



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
ESCOLA DE FARMÁCIA



**Desenvolvimento de uma formulação micelar contendo o extrato etanólico
bruto das folhas de *Melaleuca leucadendron* e avaliação da atividade
antimicrobiana**

JULIANA STÉFANI VASCONCELOS DA CRUZ

Ouro Preto - MG

2022

JULIANA STÉFANI VASCONCELOS DA CRUZ

**Desenvolvimento de uma formulação micelar contendo o extrato etanólico
bruto das folhas de *Melaleuca leucadendron* e avaliação da atividade
antimicrobiana**

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

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Henrique Bianco
de Souza

Co-orientadora: Ms. Viviane Flores Xavier

Ouro Preto – Minas Gerais – Brasil

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

C957d Cruz, Juliana Stefani Vasconcelos da.

Desenvolvimento de uma formulação micelar contendo o extrato etanólico bruto das folhas de Melaleuca leucadendron e avaliação da atividade antimicrobiana. [manuscrito] / Juliana Stefani Vasconcelos da Cruz. - 2022.

48 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. Química farmacêutica. 2. Produtos com ação antimicrobiana. 3. Hidrogéis. 4. Melaleuca. I. Souza, Gustavo Henrique Bianco de. II. Xavier, Viviane Flores. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU 615.45

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



FOLHA DE APROVAÇÃO

Juliana Stéfani Vasconcelos da Cruz

Desenvolvimento de uma formulação micelar contendo o extrato etanólico bruto das folhas de *Melaleuca leucadendron* 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 13 de junho de 2022.

Membros da banca

Prof. Dr. Gustavo Henrique Bianco de Souza - Orientador - Escola de Farmácia - UFOP
Ms. Viviane Flores Xavier - Biotecnologia - UFOP
Prof. Dr. Orlando David Henrique dos Santos - Escola de Farmácia - UFOP
Ms. Luciana Miranda Silva - 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 19/06/2022.



Documento assinado eletronicamente por **Gustavo Henrique Bianco de Souza, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 19/06/2022, às 13:49, 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 **0346514** e o código CRC **E233F318**.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço aos meus pais, por todo apoio, carinho, amor e incentivo, durante toda a trajetória deste trabalho.

À minha tia Margarida, que me acompanhou e ajudou durante toda minha graduação.

Ao meu irmão que foi motivo de toda saudade e incentivo durante esses anos.

Ao meu namorado, Fábio, pelo carinho, cuidado e incentivo, durante a realização desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Gustavo Henrique Bianco de Souza, pela oportunidade, por acreditar em mim, pela paciência e pelos conselhos nos momentos de dúvida.

À minha coorientadora Viviane Flores Xavier, pelos ensinamentos e paciência, por ter sido tão crucial no desenvolvimento desse trabalho, sem você nada disso seria possível, sou muito grata pelo que conseguimos desenvolver.

À minha amiga Débora, por ter dividido a bancada comigo, pelos momentos de conhecimento vividos juntas, muito obrigada por tudo.

À todos do Laboratório de Fitotecnologia da Escola de Farmácia, pelos conselhos e ensinamentos.

Um agradecimento especial ao Laboratório de Microbiologia da Escola de Farmácia e ao prof. Dr. Luiz Fernando Medeiros Teixeira, por participar, orientar e ajudar em uma etapa tão crucial desse trabalho.

À Isabelle por ter auxiliado e participado dos experimentos, muito obrigada pela paciência, apoio e disponibilidade para a realização dos ensaios.

Ao prof. Dr. Orlando David Henrique dos Santos, pelo suporte e conselhos durante a realização dos experimentos, você foi fundamental.

Aos meus amigos, Ravenna, Isa, Tamara, Lari, Ayron, Bárbara, Natie, Gabi e Mari por todos os conselhos e cada momento, guardarei vocês sempre em meu coração.

À Universidade Federal de Ouro Preto e à Escola de Farmácia, agradeço por todo conhecimento adquirido e todos esses anos de trajetória que puderam fazer de mim farmacêutica.

Por último, agradeço a todos aqui não mencionados, mas que de alguma forma fizeram parte da minha caminhada. Obrigada a todos!

RESUMO

A busca por medicamentos de origem natural cresce cada vez mais, e podem ser alternativas interessantes no tratamento de diversas infecções causadas por *Staphylococcus aureus*. Os hidrogéis a partir da nanotecnologia, podem levar a uma liberação mais controlada dos ativos presentes na planta *Melaleuca leucadendron*. A formulação micelar feita com diferentes concentrações de poloxamer e extrato, foi avaliada quanto ao tamanho de partícula e índice de polidispersão (IPD), e otimizada por meio de um desenho experimental fatorial onde o melhor valor de tamanho de partícula e IPD foi de 78,83 nm \pm 1,798 e 0,255 \pm 0,040, respectivamente. Um hidrogel contendo 18% de poloxamer foi produzido, obtendo consistência desejável perto da temperatura alvo (35 C°). Foram realizados testes de estabilidade por centrifugação, onde a formulação se manteve estável sem separação de fases, permitindo com que a amostra prosseguisse para o teste de estabilidade preliminar onde obteve valores satisfatórios quanto a tamanho de partícula, IPD e potencial zeta. A atividade antimicrobiana da formulação foi avaliada através do método de microdiluição em caldo, onde foi possível determinar a concentração inibitória mínima (CIM) da formulação (500 μ L/mL) e do extrato (1,56 mg/mL) para *Staphylococcus aureus*, e ainda, a concentração bactericida mínima (CBM), para o extrato (3,13 mg/mL). O estudo de formulações, bem como o emprego de matérias primas vegetais em sistema nanoestruturados corroboram para inovação na liberação controlada de fármacos antimicrobianos. Desse modo, o objetivo deste trabalho foi produzir uma formulação micelar contendo o extrato etanólico bruto (EEB) da planta, bem como avaliar sua atividade antimicrobiana.

Palavras-chave: Formulação; hidrogel; atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

The search for medicines of natural origin grows more and more, and they can be interesting alternatives in the treatment of various infections caused by *Staphylococcus aureus*. Hydrogels from nanotechnology can lead to a more controlled release of the actives present in the *Melaleuca leucadendron* plant. The micellar formulation made with different concentrations of poloxamer and extract was evaluated for particle size, and polydispersion index, and optimized by means of a factorial experimental design where the best value for particle size and polydispersion index (PI) was 78.83 nm and 0.255, respectively. A hydrogel containing 18% of poloxamer was produced, obtaining desirable consistency near the target temperature (35C°). Stability tests were performed by centrifugation, where the formulation remained stable without separation of phases, allowing the sample to proceed to the preliminary stability test, where it obtained satisfactory values for particle size, PI and zeta potential. The antimicrobial activity of the formulation was given by the broth microdilution method, where it was possible to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of the formulation (500 µL/mL) and of the extract (1.56 mg/mL) for *Staphylococcus aureus*, and still, the minimum bactericidal concentration (MBC) for the extract (3.13 mg/mL). The study of the formulation, as well as the use of plant raw materials in nanostructured systems, supports innovation in the controlled release of antimicrobial drugs. Thus, the objective of this work was to produce a micellar formulation containing the plant's crude ethanol extract (CEE), as well as to evaluate its antimicrobial activity.

Keywords: Formulation; hydrogel; antimicrobial activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Formulação contendo o EEB das folhas de <i>Melaleuca leucadendron</i> após o teste de centrifugação.	32
Figura 2. pH (A), temperatura de gelificação (B), tamanho de partícula (C), IPD (D) e potencial zeta (E) da F-EEBP no estudo de estabilidade preliminar.	34
Figura 3. Crescimento microbiano em ágar Mueller Hinton após 24 horas.	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentrações de EEBM e tensoativo utilizados para a obtenção da solução micelar inicial.....	20
Tabela 2. Matriz de ensaios para a formulação desenvolvida a partir do EEBM.....	21
Tabela 3. Peso dos cadinhos vazios, da amostra, dos cadinhos após o esfriamento, da perda, e a porcentagem do teor de umidade.	24
Tabela 4. Peso dos cadinhos vazios, da amostra, dos cadinhos após o esfriamento, da perda, e a porcentagem da perda por dessecação.....	25
Tabela 5. Peso dos cadinhos vazios, da amostra, dos cadinhos após esfriamento, do resíduo e a porcentagem do teor de cinzas.....	25
Tabela 6. Porcentagem retida em cada malha do tamis.	26
Tabela 7. Tamanho de partícula de IPD das soluções micelares iniciais.	27
Tabela 8. Tamanho de partícula de IPD das soluções micelares com 0.25, 0.50 e 0.75% de EEBM.....	30
Tabela 9. Tamanho de partícula, IPD e temperatura de solidificação da F-EEBM.....	31
Tabela 10. Parâmetros avaliados do teste de estabilidade preliminar.	33
Tabela 11. Crescimento microbiano após 24 horas, concentração do extrato e das formulações.	36

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CBM	Concentração bactericida mínima
CEE	Crude ethanol extract
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standard Institute
DMSO	Dimetilsulfóxido
EEB	Extrato etanólico bruto
EEBM	Extrato etanólico bruto de <i>Melaleuca leucadendron</i>
F-EEBM	Formulação contendo extrato etanólico bruto de <i>Melaleuca leucadendron</i>
IPD	Índice de polidispersão
MBC	Minimum bactericidal concentration
MIC	Minimum inhibitory concentration
PI	Polydispersion index
SUS	Sistema Único de Saúde
UFC	Unidades Formadoras de Colônias

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO DA LITERATURA	11
2.1. FITOTERAPIA.....	11
2.2. STAPHYLOCOCCUS AUREUS	12
2.3. MELALEUCA LEUCADENDRON.....	12
2.4. NANOTECNOLOGIA.....	13
2.5. POLOXAMERS.....	13
2.6. HIDROGÉIS.....	14
2.7. ENSAIOS DE ESTABILIDADE EM FITOCOSMÉTICOS.....	15
3. JUSTIFICATIVA	16
4. OBJETIVOS	17
4.1. OBJETIVO GERAL	17
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
5. MATERIAIS E MÉTODOS	17
5.1. CARACTERIZAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL	17
5.1.1 <i>Material Botânico</i>	17
5.1.2 <i>Teor de umidade</i>	18
5.1.3 <i>Perda por dessecação</i>	18
5.1.4 <i>Dosagem de cinzas</i>	18
5.1.5 <i>Análise granulométrica</i>	18
5.1.6 <i>Obtenção do Extrato</i>	19
5.2. DESENVOLVIMENTO DA FORMULAÇÃO CONTENDO EXTRATO BRUTO DE <i>MELALEUCA LEUCADENDRON</i>	19
5.2.1 <i>Obtenção da solução micelar inicial</i>	19
5.2.2. <i>Otimização da solução micelar por desenho experimental fatorial</i>	20
5.2.3. <i>Obtenção da formulação final: Hidrogel</i>	21
5.3. AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DA FORMULAÇÃO	22
5.3.1. <i>Teste de centrifugação</i>	22
5.3.2. <i>Estabilidade preliminar</i>	22

5.4. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA POR MICRODILUIÇÃO EM CALDO.	22
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
6.1. CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO	24
6.1.1. <i>Material Botânico</i>	24
6.1.2. <i>Teor de Umidade</i>	24
6.1.3. <i>Perda por dessecação</i>	24
6.1.4. <i>Dosagem de cinzas</i>	25
6.1.5. <i>Análise Granulométrica</i>	26
6.1.6. <i>Obtenção do extrato</i>	27
6.2. DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES	27
6.2.1. <i>Obtenção da formulação inicial: Solução micelar</i>	27
6.2.2. <i>Otimização da solução micelar por desenho experimental fatorial</i>	28
6.2.3. <i>Obtenção da formulação final: Hidrogel</i>	31
6.3. AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DA FORMULAÇÃO	32
6.3.1. <i>Teste de centrifugação</i>	32
6.3.2. <i>Estabilidade Preliminar</i>	32
6.4. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA POR MICRODILUIÇÃO EM CALDO.	35
7. CONCLUSÃO	38
8. REFERÊNCIAS	39

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos tempos, tem crescido cada vez mais a procura por medicamentos inovadores no mercado, onde a fitoterapia tem ganhado espaço no tratamento de diversas enfermidades humanas, melhorando a qualidade de vida da população, por ser uma alternativa terapêutica mais barata e acessível (SILVA et al., 2021). Nesse sentido, a investigação de agentes antimicrobianos capazes de tratar cepas multirresistentes tem sido alvo de pesquisas, e a associação de matérias primas vegetais a esses medicamentos vem sendo explorada.

Em busca do aprimoramento de formulações contendo matérias primas vegetais a nanotecnologia é utilizada como ferramenta que vem auxiliando no desenvolvimento de medicamentos que possuam uma liberação mais controlada e prolongada do fármaco (MACHADO, 2021). Esses sistemas nanoestruturados podem trazer benefícios quanto ao aspecto físico-químico das formulações, como melhora da superfície de contato, proteção de ativos sensíveis a demais componentes da formulação, e consequentemente diminuição da incompatibilidade entre as substâncias, redução de odores indesejáveis, alta tolerabilidade, maior capacidade de formação de filme sobre a pele (MACHADO, 2021).

Dentre os sistemas nanoestruturados, o hidrogel é uma formulação capaz de formar um filme sobre a pele e incorporar quantidades significativas de extrato, por sua vez, sendo eficaz da liberação prolongada e sustentada dos fármacos (HAMIDI et al., 2008; GAO et al., 2016; OLTARZHEVSKAYA et al., 2018).

O *Staphylococcus aureus* é um microrganismo presente na flora normal dos seres humanos, principalmente na pele, porém em situações de trauma ou lesões e imunocomprometimento, é o agente causador mais comum de infecções de pele (GELATTI et al., 2009). A planta *Melaleuca leucadendron*, tem sido pesquisada para o tratamento de infecções causadas *Staphylococcus aureus*, uma vez que possui compostos que promovem atividades anti-inflamatórias, antimicrobianas e cicatrizantes (FERRÁNDIZ e ALCARAZ, 1991; LOPES et al., 2005; AMARAL et al., 2014; LAY et al., 2014).

O desenvolvimento de hidrogéis contendo os ativos presentes na planta *Melaleuca leucadendron*, pode ser uma alternativa interessante no tratamento de infecções causadas por *Staphylococcus aureus*. Desse modo, o objetivo deste trabalho foi produzir uma formulação micelar contendo o extrato etanólico bruto (EEB) da planta, bem como avaliar sua atividade antimicrobiana.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Fitoterapia

As ervas medicinais são utilizadas há séculos, e atualmente existe um aumento do uso de produtos de origem natural, no tratamento de diversas enfermidades devido ao alto custo dos medicamentos sintéticos, e pela tendência ao uso de produtos naturais enraizados na sociedade (SILVA et al., 2021).

O uso de medicamentos fitoterápicos tem aumentado cada vez mais no país, isso se deve a sua grande diversidade vegetal, e principalmente pela implementação de políticas públicas relacionadas a plantas medicinais e fitoterápicos a partir da década de 80. No ano de 2006, foi aprovado pelo Conselho Nacional de Saúde e consolidada a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares do SUS, essa política busca estimular mecanismos naturais de prevenção de agravos à saúde, por meio de tecnologias com ênfase em produtos e serviços relacionados à fitoterapia, visando a integração com o meio ambiente e sociedade (BRASIL, 2006).

Estudos de fitoterapia têm ganhado espaço na busca de novos elementos e substâncias que possam obter sucesso em tratamentos contra microrganismos. A pesquisa de novos antimicrobianos e terapias alternativas se faz cada vez mais necessária, e é um grande desafio para a comunidade científica, devido ao risco biológico proveniente de novas linhagens de microrganismos resistentes (LALUCH et al., 2020).

Outro aspecto importante a ser abordado é que a população, em sua maioria, acredita que as plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos, por serem de origem natural não apresentam riscos à saúde, usando assim esses produtos de forma irracional e como consequência, aumentando o número de casos de intoxicações e efeitos colaterais (LEAL E TELLIS, 2015).

Nesse sentido, o farmacêutico com conhecimento técnico-científico bem fundamentado é essencial para o uso racional de medicamentos fitoterápicos, ajudando dessa forma a prevenir e corrigir intoxicações advindas do uso incorreto de medicamentos contendo plantas medicinais (METZKER, 2017).

Assim, a assistência farmacêutica entra como ferramenta fundamental para garantia do uso correto dos medicamentos fitoterápicos no país, fazendo com que a terapia farmacológica

ocorra de forma eficaz e minimizando erros, fazendo com que o tratamento seja focado e centralizado na saúde do indivíduo (ZALEWSKI, 2017).

2.2. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus é uma bactéria em formato esférico pertencente ao grupo dos cocos gram-positivos, faz parte da microbiota normal da pele, porém em decorrência de baixa imunidade ou lesão, pode levar a infecções do órgão. Com o emprego da antibioticoterapia no início da década de 1930 com a sulfanilamida e com o descobrimento de antibióticos betalactâmicos, iniciou-se o tratamento frente a essa bactéria, que acabou por sua vez, desenvolvendo mecanismos de resistência contra a sulfanilamida, e o mesmo ocorreu para os antibióticos betalactâmicos, dado que a bactéria *Staphylococcus aureus* é capaz de hidrolisar e inativar o antibiótico por meio da produção de betalactamases (SANTOS et al., 2007).

2.3. *Melaleuca leucadendron*

A espécie *Melaleuca leucadendron* é bastante conhecida popularmente pelas folhas de papel branco ou cajepute. Faz parte da família Myrtaceae, a qual possui aproximadamente 4.000 espécies encontradas em regiões tropicais e subtropicais com predominância na região neotropical e na Austrália (SOUZA, 2008).

A planta é amplamente utilizada em diversos países, como: Austrália, Europa e América do Norte como componente ativo em formulações para limpar as mãos, xampus e preparações tópicas para o tratamento de infecções e outras doenças (BRUN et al., 2018). Além disso, possui material vegetal veiculado à medicamentos fitoterápicos, incluindo anti-sépticos, antiespasmódicos, antineurálgicos e antirreumáticos, e na fabricação de cosméticos. Vários estudos já demonstraram a eficácia da espécie como agente antibacteriano, antiviral, antitérmico e antifúngico (PUJIARTI et al., 2011). Diversas espécies da família Myrtaceae, especialmente do gênero *Melaleuca* L., são também utilizadas no tratamento de problemas de pele, como: acne, feridas, furunculose e onicomicose. Assim como, possui indicações para o uso interno em gripes, inflamações de garganta e infecções vaginais (MONTEIRO, 2014).

Investigações realizadas em Nilgiris na Índia constataram a presença de compostos fenólicos, triterpenos, esteroides, flavonóides, saponinas e taninos, no extrato metanólico das folhas de *Melaleuca leucadendron* (SHAN et al., 2013).

Além disso, os compostos fenólicos, flavonóides, taninos, triterpenos e saponinas são constantemente relacionados às atividades anti-inflamatórias, antimicrobianas e cicatrizantes (FERRÁNDIZ e ALCARAZ, 1991; LOPES et al., 2005; AMARAL et al., 2014; LAY et al., 2014).

2.4. Nanotecnologia

O termo nanotecnologia se refere ao estudo e às aplicações tecnológicas de objetos e dispositivos que possuam ao menos um de suas dimensões físicas na escala nanométrica (LÊDO et al., 2006). Essa ciência é capaz de criar sistemas de liberação inovadores, capazes de melhorar a absorção das substâncias administradas. Desse modo, formulações nanoestruturadas permitem aumentar a eficácia e a segurança dos medicamentos (SARMENTO et al., 2007).

A nanotecnologia tem tido resultados modestos no país, porém vários pesquisadores brasileiros têm obtido resultados satisfatórios em produtos para aplicação dermatológica, que oferecem maior comodidade e eficácia terapêutica para os pacientes. Portanto, pesquisas de base nanotecnológica quando alinhadas às indústrias farmacêuticas, levam ao aumento da inovação de fármacos (DIMER, 2013).

A inovação atribuída aos estudos que utilizam abordagens da nanotecnologia, como nanopartículas, lipossomas e nanoemulsões, tem se destacado devido à melhoria na aplicação terapêutica (ZORZI et al., 2015). Uma estratégia muito importante na nanotecnologia é a preparação de sistemas micelares promovido por polímeros, comumente chamados de micelas poliméricas. Essa tecnologia é altamente promissora na solubilização e melhora na absorção de fármacos (MILLER et al., 2013). São constituídos por nanosistemas com um núcleo interior hidrofóbico rodeado por uma camada exterior hidrofílica (MAZZAFERRO, BOUCHEMAL & PONCHEL, 2013; YUAN et al., 2010).

2.5. Poloxamers

Poloxamers são polímeros sintéticos com propriedades anfífilas que promovem a formação de sistemas nanoestruturados. Possuem uma cadeia hidrofóbica de polioxipropileno entre duas cadeias de polietileno hidrofílico. Em virtude da sua propriedade anfífila, são capazes de encapsular substâncias e formar hidrogéis constituídos por micelas poliméricas estruturadas em uma rede cúbica 3D. Por se tratar de substâncias atóxicas e estáveis, são muito utilizadas em sistemas de liberação controlada (PEREIRA, 2013).

Nessa família de copolímeros o Poloxamer 407 se destaca na produção de hidrogéis, levando em conta sua grande capacidade solubilizadora, baixa toxicidade, capacidade de veicular fármacos, bem como inúmeras biomoléculas, e compatibilidade com vários excipientes. O poloxamer 407 é um surfactante anfifílico não iônico da família de polímeros tribloco, sendo assim, é um composto obtido da junção de três segmentos poliméricos sendo a parte central comumente caracterizada pela presença do óxido de propileno, diferente dos segmentos externos da molécula, obtendo o óxido de etileno nas pontas (GIULIANO et al., 2018).

Os poloxamers são tensoativos não-iônicos, e fazem parte dos principais componentes presentes nas formulações capazes de influenciar no potencial zeta, por reduzirem o valor absoluto desse parâmetro (SCHAFFAZICK, 2003). O potencial zeta é uma propriedade capaz de medir o potencial eletrocinético da superfície das partículas produzidas a partir da utilização do tensoativo e, consiste na diferença de potencial entre a fase dispersa e a fase dispersante. Esta propriedade, está muito relacionada a estabilidade química de fármacos encapsulados, por ser capaz indicar o grau de repulsão entre partículas adjacentes, carregadas em uma dispersão (MAYORAL, 2014). Quando o potencial zeta é baixo, existe atração entre as partículas e estas tendem a flocular, por isso é desejável que esse parâmetro tenha valores elevados, evitando a agregação, e levando à uma boa estabilidade físico-química da formulação (MAYORAL, 2014).

Uma característica muito importante e motivo pelo qual o poloxamer 407 é utilizado na fabricação de hidrogéis é seu comportamento diante das variações de temperatura. O aumento da temperatura faz com que ocorra o rearranjo das micelas produzidas pelo polímero e sua dimensão espacial passa de uma estrutura cúbica para uma configuração hexagonal, levando assim, ao processo de gelificação da formulação (GIULIANO, 2018). Dessa forma, esse polímero é considerado promissor na veiculação de diversas substâncias bioativas, por possuir característica fluída a temperatura ambiente favorecendo sua aplicação nos tecidos, e na temperatura corporal se gelificam, proporcionando dessa forma, uma liberação mais controlada e sustentada do fármaco.

2.6. Hidrogéis

O hidrogel é um exemplo de formulação que pode ser utilizada a fim de aumentar a eficácia e segurança dos medicamentos, através do sistema de entrega controlada de fármacos. Essa

estratégia diminui o número de aplicações, uma vez que promove a liberação localizada, prolongada e sustentada do medicamento através da pele (HAMIDI et al., 2008; GAO et al., 2016; OLTARZHEVSKAYA et al., 2018). Essas formulações são constituídas por redes poliméricas estruturadas tridimensionalmente, formadas por macromoléculas interligadas por ligações do tipo covalente (reticulações) ou interações físicas (OVIEDO et al., 2008). Hidrogéis são capazes de reter grande quantidade de água na pele sem que haja dissolução do polímero (BHATTACHARYA et al., 2009; FENNELL et al., 2019).

A pele é o maior órgão do corpo humano, e sua principal função é a proteção entre os ambientes interno e externo, sendo assim uma barreira contra estressores ambientais. Fatores como pressão, traumas mecânicos, químicos, físicos e isquêmicos e algumas cirurgias, podem levar à vários tipos de lesões (SOUSA et al., 2019). Portanto se faz necessário, meios terapêuticos para que o processo de tratamento de lesões ocorra mais rapidamente, e que esse processo ocorra da forma mais asséptica possível.

O processo de tratamento de feridas da pele ocorre através do fechamento rápido e funcional da lesão com a minimização de cicatrizes aparentes, por meio da proteção à agentes físicos, mecânicos e biológicos, a fim de evitar e diminuir complicações (HAN et al., 2017).

Nesse sentido, os hidrogéis são sistemas semisólidos capazes de atuar no tratamento dessas lesões com perda parcial ou profunda, dermoabrasões, necrose, úlceras e queimaduras. Podem ser utilizados juntamente com outros medicamentos, bem como podem ser empregues em sua formulação diversos ativos encapsulados provenientes de plantas medicinais (MONTEIRO, et al., 2020; QU, et al., 2018).

2.7. Ensaios de estabilidade em fitocosméticos

Existem diversos aspectos que podem afetar a estabilidade das formulações fitocosméticas, tanto extrínsecos, quando relacionados a fatores externos, tais como luz, temperatura e umidade, como intrínsecos, quando estão aliados à aspectos que são inerentes à formulação, sendo eles: incompatibilidade química e física, pH, material de acondicionamento, e interação dos ingredientes utilizados que podem promover reações de hidrólise e óxido redução, e por consequência, acabam levando à perda da estabilidade do produto (ISAAC, 2008). Desse modo, existem ensaios que são empregados no desenvolvimento de formulações fitocosméticas a fim de prever e determinar que esses produtos produzam resultados positivos no tratamento de diversas doenças.

De acordo com a Anvisa o teste de centrifugação é um dos ensaios realizados, onde a formulação deve-se permanecer estável, sem separação de fases e presença de corpo de fundo ao fim da centrifugação, caso ocorra qualquer sinal de instabilidade será necessária uma reformulação do produto. Além disso, a agência pontua que ao obter uma aparência homogênea e sem alterações após a centrifugação, não significa necessariamente que a formulação seja estável, e sim que a mesma se encontra preparada para os demais testes, como o teste de estabilidade preliminar.

O teste de estabilidade preliminar é baseado em condições onde a amostra é colocada em situações extremas de temperatura, passando por ciclos de aquecimento e resfriamento, fazendo com que possíveis reações que possam acontecer entre os constituintes da formulação sejam aceleradas. Por acondicionar a amostra em situações extremas não compatíveis com a real situação que seria acondicionada, o teste não é capaz de determinar o prazo de validade do produto, mas se mostra uma ferramenta eficaz na triagem de formulações ao fornecer indicações de instabilidade na composição e necessidade de reformulação (BRASIL, 2004).

3. JUSTIFICATIVA

O hidrogel pode aumentar a eficácia de fármacos frente a microrganismos resistentes. Além disso, possui capacidade de aumentar a biodisponibilidade e a biocompatibilidade da forma farmacêutica, elevando a penetrabilidade pela pele, aumentando a eficácia e reduzindo a toxicidade. Portanto, pode se tornar uma forma farmacêutica interessante na incorporação de matérias primas de origem vegetal.

Levando em conta a falta de estudos sobre formulações contendo o extrato etanólico bruto das folhas de *Melaleuca leucadendron* e a necessidade de novos antibióticos para o tratamento de infecções causadas por *Staphylococcus aureus*, tornam-se necessários tais estudos para determinar a atividade antimicrobiana do extrato frente a este microrganismo, bem como determinar a estabilidade das formulações, para assim contribuir com a pesquisa de novas formas de tratamento contra doenças infecciosas.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

Desenvolver uma formulação micelar a partir do extrato etanólico bruto das folhas de *Melaleuca leucadendron* e realizar a avaliação da atividade antimicrobiana.

4.2. Objetivos Específicos

- Obter o extrato etanólico bruto das folhas de *Melaleuca leucadendron*;
- Desenvolver uma formulação micelar contendo o extrato etanólico bruto de *M. leucadendron*;
- Caracterizar a formulação desenvolvida por meio de análise macroscópica, medida do tamanho e índice de polidispersão das partículas;
- Avaliar a atividade antimicrobiana do extrato e da formulação.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Caracterização do material vegetal

5.1.1 Material Botânico

As folhas de *Melaleuca leucadendron* foram coletadas na Universidade Federal de Ouro Preto no campus situado na cidade de Ouro Preto, Minas Gerais, no ano de 2021. A exsicata foi depositada no Herbário Professor José Badini, DEBIO/ICEB/UFOP, sob o número de registro OUPR 29495. E o cadastro no SISGEN foi realizado sob número A2CC35F.

Após a coleta, foi feita a triagem das folhas, no ato da seleção, aquelas que estavam sujas e infectadas por fungos foram descartadas, prevalecendo folhas de aspecto mais límpido, as quais foram colocadas em estufa com circulação de ar em temperatura ambiente ($25^{\circ}\text{C} \pm 2$) por 3 dias.

A pulverização ocorreu em um moinho de facas (Manesco e Ranieri LTDA) e o pó obtido foi pesado.

5.1.2 Teor de umidade

O teor de umidade foi realizado conforme a Farmacopéia Brasileira 6ª edição. Em triplicata 1g das folhas pulverizadas de *Melaleuca leucadendron* foram pesadas em cadinhos. Feito isto, foram levados à estufa a 105°C por 15 minutos. Após o tempo estimado, os cadinhos foram colocados em dessecador com sílica até o resfriamento à vácuo. Em seguida, os cadinhos que já foram previamente pesados vazios, foram pesados novamente contendo a amostra para determinação do teor de umidade.

5.1.3 Perda por dessecação

A perda por dessecação do pó das folhas de *Melaleuca leucadendron* foi determinada conforme a Farmacopéia Brasileira 6ª edição. Em triplicata de 1g da amostra foi pesada em cadinhos, que foram colocados em aquecimento em estufa à 105°C por 2 horas. Estes, foram armazenados no dessecador com sílica até o resfriamento sob vácuo. Em seguida, os cadinhos que já foram previamente pesados vazios, foram pesados novamente contendo a amostra para a análise da perda por dessecação.

5.1.4 Dosagem de cinzas

Para a dosagem de cinzas, o procedimento foi realizado conforme a Farmacopéia Brasileira 6ª edição. Em triplicata, os cadinhos foram lavados e secados por cerca de 4 horas em mufla à 550°C. Posteriormente, os cadinhos foram retirados da estufa e colocados no dessecador onde foi aguardado o seu resfriamento por aproximadamente 1 hora. Em seguida, foi pesado e anotado a massa de cada cadinho vazio. Posteriormente, 5g do pó das folhas secas e trituradas de *Melaleuca leucadendron* foram colocados nos cadinhos e anotado a massa.

As amostras previamente pesadas foram colocadas na mufla e foi aumentada gradativamente a temperatura da mesma por 5 à 6 horas até 550°C. O resíduo final obtido do dessecador foi resfriado e os cadinhos foram levados a balança, e pesados a fim de calcular a % de resíduo.

5.1.5 Análise granulométrica

Com finalidade de realizar a análise granulométrica a partir da metodologia descrita na Farmacopéia Brasileira 6ª edição, 25g do pó triturado das folhas de *Melaleuca leucadendron* foi pesado e colocado na maior malha do tamis, procedendo com agitação por vibração por 30

min. Após este tempo, foi pesada a fração presente em cada malha. Antes de colocar o pó na malha, esta foi previamente pesada vazia, e posteriormente pesada com cada fração. A determinação da massa foi obtida pela subtração da malha cheia (g) pela malha vazia (g).

5.1.6 Obtenção do Extrato

Aproximadamente 255,95g das folhas pulverizadas de *Melaleuca leucadendron* foram previamente umedecidas com etanol e colocadas em um percolador, onde o solvente foi acrescentado até completar 1000mL ao sistema que após esse processo ficou em repouso. Após 48 horas, foi realizada uma filtração do sistema. Esse procedimento foi repetido por mais 6 vezes, totalizando 4000mL de etanol utilizados na extração. O filtrado do sistema de percolação foi concentrado através da evaporação do solvente em um rotaevaporador, sob pressão reduzida e temperatura de aquecimento constante de 40°C.

A fim de se obter uma maior evaporação do solvente, o extrato previamente concentrado no evaporador rotatório foi colocado em estufa à temperatura de 40°C por aproximadamente 7 dias. Posteriormente, o extrato bruto foi pesado a fim de conhecer valores referentes ao rendimento.

5.2 Desenvolvimento da formulação contendo extrato bruto de *Melaleuca leucadendron*

5.2.1 Obtenção da solução micelar inicial

Inicialmente foi realizada a solubilização do extrato e do poloxamer em quantidade suficiente de etanol 99,8% P.A. As concentrações de extrato e poloxamer utilizadas estão demonstradas na **Tabela 1**. Após a solubilização, o extrato e poloxamer foram vertidos para um mesmo balão de fundo redondo e o solvente foi evaporado em rotavapor (Fisatom[®], Brasil) à temperatura de 40°C e sob pressão reduzida.

Posteriormente, foi realizada a reidratação adicionando-se água ultrapura em quantidade suficiente para completar o volume final de 20 mL, concomitante à homogeneização em agitador magnético. A solução micelar foi armazenada em geladeira por até 72 horas para reduzir a espuma. Os principais aspectos macroscópicos da formulação, como cor, odor e viscosidade e separação de fases foram observados.

Tabela 1. Concentrações de EEBM e tensoativo utilizados para a obtenção da solução micelar inicial.

Extrato (%)	Poloxamer (%)	DMSO (%)	Água q.s.p.
0,25	13	0	20mL
0,5	13	0	20mL
1,0	15	0	20mL

Para caracterização da solução micelar obtida foi realizada também 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 ultrapura e 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. Foram selecionadas para a próxima etapa as formulações que na análise macroscópica apresentavam-se homogêneas e com ausência de sinais de instabilidade, além de tamanho de partícula nano e baixo índice de polidispersão ($\leq 0,5$) nas leituras realizadas 24 horas e 7 dias após a obtenção das soluções.

5.2.2. 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 3^2 , onde foi analisada a influência das diferentes concentrações de extrato, tensoativo (Poloxamer) e DMSO sobre o tamanho das partículas e o IPD. Neste caso, o DMSO foi utilizado para se obter uma melhor solubilidade do extrato e conseqüentemente avaliar se este possui impacto positivo no desenvolvimento da formulação.

Neste estudo, foram avaliadas 2 variáveis diferentes, cada uma a três níveis descritos como mínimo (-), médio (0) e máximo (+), dados apresentados na **Tabela 2**. Nesta etapa, o volume final foi ajustado para 5 mL.

Tabela 2. Matriz de ensaios para a formulação desenvolvida a partir do EEBM.

Nível de planejamento fatorial	Extrato (%)	Variáveis	
		Poloxamer (%)	DMSO (%)
-	0,25	13	0
0	0,50	14	1
+	0,75	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 ultrapura. 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.

5.2.3. 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 sólido. Para verificar o comportamento da formulação frente às variações de temperatura, foram realizados testes de exposição das mesmas à diferentes temperaturas, e foi selecionada a formulação que se tornou sólida à aproximadamente 35°C. As formulações foram colocadas em água quente e a temperatura foi monitorada utilizando-se 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 sólido.

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 ultrapura. 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.

5.3. Avaliação da estabilidade da formulação

5.3.1. Teste de centrifugação

O teste de centrifugação foi realizado conforme procedimento estabelecido pela Anvisa, onde 5g das amostras, em triplicata, foram colocadas em tubos de ensaio, e centrifugadas a 3000 rotações por minuto (rpm) por 30 minutos. Em seguida, cada tubo de ensaio foi avaliado de forma visual, com a finalidade de observar o aparecimento de algum precipitado no fundo do tubo ou separação de fases da amostra. Livre de qualquer instabilidade aparente, as amostras seguiram para o teste de estabilidade preliminar.

5.3.2. Estabilidade preliminar

O estudo de estabilidade preliminar foi realizado conforme procedimento estabelecido pela Anvisa, e teve duração de 12 dias. As formulações em teste foram submetidas a condições de estresse com a finalidade de acelerar o surgimento de possíveis sinais de instabilidade de acordo diferentes temperaturas. As amostras foram submetidas a 6 ciclos de 24 horas alternando entre resfriamento ($5^{\circ}\text{C} \pm 2$) em refrigerador e aquecimento ($40^{\circ}\text{C} \pm 2$) em estufa, onde iniciaram o ciclo no refrigerador, portanto nos tempos 24 horas, 7° dia e 12° dia, as amostras se encontravam em geladeira, novamente em geladeira e estufa, respectivamente.

Nos tempos de 24 horas e aos 7° e 12° dias foram realizadas leituras dos tamanhos de partícula, IPD e potencial zeta com o auxílio do aparelho Zetasizer (PN3702) - Software: Zetasizer, onde utilizou-se cubeta de quartzo. As amostras foram analisadas em triplicata com diluição (1:1000) em água ultrapura em todas as leituras. As medidas foram executadas em ângulo de retroespalhamento de 173° , à temperatura de 25°C . Além desses aspectos, foram avaliadas também as características organolépticas da formulação (cor, odor e aspecto), bem como o pH de uma solução aquosa diluída 1:10, e por fim, a temperatura de solidificação da amostra.

5.4. Determinação da atividade antimicrobiana por microdiluição em caldo

A determinação da atividade antimicrobiana foi realizada microplacas de 96 poços previamente esterilizadas com álcool 70%, e colocadas sob a luz ultravioleta (UV) na capela de fluxo laminar, para o devido controle biológico e confiabilidade do teste. Os materiais utilizados nos experimentos, foram autoclavados a fim de se manter um ambiente estéril. O inóculo foi feito a partir da preparação de uma suspensão contendo *Staphylococcus aureus* em solução

salina (NaCl 0,9%), que foi comparada com a escala McFarland. As suspensões foram diluídas em proporção 1:100 em caldo Mueller Hinton, obtendo assim, uma concentração final de microrganismos no teste de 5×10^5 UFC/mL.

2g do extrato foram solubilizados com 2% de DMSO (100 μ L), posteriormente a água foi adicionada até se obter uma concentração de 400mg/mL. Dessa solução estoque, 1mL foi colocado em eppendorf e completado volume com 1mL de caldo, possuindo uma concentração final de 200mg/mL, dessa nova solução 50 μ L foi transferida para os poços A1, A2 e A3, onde foram completados com o inóculo, fazendo com que a maior concentração do teste seja 100mg/mL dentro dos três primeiros poços.

Em triplicata, foi adicionado meio a partir do segundo poço de cada coluna do teste. Em seguida, adicionou-se 50 μ L de solução de amostra no segundo poço em triplicata, onde foi realizado diluições seriadas 1:2, retirando do segundo poço e transferindo para o terceiro e homogeneizando, esse processo foi repetido até o último poço e descartados os 50 μ L retirados deste. Por último foi adicionado de inóculo em cada coluna do teste onde foram realizadas as diluições.

Para o controle de crescimento, foi adicionado ao poço 50 μ L de meio de cultura. Já no controle positivo, foram adicionados 50 μ L de Tetraciclina. No controle negativo, foram adicionados 50 μ L de caldo com DMSO 2%. E por último no controle do meio de cultura, foram adicionados 100 μ L de caldo. Feito isto, o inóculo foi colado em cada poço, exceto para o controle do meio de cultura, que deve indicar que o caldo adicionado está livre da presença de microrganismos. Por fim, a placa de elisa foi incubada em estufa a 37°C por 24 horas.

No dia seguinte, com o auxílio de alça bacteriológica na capela de fluxo laminar, o conteúdo de cada poço foi semeado em placa de Petri contendo ágar Mueller Hinton. A placa de Petri foi incubada a 37° por 24 horas, e foi considerada como concentração inibitória mínima (CIM), a menor concentração em que não houve crescimento microbiano na placa de Elisa, mas quando repicada em placa de Petri obteve crescimento, e a concentração bactericida mínima (CBM) a diluição que não possuiu crescimento microbiano na placa de Elisa, e quando foi repicada em placa de Petri, também não foi constatado o crescimento microbiano.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Caracterização do extrato

6.1.1. Material Botânico

As folhas coletadas e levadas ao moinho de facas totalizaram um valor de massa de 361,95g, onde 105,98g foi separado para estudos fitoquímicos e 255,95g do pó das folhas pulverizadas foi levado ao sistema de percolação para a obtenção do extrato.

6.1.2. Teor de Umidade

A teor de umidade foi determinado, a partir da pesagem dos cadinhos vazios antes da adição de 1g de amostra, e após a passagem da amostra por 15 minutos pela estufa e esfriamento em dessecador. Os dados estão descritos a seguir na **Tabela 3**.

Tabela 3. Peso dos cadinhos vazios, da amostra, dos cadinhos após o esfriamento, da perda, e a porcentagem do teor de umidade.

	Cadinhos vazios (g)	Amostra (g)	Após esfriamento (g)	Perda(g)	Teor de umidade (%)
	18,7617	1	19,7040	0,0577	5,77
	19,8455	1	20,7857	0,0598	5,98
	18,7166	1	19,6556	0,0610	6,10
Média	19,1079	1	20,0448	0,0595	5,95
Desvio Padrão	± 0,6391	-	± 0,6390	± 1,6706 x10 ⁻³	± 0,1670

6.1.3. Perda por dessecação

A perda por dessecação foi determinada, a partir da pesagem dos cadinhos vazios antes da adição de 1g de amostra, e após a passagem da amostra por 2 horas pela estufa e esfriamento em dessecador. Os valores estão descritos a seguir na Tabela 4.

Tabela 4. Peso dos cadinhos vazios, da amostra, dos cadinhos após o esfriamento, da perda, e a porcentagem da perda por dessecação.

	Cadinhos vazios (g)	Amostra (g)	Após esfriamento (g)	Perda (g)	Perda por dessecação (%)
	18,0617	1	18,9828	0,0789	7,89
	18,9228	1	19,8391	0,0837	8,37
	20,7354	1	21,6489	0,0865	8,65
Média	19,2400	1	20,1569	0,0830	8,30
Desvio Padrão	± 1,3648	-	± 1,3612	± 3,8436 x10 ⁻³	± 0,3844

6.1.4. Dosagem de cinzas

A porcentagem de resíduo foi obtida, a partir pesagem dos cadinhos vazios depois de 1 hora na estufa antes da adição de 5 gramas de amostra, e após a passagem da amostra pela estufa por cerca de 5 horas e esfriamento em dessecador. Se trata de um procedimento importante na determinação de matéria orgânica perdida pela amostra, e na porcentagem de resíduo proveniente da matéria inorgânica residual. Os dados estão descritos a seguir na **Tabela 5**.

Tabela 5. Peso dos cadinhos vazios, da amostra, dos cadinhos após esfriamento, do resíduo e a porcentagem do teor de cinzas.

	Cadinho vazio (g)	Amostra (g)	Após resfriamento (g)	Resíduo (g)	Resíduo (%)
	38,4257	5	38,7164	0,2907	5,81
	43,5530	5	43,8444	0,2914	5,83
	44,7797	5	45,0664	0,2867	5,73
Média	42.2528	5	42,5424	0,2896	5,79
Desvio Padrão	± 3,3706	-	± 3,3693	± 2,5357 x 10 ⁻³	± 0,0529

O limite estabelecido pela Farmacopeia Brasileira 6^o edição (2019) para teor de umidade, bem como a perda por dessecação, é de 8 a 14%. Assim, o teor de umidade,

encontrado nas triplicatas não estão de acordo com as especificações. Esse evento pode ter ocorrido por diversos fatores, o primeiro deles está relacionado a coleta.

Segundo CASTRO (2005), “a colheita deve ser realizada no mesmo dia em que a planta será processada” e no presente estudo, as folhas não foram coletadas e pulverizadas no mesmo dia, isso pode ter colaborado para perda de água e desidratação do material vegetal. Os métodos de secagem em estufa determinam não somente a perda de água, como também dos demais constituintes volatilizados juntamente com a água.

Porém, para aplicação destinada ao desenvolvimento da formulação em hidrogel a perda de água é favorável, uma vez que a presença de umidade nas folhas favorece a ação de enzimas, bem como o desenvolvimento de bactérias e fungos (FARIAS, 2003).

A perda por dessecação se encontra dentro do limite estabelecido, indicando que todos os componentes voláteis como os óleos essenciais presentes no material vegetal, foram perdidos de acordo com o esperado.

Já em relação à dosagem de cinzas, a Farmacopeia Brasileira 6^o Edição preconiza que o teor de cinzas totais não deve ser superior a 12%, dessa forma o teste se encontra de acordo com o especificado.

6.1.5. Análise Granulométrica

O pó das folhas pulverizadas de *Melaleuca leucadendron* passou por diferentes malhas de tamizes a fim de se determinar a granulometria do pó, e os resultados foram dispostos na **Tabela 6**, a seguir.

Tabela 6. Porcentagem retida em cada malha do tamis.

Malhas Selecionadas (mm)	Peso Vazio (g)	Peso Cheio (g)	Massa (g)	%
0,125	885,40	888,72	3,32	13,29
0,210	883,24	880,49	7,25	29,02
0,420	819,79	823,61	3,82	15,29
0,500	908,30	910,95	2,65	10,60
0,590	934,85	941,81	6,95	27,82
1,190	953,90	953,96	0,06	0,24
Coletor Fechado	927,69	928,62	0,93	3,72

De acordo com a Farmacopeia Brasileira 6^o edição (2019) a definição de pó grosso é aquela cujas partículas passam em sua totalidade pelo tamis com abertura nominal de malha de 1,70 mm e, no máximo, 40% pelo tamis com abertura nominal de malha de 355 μm , estando assim o teste, de acordo com o especificado.

6.1.6. Obtenção do extrato

Foram obtidos 52,29g de extrato etanólico bruto das folhas de *Melaleuca leucadendron*, a partir de 255,95g de folhas secas pulverizadas. O rendimento do extrato, portanto, foi de 20,42%.

6.2. Desenvolvimento e caracterização das formulações

6.2.1. Obtenção da formulação inicial: Solução micelar

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.

Após verificar que é possível obter a solução micelar a partir do EEBM (Extrato Etanólico Bruto de *Melaleuca leucadendron*), verificou-se a concentração máxima de extrato possível de ser incorporada à formulação é de 0,75%. As formulações apresentaram partículas de tamanho de nanométrico (< 200 nm) (**Tabela 7**).

Tabela 7. Tamanho de partícula de IPD das soluções micelares iniciais.

Extra to (%)	Poloxam er (%)	DMS O (%)	Tamanho (Leitura: 24 hrs)	PDI (Leitura: 24hrs)	Tamanho (Leitura: 7dias)	PDI (Leitura: 7dias)
0,25	13	0	148,5 \pm 40,2 5	0,527 \pm 0,064	156,2 \pm 61,55	0,379 \pm 0,05 8
0,5	15	0	150,9 \pm 8,73 6	0,547 \pm 0,095	163 \pm 8,423	0,488 \pm 0,01 6
1,0	15	0	170,1 \pm 22,7 9	0,396 \pm 0,013	178,6 \pm 27,74	0,482 \pm 0,19 4

A partir dos resultados obtidos, foi observado uma grande variação no IPD do 1º dia para o 7º dia, isso ocorre pela capacidade do poloxamer de produzir um sistema dinâmico com rearranjos constantes. Ademais, pensou-se no aprimoramento das formulações a fim de se obter melhores resultados quanto ao tamanho de partícula e IPD, com o objetivo de alcançar um valor de < 200 nm e < 0,3, respectivamente, ou bem próximo deste valor. Além disso, pela dificuldade de solubilização do extrato em etanol, se fez necessário uma alternativa em que permitisse sua maior incorporação, e que melhorasse esses parâmetros. O solvente DMSO se mostrou uma alternativa interessante, uma vez que é o solvente mais utilizado na solubilização de extratos e de diversas substâncias. Todavia, deve ser utilizado com cautela, dado que possui toxicidade, além disso, pode interferir na atividade antimicrobiana dos extratos frente aos microrganismos (AMPARO et al., 2018). Esses fatores devem ser levados em consideração no desenvolvimento de formulações que têm como objetivo desempenhar atividade antimicrobiana, pois a utilização equivocada deste solvente pode levar a resultados falso positivos, pela sua capacidade de inibir o crescimento dos microrganismos

6.2.2. Otimização da solução micelar por desenho experimental fatorial

Como no estudo realizado anteriormente foi verificado que as concentrações de extrato de 0,25 a 1,0% permitiram obter formulações com parâmetros macro e microscópicos desejáveis, os estudos posteriores foram realizados utilizando concentrações dentro dessa faixa, e os resultados expressos na **Tabela 8**.

É importante ressaltar que, nessa etapa o DMSO foi adicionado à formulação, pois, verificou-se que este auxilia na solubilização do EEBM. As variáveis tensoativo e DMSO foram avaliadas a três níveis descritos como mínimo (-), médio (0) e máximo (+), para observar a influência do Poloxamer e do DMSO em todas as concentrações e assim obter resultados conclusivos.

Foram obtidas nove formulações para cada concentração de extrato. Os resultados encontram-se na Tabelas 8. Pode-se observar que em relação às formulações com 0,25% de EEBM, na leitura realizada 24h, o tamanho de partícula variou de 94,76nm a 425,0 nm e o IPD de 0,191 a 0,823. A leitura realizada em 7 dias mostrou que o tamanho de partícula variou de 136,7nm a 295,1 nm e o IPD de 0,258 a 0,386.

Em relação às formulações que contém 0,50% de extrato, na leitura realizada 24 horas observou-se que tamanho de partícula variou de 146,6 nm a 463,3 nm. Já o IPD variou de 0,312

a 0,578. Na leitura realizada 7 dias após o desenvolvimento da formulação a variação do tamanho de partícula foi de 95,73 nm a 478,9 nm e a variação do IPD foi de 0,265 a 0,618.

Na leitura realizada 24 horas, as formulações que contém 0,75% de extrato, apresentaram variações de tamanho de partícula de 198,4nm a 346,1 nm. Já o IPD variou de 0,335 a 0,479. Na leitura realizada 7 dias após o desenvolvimento da formulação a variação do tamanho de partícula foi de 78,83 nm a 657,8 nm e a variação do IPD foi de 0,255 a 0,701.

A otimização das formulações foi realizada com o objetivo de encontrar a formulação que provavelmente será a mais estável, dentro dos parâmetros pré-estabelecidos (menor tamanho de partícula e IPD). Os dados obtidos após a caracterização das formulações foram plotados no software Minitab 18 Statistical. Utilizando o desenho de planejamento multinível foi possível identificar a melhor combinação das variáveis na concentração que produz uma resposta dentro da faixa desejada. A combinação considerada melhor consiste nas concentrações 0,75% de extrato, 15% de poloxamer e 2% de DMSO. Essa formulação foi a que destacou ao produzir resultados favoráveis de tamanho de partícula (78,83 nm) e IPD (0,255), além de conseguir incorporar uma maior concentração de extrato frente às demais formulações, o que dado a atividade antimicrobiana do extrato, pode levar a melhores resultados na melhora terapêutica do paciente com o uso da formulação.

Tabela 8. Tamanho de partícula de IPD das soluções micelares com 0.25, 0.50 e 0.75% de EEBM.

Variáveis			Leitura - 24 horas		Leitura - 7 dias	
Extrato (%)	Poloxamer (%)	DMSO (%)	Tamanho (nm)	PDI	Tamanho (nm)	PDI
0,25	13	0	420,2±50,52	0,452±0,014	165,1±18,60	0,258±0,031
0,25	13	1	329,5±108,2	0,363±0,103	145,5±99,21	0,283±0,091
0,25	13	2	153,5±42,04	0,371±0,125	191,9±32,40	0,341±0,036
0,25	14	0	165,7±57,57	0,490±0,321	136,7±28,41	0,355±0,017
0,25	14	1	110,5±684,5	0,823±0,195	157,3±64,83	0,315±0,031
0,25	14	2	425,0±48,51	0,578±0,051	266,5±259,8	0,377±0,130
0,25	15	0	173,0±60,21	0,293±0,058	269,9±39,86	0,356±0,072
0,25	15	1	94,76±34,31	0,191±0,026	295,1±202,6	0,386±0,101
0,25	15	2	176,5±77,12	0,361±0,109	235,1±125,9	0,340±0,177
0,5	13	0	463,3±305,0	0,563±0,238	249,9±62,26	0,393±0,023
0,5	13	1	396,0±166,6	0,578±0,101	252,9±59,51	0,405±0,053
0,5	13	2	210,2±20,64	0,348±0,027	179,5±47,28	0,324±0,041
0,5	14	0	164,5±35,74	0,312±0,045	115,9±25,42	0,287±0,051
0,5	14	1	324,1±162,6	0,401±0,141	478,9±78,74	0,618±0,035
0,5	14	2	227,2±72,26	0,343±0,081	156,9±22,16	0,325±0,025
0,5	15	0	330,6±49,07	0,389±0,043	103,8±5,116	0,317±0,013
0,5	15	1	335,2±52,45	0,519±0,073	111,3±51,78	0,265±0,023
0,5	15	2	146,6±43,53	0,341±0,031	95,73±28,96	0,271±0,012
0,75	13	0	327,1±30,93	0,479±0,039	225,2±35,89	0,417±0,033
0,75	13	1	346,1±47,39	0,463±0,009	657,8±81,25	0,701±0,084
0,75	13	2	287,3±87,71	0,392±0,027	212,2±44,04	0,333±0,056
0,75	14	0	312,3±13,54	0,450±0,017	272,6±77,21	0,417±0,065
0,75	14	1	247,1±18,42	0,429±0,069	256,3±38,31	0,412±0,097
0,75	14	2	243,5±61,39	0,364±0,033	341,0±87,06	0,458±0,044
0,75	15	0	198,4±51,14	0,359±0,014	161,5±15,14	0,354±0,047
0,75	15	1	213,5±86,17	0,335±0,037	134,9±167,2	1,0±0,0
0,75	15	2	249,1±46,81	0,374±0,026	78,83±1,798	0,255±0,040

6.2.3. Obtenção da formulação final: Hidrogel

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). Essa é a formulação escolhida para prosseguirmos com os demais experimentos e foi denominada formulação - extrato etanólico bruto de *M. leucadendron* (F-EEBM). Em relação às demais concentrações de poloxamer testadas, estas solidificaram a uma temperatura muito abaixo (19, 20 e 21%) ou muito acima da temperatura alvo (15, 16 e 17%) (**Tabela 9**).

O tamanho de partícula e IPD foram medidos nos tempos 24 horas e 7 dias após a obtenção dos hidrogéis. Em geral, as análises após 24 horas e 7 dias, apresentaram resultados satisfatórios. Ao aumentar as concentrações de poloxamer as formulações continuaram apresentaram IPD <0,5, o que indica que as partículas permaneceram monodispersas.

MENDONÇA (2019), apresenta em seu estudo a produção de um hidrogel contendo poloxamer, para o desenvolvimento de uma formulação contendo 0,3% de ciprofoxacino, onde obteve um tamanho médio de tamanho de partícula de 240 nm e IPD < 0,2. Comparando os resultados com o presente estudo, observou-se que apesar do IPD ser maior, o tamanho de partícula é menor, o que pode fazer com que a formulação também tenha uma boa absorção pelo extrato córneo da pele.

Tabela 9. Tamanho de partícula, IPD e temperatura de solidificação da F-EEBM.

Poloxamer (%)	Leitura 24h		Leitura 7dias		Temperatura de gelificação (°C)
	Tamanho (nm)	IPD	Tamanho (nm)	IPD	
15	139,6±2,873	0,463±0,081	138,2±1,716	0,434±0,058	>40
16	129,2±17,52	0,239±0,043	79,69±4,433	0,346±0,028	>40
17	191,5±26,49	0,343±0,064	234,6±5,209	0,362±0,067	38
18	180,8±52,28	0,337±0,026	191,8±11,74	0,345±0,026	32
19	152,0±28,03	0,333±0,045	135,4±47,99	0,259±0,025	24
20	152,6±18,02	0,339±0,066	168,5±64,18	0,312±0,051	<24
21	209,3±55,41	0,296±0,041	260,1±105,4	0,353±0,078	<24

6.3. Avaliação da estabilidade da formulação

6.3.1. Teste de centrifugação

Após 5 g da formulação ser submetida à 3000 rpm por 30 minutos, a mesma foi observada visualmente conforme a **Figura 1**.



Figura 1. Formulação contendo o EEB das folhas de *Melaleuca leucadendron* após o teste de centrifugação.

Verificou-se após o teste de centrifugação que as três unidades estudadas permaneceram homogêneas, sem separação de fases e formação de corpo de fundo, estando assim em conformidade com o guia de estabilidade de cosméticos publicado pela Anvisa. Aprovado nesta etapa, o produto pôde ser submetido à demais testes de estabilidade como o teste de estabilidade preliminar (BRASIL, 2004).

6.3.2. Estabilidade Preliminar

Após o teste de centrifugação as amostras passaram por condições de temperatura extremas onde envolviam ciclos de resfriamento e aquecimento que durante 12 dias, os resultados quanto ao tamanho de partícula, IPD, potencial Zeta, bem como as características organolépticas da formulação, foram observados nos tempos de 24 horas, 7° e 12° dias, e os valores foram expressos na **Tabela 10** e **Figura 2**.

Tabela 10. Parâmetros avaliados do teste de estabilidade preliminar.

	Análises	TRIPLICATA 1			TRIPLICATA 2			TRIPLICATA 3		
		TM1.1	TM1.2	TM1.3	TP2.1	TM2.2	TM2.3	TM3.1	TM3.2	TM3.3
24 Horas G	Aspectos visuais	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	pH	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Temperatura de solidificação	32	32	32	32	32	32	32	32	32
	Tamanho de partícula	100,9	138,2	125,3	145,3	134,1	153,2	160,3	121,2	133,8
	PDI	0,256	0,199	0,221	0,287	0,205	0,27	0,223	0,234	0,189
	Potencial zeta	-18,3	-22	-21,8	-17,4	-20,4	-23,1	-21,3	-21,6	-22,4
7 dias G	Aspectos visuais	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	pH	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Temperatura de solidificação	32	32	32	32	32	32	32	32	32
	Tamanho de partícula	145,8	133,4	101,3	154,2	141,2	128,9	126,1	150,1	122,5
	PDI	0,3	0,265	0,201	0,198	0,235	0,244	0,267	0,206	0,168
	Potencial zeta	-22	-18,9	-25,3	-21,8	-22,1	-20,4	-21,3	-24,5	-22,8
12 dias E	Aspectos visuais	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	pH	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Temperatura de solidificação	32	32	32	32	32	32	32	32	32
	Tamanho de partícula	102,9	116,7	145,9	106,9	128,1	145,9	163	144,1	152,1
	PDI	0,243	0,201	0,222	0,301	0,238	0,199	0,206	0,208	0,169
	Potencial zeta	-19,8	-20,4	-22,1	-16,9	-21,5	-22,1	-22,8	-23,1	-22,9

N: Normal **G:** Geladeira **E:** Estufa

Não foram observadas diferenças significativas entre os valores de pH (**Figura 2.A**), temperatura de gelificação (**Figura 2.B**), tamanho de partícula (**Figura 2.C**), IPD (**Figura 2.D**) e potencial zeta (**Figura 2.E**) das formulações nos três tempos de análise (1°, 7° e 12 ° dia).

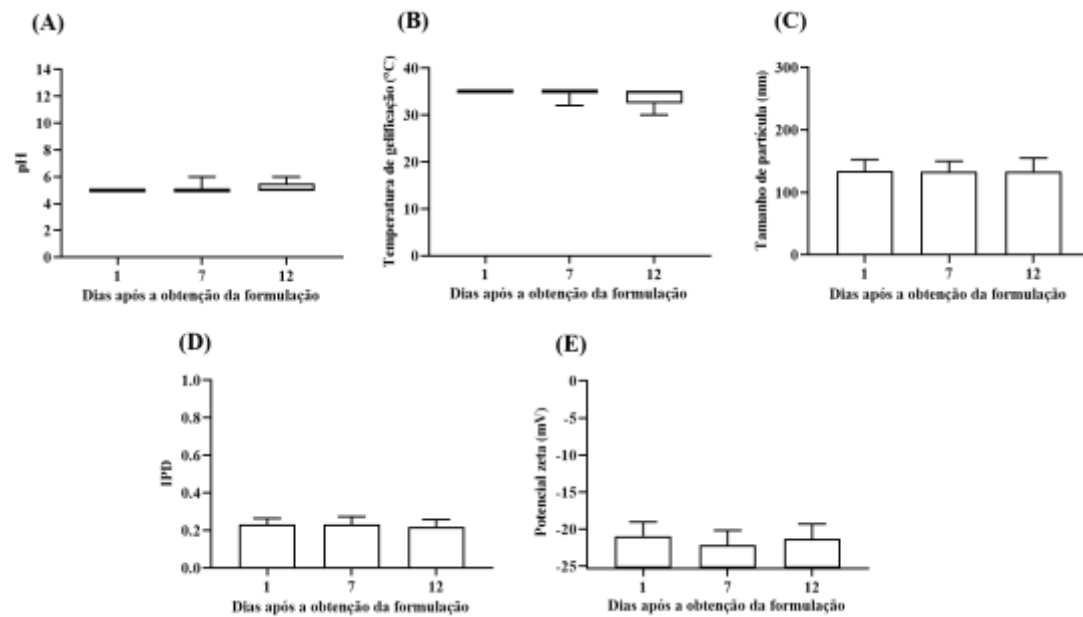


Figura 2. pH (A), temperatura de gelificação (B), tamanho de partícula (C), IPD (D) e potencial zeta (E) da F-EEBP no estudo de estabilidade preliminar.

Resultados expressos como média \pm desvio padrão para os dados paramétricos e como mediana para dados não paramétricos.

Durante todo o período de análise, foi observado que a formulação se manteve estável macroscopicamente quanto a as suas características organolépticas, onde critérios como cor, odor e aparência se mantiveram normais.

O pH da pele é considerado levemente ácido (4,6 – 5,8), e a utilização de produtos dermatológicos que se encontram, em termos de pH, próximos ao da pele é de extrema importância, uma vez que formulações que se encontram fora da faixa do pH cutâneo, podem se comportar de maneira agressiva quando utilizados (LEONARDI et al., 2002). Diante desse fator, o valor de pH obtido nos tempos 24 horas, 7 dias e 12 dias (5), indica que a formulação, no que se refere ao pH, possui grande potencial farmacológico por possuir um valor dentro da faixa do pH cutâneo.

A temperatura de solidificação da formulação se manteve constante (32°), e foi observado que ao retirar as amostras da estufa as mesmas se encontravam mais viscosas, isso foi atribuído a desidratação, que leva ao conseqüente enrijecimento da amostra. Espera-se que a temperatura de transição do gel, seja próxima a temperatura corporal, e que em temperatura ambiente, ele se encontre na forma líquida. SILVA (2017), desenvolveu uma formulação termossensível contendo 18% de poloxamer 407, e obteve um resultado para temperatura de

transição de fase de 34,7°C. Além disso, é dado que existe uma faixa de temperatura de solidificação que se encontra de 30-35°. Portanto, levando em conta o resultado verificado no teste de estabilidade preliminar a formulação possui temperatura de solidificação de acordo com o esperado.

Os tamanhos de partícula das formulações não seguiram um padrão muito bem definido, considerando os ciclos de resfriamento e aquecimento. Esperava-se que a mudança da geladeira para a estufa levasse a diminuição do tamanho de partícula, porém as unidades TM1.3, TM2.3, TM3.1 e TM3.3, tiveram aumento desse parâmetro. Todavia, no que se refere aos valores do tamanho das micelas, é possível afirmar que foram satisfatórios por obterem um tamanho inferior à 200 nm, permitindo a incorporação de concentrações reduzidas do ativo (PATIAS, 2016).

O índice de polidispersão é um padrão que avalia o grau de homogeneidade das partículas dentro de um sistema nanoestruturado, e pode variar de 0 a 1. Valores onde o IPD é $\leq 0,5$ constata uma faixa de distribuição dos tamanhos de partícula mais estreita (SANTOS, 2017). Diante dos resultados, pode-se considerar que as partículas micelares presentes na formulação se apresentam de forma homogênea.

O potencial zeta se manteve elevado negativamente, em torno de -20 mV, esse parâmetro é uma medida que permite avaliar o grau de repulsão das partículas, bem como prever a estabilidade de sistemas nanoparticulados. Formulações que possuem potencial zeta negativo, estão associadas a utilização de tensoativos não iônicos, como é o caso do poloxamer 407, e ainda, valores elevados de potencial zeta (negativos ou positivos), estão associados a partículas improváveis de se flocular, e conseqüentemente mais estáveis (MAYORAL et al., 2014; PATIAS et al., 2016; SANTOS, et al., 2017).

6.4. Determinação da atividade antimicrobiana por microdiluição em caldo

Após a incubação da placa de Elisa, foi realizada a análise macroscópica da placa onde observou-se o crescimento do microrganismo em cada poço conforme a **Tabela 11** a seguir.

Tabela 11. Crescimento microbiano após 24 horas, concentração do extrato e das formulações.

	x						y					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	100 mg/mL			0,39 mg/mL*			500 µL/mL			1,95 µL/mL*		
B	50 mg/mL			0,19 mg/mL*			250 µL/mL*			0,98 µL/mL*		
C	25 mg/mL			0,098 mg/mL*			125 µL/mL*			0,49 µL/mL*		
D	12,5 mg/mL			0,049 mg/mL*			62,50 µL/mL*			0,24 µL/mL*		
E	6,25 mg/mL						31,25 µL/mL*			Controle de Crescimento*		
F	3,13 mg/mL						15,63 µL/mL*			Controle de DMSO*		
G	1,56 mg/mL						7,81 µL/mL*			Controle do Antibiótico		
H	0,78 mg/mL*						3,90 µL/mL*			Controle do Meio		

*Poços onde foi observado crescimento microbiano.

O conteúdo de cada poço foi repicado em ágar Mueller Hinton, e a placa de petri foi incubada por 24 horas. O crescimento microbiano foi observado e assim determinada a concentração inibitória mínima do extrato e da formulação, e a concentração bactericida mínima do extrato.

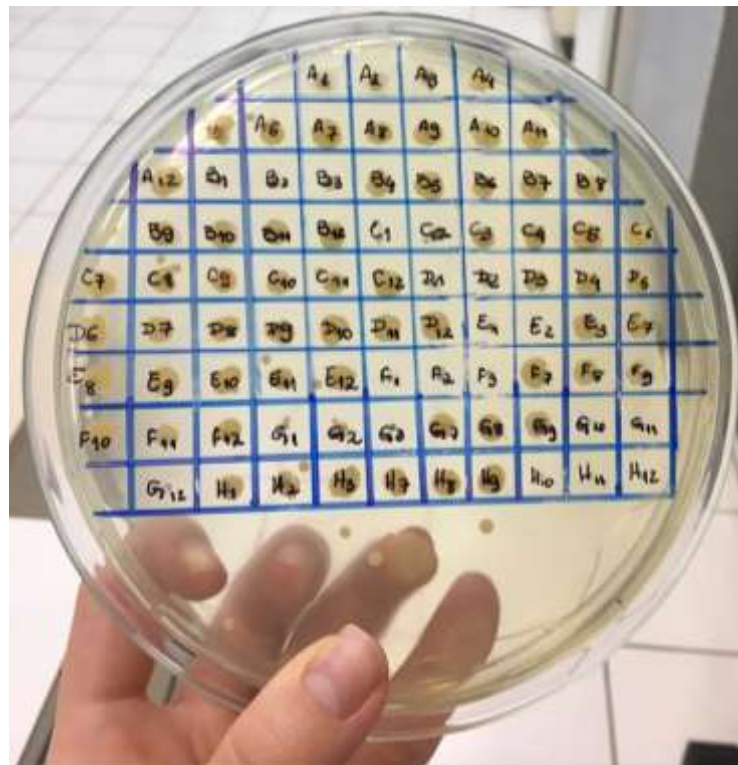


Figura 3. Crescimento microbiano em ágar Mueller Hinton após 24 horas.

Considerando a metodologia realizada de acordo com o Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (CLSI), os poços F1, F2, e F3 possuíram a concentração bactericida mínima para o extrato (3,13 mg/mL), uma vez que os poços não apresentaram turbidez após 24h de incubação, e quando o conteúdo foi passado para o ágar, e incubado por mais 24h, não ocorreu crescimento bacteriano. Isso indica que a concentração de extrato no poço foi suficiente para matar a cepa de *Staphylococcus aureus*.

Os poços G1, G2 e G3, possuíram a concentração inibitória mínima para o extrato (1,56 mg/mL), visto que os poços estavam límpidos após 24h de incubação, mas quando o conteúdo foi passado para o ágar, e incubado por mais 24h, observou-se crescimento bacteriano. Concluiu-se que a concentração de extrato não foi suficiente para matar o microrganismo, apenas inibiu seu crescimento.

Os poços A7, A8 e A9, possuíram a concentração inibitória mínima para a formulação (500µL/mL), dado que os poços estavam límpidos após 24h de incubação, mas quando o conteúdo foi passado para o ágar, e incubado por mais 24h, observou-se crescimento bacteriano. Concluiu-se que a concentração de formulação não foi suficiente para matar o microrganismo, apenas inibiu seu crescimento. Ademais, não foi possível determinar a concentração bactericida mínima para a formulação.

Os poços referentes ao controle de crescimento (E10, E11 e E12), obtiveram o crescimento de *Staphylococcus aureus* assegurando a validade e confiabilidade do teste, uma vez que está garantindo a presença das bactérias no inóculo usado no experimento. Os poços destinados ao controle de DMSO (F10, F11 e F12), apresentaram crescimento para *Staphylococcus aureus* evidenciando que o solvente presente no meio não interfere no crescimento dos microrganismos, dessa forma apenas o extrato agiria inibindo o crescimento dos mesmos. Os poços contendo o controle do antibiótico, não foi observado o crescimento para o microrganismo estudado. Por fim, os poços H10, H11 e H12, referentes ao controle do meio, não obtiveram crescimento de microrganismos, evidenciando que não possuem interferentes presentes no meio de cultura.

7. CONCLUSÃO

O método de secagem das folhas pulverizadas, proporcionou perda de água, onde dado o destino da utilização do extrato em uma formulação com atividade antimicrobiana, se mostrou interessante. O método de extração através da percolação proporcionou um bom rendimento do EEB das folhas de *Melaleuca leucadendron* (20,42%). No desenvolvimento da formulação, a formulação com as concentrações 2% de DMSO, 0,75% de extrato, 15% de poloxamer produziu resultados favoráveis de tamanho de partícula e IPD. Ademais, a concentração 18% de poloxamer proporcionou a formação do hidrogel que mais se aproximou da temperatura alvo.

Considerando os parâmetros avaliados durante o teste de estabilidade preliminar, a formulação produzida durante o estudo produziu resultados consistentes, com constância de pH, temperatura de solidificação e características macroscópicas consideradas normais. Além disso, obteve valor de tamanho de partícula menor que 200 nm, e índice de polidispersão e potencial Zeta considerados satisfatórios para a estabilidade do produto.

A avaliação da atividade antimicrobiana do extrato e da formulação demonstrou que a concentração de 1,56 mg/mL e 500 µL/mL, respectivamente, levaram a inibição do crescimento microbiano de *Staphylococcus aureus*. Não foi possível determinar o CBM da formulação, já o EEB de *Melaleuca leucadendron* conseguiu produzir esse resultado com a concentração de 3,13 mg/mL.

Assim, a produção do hidrogel contendo o EEB de *Melaleuca leucadendron* demonstrou ser uma alternativa farmacológica no tratamento de infecções, por inibir o crescimento *Staphylococcus aureus*, dado a presença de compostos fenólicos, flavonóides, taninos, triterpenos e saponinas, que favorecem a ação antimicrobiana do extrato e da formulação. Além disso, o estudo da formulação, bem como o emprego de matérias primas vegetais em sistema nanoestruturados corrobora para inovação e estudos envolvendo formulações de liberação controlada voltada para fármacos antimicrobianos.

8. REFERÊNCIAS

AMARAL, L. F.; MORIEL, P.; FOGGIO, M. A.; MAZZOLA, P. G. Caryocar brasiliense supercritical CO₂ extract possesses antimicrobial and antioxidant properties useful for personal care products. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, n. 1, p. 154, 2014.

AMPARO, T. R.; BRAGA, V. C. C. V.; SEIBERT, J. B.; SOUZA, G. H. B.; TEIXEIRA, L. F. M.; Métodos para avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de plantas medicinais: a necessidade da padronização. **Revista Infarma Ciências Farmacêuticas**, [S.l.], v. 30, n. 1, p. 50-59, apr. 2018. ISSN 2318-9312.

BHATTACHARYA, A.; J.W. RAWLINS; P. RAY. Polymer grafting and crosslinking 2009, Oxford: **John Wiley & Sons**. x, 341 p.

BORGES, D.B.; FARIAS, M.R.; SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; Comparação das metodologias da Farmacopéia Brasileira para determinação de água em matérias-primas vegetais, e validação da determinação de água em analisador de umidade para *Calendula officinalis* L., *Foeniculum vulgare* Miller, *Maytenus ilicifolia* Mart. ex. Reissek e *Passiflora alata* Curtis. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 15(3): 229-236, Jul./Set. 2005

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Gerência Geral de cosméticos. Guia de estabilidade de produtos cosméticos. Brasília, 2004

BRASIL. Anvisa - Farmacopeia Brasileira, v. 2, 6º Ed. Insumos Farmacêuticos e Especialidades. Brasília, 2019.

BRASIL. Portaria no. 971, de 03 de maio de 2006. Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde, Diário Oficial da União, Brasília, DF, 4 de maio de 2006.

BRUN P; BERNABÈ G; FILIPPINI R; PIOVAN A. In Vitro Antimicrobial Activities of Commercially Available Tea Tree (*Melaleuca alternifolia*) Essential Oils. **Vestn Otorinolaringol.** 76(1),108-116, 2019.

CASTRO, C; SILVA, M. L.; PINHEIRO, A, L.; JACOVINE, L. A. G.; Análise econômica do cultivo e extração do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel. **Revista Árvore**, v. 29. Abr, 2005. <https://doi.org/10.1590/S0100-67622005000200007>

CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute). **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**: approved standards. Wayne, Pennsylvania: CLSI, 2006. (Document CLSI M7-A7).

DIMER, F. A.; FRIEDRICH, R. B.; BECK, R. C. R.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Impactos da nanotecnologia na saúde: produção de medicamentos. **Química Nova**, Vol. 36, No. 10, 1520-1526, 2013.

FARIAS M. R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais In: Simões, C.M.O. et al (Org.) 2003. **Farmacognosia: da planta ao medicamento** 5.ed. Porto Alegre / Florianópolis: Ed. Universidade - UFRGS/ Ed. da UFSC.

FERRÁNDIZ, M. L.; ALCARAZ, M. J. Anti-inflammatory activity and inhibition of arachidonic acid metabolism by flavonoids. **Agents and Actions**, v. 32, n. 3-4, p. 283–8, 1991.

GELATTI, C. L.; BONAMIGO, R. R.; BECKER, A. P.; AZEVEDO, P. A.; *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina: disseminação emergente na comunidade. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. 2009;84(5):501-6.

GIULIANO, E.; PAOLINO, D.; FRESTA, M.; COSCO, D. Drug-Loaded Biocompatible Nanocarriers Embedded in Poloxamer 407 Hydrogels as Therapeutic Formulations. **Medicines**, 2019, 6, 7; doi:10.3390/medicines6010007

HALUCH, S. M; SCHELLIN, L. M; PAN, V. X. X. C.; ALVES, A. L. O.; SANTOS, M. C.; CHEMIN, A. P.; LOPES, V. E. Prospecção de novos antimicrobianos e bactericidas frente a microrganismos de interesse de saúde pública. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v. 3, n. 4, p. 3630-3652. Curitiba-PR, out./dez, 2020. ISSN 2595-573X

HAMIDI, M.; AZADI, A.; RAFIEI, P. Hydrogel nanoparticles in drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 60(15),1638-49, 2008.

HAN, G.; CEILLEY, R. Chronic Wound Healing: A Review of Current Management and Treatments. **Advances in Therapy**. 2017;34(3): 599-610. DOI: 10.1007/s12325-017-0478-y.

ISAAC, V. L. B.; CEFALI, L. C.; CHIARI, B. G.; OLIVEIRA, C.C.L.G.; SALGADO H.R.N.;CORRÊA, M.A. Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada.**, v. 29, n.1, p. 81-96, 2008 ISSN 1808-4532

LAY, M. M.; KARSANI, S. A.; MOHAJER, S.; ABD MALEK, S. N. Phytochemical constituents, nutritional values, phenolics, flavonols, flavonoids, antioxidant and cytotoxicity studies on *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl fruits. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, n. 1, p. 152, 2014.

LEAL, L. R., TELLIS, C. J. M., Farmacovigilância de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil: uma breve revisão. **Revista Fitos**. Rio de Janeiro, Vol, 9(4), 253-303, Out-Dez 2015.

LÊDO, J. C. S. **Questões bioéticas suscitadas pela nanotecnologia**. 2006. 120f. Dissertação (Mestrado em Bioética) - Centro Universitário São Camilo, São Paulo, 2006;

LEE, Ching-Kuo. A New Norlupene from the Leaves of *Melaleuca leucadendron*. **Journal of Natural Products**. 1998, 61, 375-376

LEONARDI, G.R, GASPAR, L.R, Campos PMBGM. Estudo da variação do pH da pele humana exposta à formulação cosmética acrescida ou não das vitaminas A, E ou de ceramida, por metodologia não invasiva. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. 2002; 77(5): 563-569. ISSN 1806-4841.

LOPES, G. C.; SANCHES, A. C. C.; NAKAMURA, C. V; et al. Influence of extracts of *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. and *Stryphnodendron obovatum* Benth. on the cicatrisation of cutaneous wounds in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, n. 2, p. 265–72, 2005.

MACHADO, J. S.; PAIXÃO, J. A.; Prospecção tecnológica comparativa de patentes de produtos cosméticos utilizando metabólitos secundários e preparações cosméticas a partir do uso de nanotecnologia. **Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação**. São Paulo, v.7, n.4. abr.2021.ISSN -2675 –3375.

MAYORAL, J. B.; MORENO, A. C.; MARTINEZ, E. S. M. Potencial zeta en la determinación de carga superficial de liposomas. **Latin-American Journal of Physics Education**. Vol. 8, No. 4, Dec. 2014.

MAZZAFERRO, S.; BOUCHEMAL, K.; PONCHEL, G. Oral delivery of anticancer drugs III: formulation using drug delivery systems. **Drug Discovery Today**, v. 18, n. 1-2, 2013.

MENDONÇA, T., Paula, E. de, CASTRO, S. de, Ribeiro, L. e LANCELLOTTI, M. 2019. Caracterização e avaliação das atividades antimicrobiana de hidrogéis contendo carreadores lipídicos com ciprofloxacina. **Revista dos Trabalhos de Iniciação Científica da UNICAMP**. 27 (nov. 2019), 1–1. DOI:<https://doi.org/10.20396/revpibic2720192653>.

METZKER, P. M. **Fitoterápicos no sistema único de saúde e a importância da assistência farmacêutica**. 2017. 34f. Trabalho de conclusão de curso - Faculdade de educação e meio ambiente, Ariquemes-RO, 2017.

MILLER, T.; COLEN, V.G.; SANDER, B.; GOLAS, M.M.; UEZGUEN, S.; WEIGANDT, M.; GOEPFERICH, A. Drug Loading of Polymeric Micelles. **Pharmaceutical Research**, v.30, n. 2, 2013.

MONTEIRO, M. H. D. A.; MACEDO, H. W.; JUNIOR, A. S.; PAUMGARTTEN, F. J. R. Óleos essenciais terapêuticos obtidos de espécies de *Melaleuca* L. (Myrtaceae Juss.). **Revista Fitos**, [S.l.], v. 8, n. 1, set. 2014.

MONTEIRO, M. S. S. B; SANTOS, T. M; OLIVEIRA, C. A; FREITAS, Z. M. F; SANTOS, E. P. Desenvolvimento e avaliação de hidrogéis de carboximetilcelulose para o tratamento de feridas. **Revista Infarma Ciências Farmacêuticas**, v. 32, e. 1, 2020, pp41-55

OKUNJI, C.O.; OKEKE, C.N.; GUGNANI, H.C.; IWU, M.M. Na antifungal saponin from fruit pulp of *Dracaena manni*. **International Journal of Crude Drug Research**, 28,193-199, 1990.

PATIAS, I. S.; FAUSTO, V. P.; HOMRICH, S. S.; VAUCHER, R. A.; RECH, V. C.; GIONGO, J. L. Estabilidade e atividade antifúngica de nanoemulsão contendo óleo de gerânio incorporada em hidrogel. **Revista Eletrônica Disciplinarum Scientia**. Série: Naturais e Tecnológicas, Santa Maria, v. 17, n. 2, p. 269-283, 2016

PEREIRA, G. G.; DIMER, F. A.; GUTERRES, S. S.; KECHINSKI, C. P.; GRANADA, J. E.; CARDOZO, N. S. M. Formulation and characterization of poloxamer 407: thermoreversible gel containing polymeric microparticles and hyaluronic acid. **Química Nova**, Vol. 36, No. 8, 1121-1125, 2013

PUJIARTI, R; OHTANI, Y.; ICHIURA, H. Physicochemical properties and chemical compositions of *Melaleuca leucadendron* leaf oils taken from the plantations in Java, Indonesia. **The Japan Wood Research Society**, 57, 446–451, 2011. DOI 10.1007/s10086-011-1183-0

QU, J.; ZHAO X.; LIANG, Y.; ZHANG T.; MA, P. X.; GUO, B. An-tibacterial adhesive injectable hydrogels with rapid self-healing, extensibility and compressibility as wound dressing for joints skin wound healing. **Biomaterials**, 2018;183:185-199.

SANTOS, A. L.; SANTOS, S. O.; FREITAS, C. C.; FERREIRA, B. L. A.; AFONSO, I. F.; RODRIGUES, C. R.; CASTRO, H. C. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 6, p. 413-423. Dezembro, 2007.

SANTOS, R. L. **Avaliação da influência da composição dos carreadores lipídicos nanoestruturados sobre o tamanho de partícula e eficiência de encapsulação para a liberação controlada de carvacrol**. Trabalho de conclusão de curso (Farmácia). Centro de ciências biológicas e da saúde. Universidade Federal de Sergipe. São Cristóvão, p. 46-52, 2017.

SARMENTO, B.; RIBEIRO, A.; VEIGA, F.; SAMPAIO, P.; NEUFELD, R.; FERREIRA, D. Alginate/chitosannanoparticles are effective for oral insulin delivery. **Pharmaceutical Research**, v.254, p.2198-206, 2007.

SHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R.; Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, Vol. 26, No. 5, 726-737, 2003.

SHAH, G.; CHAWLA, A.; BAGHEL, U. S. et al. Pharmacognostic standardization of leaves of *Melaleuca leucadendron*. **Pharmacognosy Journal**, v. 5, n. 4, p. 143–148, 2013.

SILVA, C. M. B. **Formulação de gel termossensível mucoadesivo contendo cloridrato de pilocarpina para tratamento de xerostomia**. Tese (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal de Pernambuco. Recife, p. 52, 2017.

SILVA, L. O. P.; NOGUEIRA, J. M. R.; Resistência bacteriana: potencial de plantas medicinais como alternativa para antimicrobianos. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**. Jan, 2021. DOI: 10.21877/2448-3877.202002033.

SILVA, N. C. S.; VÍTOR, A. M.; BESSA, H. H. S.; BARROS, R. M. S.; A utilização de plantas medicinais e fitoterápicos em prol da saúde. **Única cadernos acadêmicos**, v. 2, n. 1, 2021.

SOUSA, F. G.; PONTE, V.; BRANDÃO, M. G. S.; SILVA, A. S.; BARROS, L.; ARAÚJO, T. Análise histórica de diagnósticos de enfermagem relacionados a feridas e lesões de pele. **Revista Enfermagem Atual In Derme**, v. 90, n. 28, 24 dez. 2019.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. Botânica Sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Fenerógamas nativas e exóticas no Brasil baseado em APGII. 2ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008. 704p.

ZALEWSKI, S. SILVA, F. T. O. JESUS, V. C. MARTINES, K. N. M. FURLAN, L. C. ASSAD, M. M. S. SILVA, L. V. S. MARIN, M. T. Levantamento de dados da população de

Araraquara acerca do uso de plantas medicinais e o conhecimento sobre medicamentos fitoterápicos na XIX semana de assistência farmacêutica estudantil. **Revista De Ciências Farmacêuticas Básica E Aplicada**. v. 38 Supl. 1. Agosto, 2017.

ZORZI, G.K.; CARVALHO, E.L.S.; VON POSER, G.L.; TEIXEIRA, H.F. On the use of nanotechnology-based strategies for association of complex matrices from plant extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 25 (4), 426-436, 2015.

