *et al.* **Avaliação do consumo de produtos naturais por usuários de estratégias de saúde da família do município de Rondonópolis – MT**. Revista Univap, v. 25, p. 98-109, 2019.

DE MELO, M. O.; CAMPOS, P. M. M. **Função de barreira da pele e pH cutâneo**. Cosmetics & Toiletr. v. 28, p. 5, 2016.

DEWAN, M. *et al.* **Effect of methyl cellulose on gelation behavior and drug release from P based ophthalmic formulations**. International Journal of Biological Macromolecules, v. 72, p. 706–710, 2015.

DIOGO, R. A. C. *et al.* **Atividade antimicrobiana in vitro da ceftriaxona encapsulada em lipossomas contra estirpes clínicas isoladas de animais de companhia com diagnóstico de infecção do trato urinário**. 2021. 101f. Tese (Doutorado em Faculdade de Medicina Veterinária) - Universidade de Lisboa, Lisboa, 2021.

DORADO, I. S. **Hidrogeles para la Liberación sostenida de fármacos**. 2018. 79 f. Monografia (Graduação em Farmácia - Faculdade de Farmácia), Universidade Complutense, Madrid, 2018.

FERREIRA, E. **Desenvolvimento e avaliação de hidrogel baseado em poloxamer-quitosana contendo eugenol para aplicação na mucosa bucal**. 2019. 75f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2019.

FUNDAÇÃO ARAUCÁRIA. **Brasil detém segunda maior base de dados de produtos naturais**. Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo. FAPESP, 2020. Disponível em: <<https://agencia.fapesp.br/brasil-detem-segunda-maior-base-de-dados-de-produtos-naturais/32549/>> acesso em:27 de maio de 2021.

GEROLA, A. P. **Estudos fotofísicos e fotodinâmicos da clorofila a e derivados formulados em micelas poliméricas e lipossomos**. 2013. 144 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2013.

GONÇALVES, L. A. **Desenvolvimento de formulações nanoestruturadas contendo fração acetato etilênica de galhos de *Protium spruceanum* e avaliação da atividade antimicrobiana**. 2017. 60 f. Monografia (Graduação em Farmácia) - Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2017.

GRIMALDI, N. *et al.* **Lipid-based nanovesicles for nanomedicine.** Chemical Society Reviews, v. 45, p. 6520–6545, 2016.

GUIA IGAPÓ. **Burseraceae – *Protium spruceanum*.** Floresta do Rio Negro. Disponível em: <http://ecologia.ib.usp.br/guiaigapo/familias/burseraceae/protium_spruceanum/protium_spruceanum.html> acesso em: 23/07/2021

GUTERRES, S.S. *et al.* **Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules, for cutaneous application.** Drug Target Insights, v. 2, p. 147-157, 2007.

HAMIDI, M. *et al.* **Hidrogel nanoparticles in drug delivery.** Advanced Drug Delivery Reviews, v. 60, p. 1638-1649, 2008.

LAKSHMI, P. *et al.* **Nanosuspension technology: A review.** Int J Pharm Hydrogel Sci, v. 2, p. 35-40, 2010.

MAIA, G. A. R. *et al.* **Aperfeiçoamento da produção de partículas de óxido de zinco para aplicação em células solares.** Cerâmica, v. 62, p. 361, 2016.

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

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.

NICHELE, P.G. *et al.* **Bromatologia.** Porto Alegre: SAGAH, Grupo A, 2018. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#books/9788595027800>> acesso em: 23 de maio de 2021.

OMELCHENKO, A. A. *et al.* **Effects of nanoselenium as a nutrient medium component on the main cultivation parameters and antagonistic activity of lactobacillus.** 2021. Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology, v. 1, p. 125-134, 2021.

PEÑARANDA, A nano selenium. *et al.* **Hidrogeles. Potenciales biomateriales para la liberación controlada de medicamentos.** Revista Ingeniería Biomédica. 2009. Escuela de Ingeniería de Antioquia – Universidad CES, Medellín, v. 3, p. 83-94, 2009.

Poloxamer 407. Sigma-Aldrich. Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/product/sigma/16758>> acesso em: 03/05/2022.

PORTO, A. S., *et al.* **Nanoemulsões formuladas para uso tópico: estudo de síntese e toxicidade.** Revista Fitos, v. 4, p. 513-527, 2020.

RASCHE, W. D. **Formulação e análise de gel-creme hidratante facial.** 2014. 19 f. Monografia (Técnico em Química) – Centro Universitário UNIVATES, Lajeado, 2014.

RAMOS, Y. J. *et al.* **Obtenção e avaliação de sistemas micelares contendo extrato de frutos do oiti (*Licania tomentosa* (Benth.) Fritsch).** Revista Fitos. v. 14, p. 88-102, 2020.

REN, H. *et al.* **Efficient Pb (II) removal using sodium alginate–carboxymethyl cellulose gel beads: Preparation, characterization, and adsorption mechanism.** Carbohydrate Polymers, v. 135, p. 402-409, 2020.

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

RITTES, J. C. *et al.* **Avaliação comparativa do propofol em nanoemulsão com solutol e com lecitina de soja para anestesia geral.** Brazilian Journal of Anesthesiology, v. 3, p. 225-230, 2013.

Sabões e detergentes. **Laboratório de Química dos Elementos.** Universidade Federal de Juiz de Fora, 2017. Disponível em: <https://www.ufjf.br/quimica/files/2015/10/LABORAT%20RIO-DE-QU%20MICA-DOS-ELEMENTOS-QUI081-2017-SAB%20ES-E-DETERGENTES-1.pdf> acesso em: 23/07/2021.

SANTOS, J. T. M. **Estudo da interação de fármacos em sistemas micelares formados por tween 80 por espalhamento de raios X a baixo ângulo.** 2017. 83f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2017.

SHAO, M. *et al.* **Drug nanocarrier, the future of atopic diseases: Advanced drug delivery systems and smart management of disease.** Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, v. 147, p. 475-491, 2016.

SILVA, K. F. D. *et al.* **A importância das divulgações e aproximações conceituais para o ensino da nanotecnologia: Uma revisão narrativa.** Editora Científica, v. 1, p. 227-239, 2015

SVENT–KUCINA, N. *et al.* **Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from skin and soft tissue infections samples and healthy carriers in the Central Slovenia region.** Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica, v. 1, p.107-119, 2016.

ZENI, A. L. B. *et al.* **Utilização de plantas medicinais como remédio caseiro na Atenção Primária em Blumenau, Santa Catarina, Brasil.** Ciência & Saúde Coletiva, v. 22, p.2703-2712, 2017.