



UFOP

Universidade Federal
de Ouro Preto

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



Escola de Farmácia

LUAN DE OLIVEIRA CAPATO

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA CINÉTICA DE LIBERAÇÃO DO
EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DAS FOLHAS DE *Protium spruceanum*
ENCAPSULADO EM MICELAS**

**OURO PRETO
2025**

LUAN DE OLIVEIRA CAPATO

**Avaliação *in vitro* da cinética de liberação do extrato etanólico bruto das folhas de
Protium spruceanum encapsulado em micelas**

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

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Henrique Bianco de Souza

Coorientadora: Dra. Viviane Flores Xavier

OURO PRETO
2025

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

C236a Capato, Luan de Oliveira.

Avaliação in vitro da cinética de liberação do extrato etanólico bruto das folhas de *Protium spruceanum* encapsulado em micelas. [manuscrito] / Luan de Oliveira Capato. - 2025.

45 f.: il.: color., gráf., tab..

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

Coorientadora: Dra. Viviane Flores Xavier.

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

1. Nanotecnologia. 2. Farmacocinética. 3. Análise cromatográfica. 4. Produtos naturais. 5. *Protium spruceanum*. I. de Souza, Gustavo Henrique Bianco. II. Xavier, Viviane Flores. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU 615.014

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



FOLHA DE APROVAÇÃO

Luan de Oliveira Capato

**Avaliação *in vitro* da cinética de liberação do extrato etanólico bruto das folhas de
Protium spruceanum encapsulado em micelas**

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 02 de setembro de 2025

Membros da banca

Prof. Dr. Gustavo Henrique Bianco de Souza - Orientador - Universidade Federal de Ouro Preto - Escola de Farmácia

Dra. Viviane Flores Xavier - Co-orientadora - Universidade Federal de Ouro Preto - NUPEB

Dra. Tatiane Roquete Amparo - Universidade Federal de Ouro Preto - NUPEB

Me. Doutorando Lucas Resende de Sousa - Universidade Federal de Ouro Preto - CIPHARMA

[Titulação] - Digite o nome (apenas a primeira letra de cada nome maiúscula) - (Nome da instituição por extenso)

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 26/09/2025



Documento assinado eletronicamente por **Gustavo Henrique Bianco de Souza, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 26/09/2025, às 10:21, 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 **0982612** e o código CRC **CC23E832**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo sustento e pelo amparo ao longo da minha trajetória acadêmica. Aos meus pais, Jadson e Aline, meu exemplo de vida e o motivo pelo qual cheguei até aqui: obrigado por todo amor, carinho e apoio que sempre me ofereceram em abundância. Ao meu irmão, Jean, meu melhor amigo e companheiro, obrigado por sempre estar ao meu lado para me apoiar e me fazer sorrir. Aos meus avós, Albério e Fátima, Edmar e Rose, por terem formado uma base familiar tão acolhedora e cuidadosa, que sempre me confortou e abraçou em todos os momentos. À toda minha família, que sempre me dedicou apoio e carinho incondicional.

Agradeço à Júlia por todo companheirismo e amor. Sua companhia tornou toda a jornada mais serena. Aos amigos da Escola de Farmácia: Caio, Bia, Camila, João, Bruna, Itallo, Henrique e Caio Mortati. As vivências com vocês são as melhores lembranças que carrego da faculdade. Muito obrigado!

Agradeço à Universidade Federal de Ouro Preto pela qualidade de ensino e pelas oportunidades de crescimento acadêmico e pessoal proporcionadas. À Escola de Farmácia da UFOP, seu corpo docente e administrativo, pelo acolhimento e pela instrução oferecida.

Agradeço ao professor Gustavo Bianco por toda orientação, aconselhamento e conhecimento compartilhado. À Viviane, por toda dedicação e apoio ao longo da minha trajetória. Ao Laboratório de Fitotecnologia da UFOP, pelo espaço e aprendizado proporcionados, que fortaleceram minha experiência acadêmica e profissional. Aos órgãos de fomento CNPq, CAPES e FAPEMIG, pelo financiamento que tornou esta pesquisa possível.

RESUMO

Apesar do avanço da tecnologia de síntese de novos fármacos e moléculas, os produtos naturais seguem sendo uma grande área de exploração e inovação farmacêutica. Formulações transdérmicas à base de produtos naturais têm sido amplamente estudadas e desenvolvidas, devido às grandes vantagens obtidas por suas características intrínsecas. Para a validação de formulações desse tipo, a legislação brasileira preconiza a avaliação de sua cinética de liberação *in vitro*. Portanto, este estudo avaliou a cinética de liberação de uma formulação contendo o extrato etanólico bruto das folhas de *Protium spruceanum* (F-EEBP), espécie vegetal conhecida por suas propriedades anti-inflamatórias. Inicialmente, o método analítico realizado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), foi validado através da avaliação dos parâmetros: seletividade, linearidade, efeito matriz, precisão, exatidão, limites de quantificação, detecção e robustez. O ensaio de liberação *in vitro* foi realizado em célula de difusão vertical com coletor automático Hanson Research® por 24 horas. Após os procedimentos experimentais foi realizada a análise matemática, utilizando-se o modelo cinético Korsmeyer-Peppas onde a formulação demonstrou utilizar o mecanismo de transporte não-Fickiano. Neste modelo, o processo de liberação dos ativos, ocorrem fenômenos de tensão e quebra das cadeias poliméricas, conseqüentemente, o núcleo acaba se rompendo e ocorre a liberação. Esse estudo cumpriu os objetivos propostos e corroborou com uma etapa da validação da formulação, apresentando-se também como base para a sequência de estudo do produto. Espera-se que os resultados obtidos sirvam de referência para aprimoramentos farmacotécnicos, cinéticos e físico-químicos da formulação, bem como para discussões clínicas futuras envolvendo o produto estudado, como a definição da posologia ideal. Além disso, a validação do método analítico realizada pode auxiliar em estudos futuros com o mesmo tipo de formulação, com extratos vegetais e em pesquisas similares.

Palavras-chave: Compostos naturais, estudos de liberação, formulações nanoestruturadas, *Protium spruceanum*, validação de método analítico.

ABSTRACT

Despite advances in the synthesis of new drugs and molecules, natural products remain a major field of pharmaceutical exploration and innovation. Transdermal formulations based on natural products have been widely studied and developed due to the significant advantages provided by their intrinsic characteristics. For the validation of such formulations, Brazilian legislation requires the evaluation of their *in vitro* release kinetics. Therefore, this study evaluated the cutaneous release kinetics of a formulation containing the crude ethanolic extract of *Protium spruceanum* leaves (F-EEBP), a plant species known for its anti-inflammatory properties. Initially, the analytical method performed by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) was validated through the evaluation of the following parameters: selectivity, linearity, matrix effect, precision, accuracy, limits of quantification, detection, and robustness. The *in vitro* release assay was carried out in a vertical diffusion cell with a Hanson Research® automatic collector for 24 hours. After the experimental procedures, mathematical analysis was performed using the Korsmeyer-Peppas kinetic model, in which the formulation demonstrated a non-Fickian transport mechanism. In this model, the release process of the active compounds involves stress and rupture phenomena of the polymeric chains, consequently leading to core breakdown and subsequent release. This study fulfilled the proposed objectives and contributed to a stage of the formulation's validation, also serving as a basis for subsequent investigations of the product. The results obtained are expected to serve as a reference for further pharmaceutical, kinetic, and physicochemical improvements of the formulation, as well as for future clinical discussions involving the studied product, such as the definition of the ideal dosage regimen. In addition, the analytical method validation performed may support future studies with the same type of formulation, with plant extracts, and in similar research.

Keywords: Natural compounds, release studies, nanostructured formulations, *Protium spruceanum*, analytical method validation.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Frutos, folhas e caule de <i>Protium Spruceanum</i> | 16 |
| Figura 2 - Tronco de <i>Protium Spruceanum</i> | 16 |
| Figura 3 - Representação estrutural de uma micela polimérica..... | 18 |
| Figura 4 - Representação de um sistema de células de difusão de Franz..... | 19 |
| Figura 5 - Cromatogramas do EEBP e Rutina em CLAE-DAD, extraídos em 254 nm..... | 25 |
| Figura 6 - Representação das estruturas químicas das moléculas rutina, quercitrina e quercetina..... | 25 |
| Figura 7 - Cromatogramas do EEBP (1mg/mL) em CLAE-DAD, extraído em 254 nm..... | 26 |
| Figura 8 - Cromatogramas do F-EEBP (5% no vial) em CLAE-DAD, extraído em 254 nm..... | 26 |
| Figura 9 - Pureza de pico da rutina na análise do EEBP 1mg/mL e Rutina 70ug/mL em CLAE-DAD..... | 27 |
| Figura 10 - Pureza de pico da rutina na análise da FB-EEBP e Rutina 70ug/mL em CLAE-DAD..... | 28 |
| Figura 11 - Dispersão dos resíduos..... | 29 |
| Figura 12 - Curvas analíticas médias (n=3) da rutina no EEBP, rutina na FB-EEBP e rutina em metanol..... | 29 |
| Figura 13 - Perfil de liberação da F- EEBP e do EEBP em função do tempo..... | 34 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Parâmetros avaliados na linearidade..... | 28 |
| Tabela 2 - Análise da precisão do método analítico..... | 30 |
| Tabela 3 - Análise da exatidão do método analítico..... | 31 |
| Tabela 4 - Coeficiente de correlação no teste de robustez..... | 32 |
| Tabela 5 - Dados da cinética de liberação da F-EEBP..... | 36 |
| Tabela 6 - Mecanismo de liberação em função do expoente de liberação..... | 37 |

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CA - Concentração analisada

CLAE - Cromatografia líquida de alta eficiência

CMC - *Critical micelle concentration*

CMD - Concentração média determinada

CTA - Concentração teórica do analito

DAD - Detector de arranjo de diodos

DP - Desvio padrão

DPR - Desvio padrão relativo

EEBP - Extrato etanólico bruto de *Protium spruceanum*

EM - Efeito matriz

EMA - *European Medicines Agency*

F-EEBP - Formulação contendo o extrato etanólico bruto de *Protium spruceanum*

FB-EEBP - Formulação branco

FDA - *Food and Drug Administration*

IC - Inclinação da curva

ICH - *The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*

LD - Limite de detecção

LCST - *Lower critical solution temperature*

LQ - Limite de quantificação

OMS - Organização Mundial de Saúde

PPG CiPharma - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (UFOP)

RDC - Resolução da Diretoria Colegiada

RMN - Ressonância magnética nuclear TR - Taxa de recuperação

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| SUMÁRIO | 9 |
| 1. INTRODUÇÃO | 10 |
| 2. JUSTIFICATIVA | 12 |
| 3. REFERENCIAL TEÓRICO | 13 |
| 3.1. Produtos naturais..... | 13 |
| 3.2. <i>Protium spruceanum</i> | 14 |
| 3.3. Formulações nanoestruturadas..... | 17 |
| 3.3.1. Formulações micelares..... | 17 |
| 3.4. Cinética de liberação..... | 18 |
| 4. OBJETIVO | 20 |
| 4.1. Objetivo geral..... | 20 |
| 4.2. Objetivos específicos..... | 20 |
| 5. METODOLOGIA | 21 |
| 5.1. Obtenção da formulação..... | 21 |
| 5.2. Determinação das condições cromatográficas..... | 21 |
| 5.3. Validação do método analítico..... | 22 |
| 5.3.1. Seletividade..... | 22 |
| 5.3.2. Linearidade..... | 22 |
| 5.3.3. Efeito matriz..... | 22 |
| 5.3.4. Precisão..... | 22 |
| 5.3.5. Exatidão..... | 23 |
| 5.3.6. Limites de quantificação e de detecção..... | 23 |
| 5.3.7. Robustez..... | 23 |
| 5.4. Determinação da solubilidade da rutina..... | 23 |
| 5.5. Estudo de liberação <i>in vitro</i> | 23 |
| 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 25 |
| 6.1. Determinação das condições cromatográficas..... | 25 |
| 6.2. Validação do método..... | 26 |
| 6.2.1. Seletividade..... | 26 |
| 6.2.2. Linearidade..... | 28 |
| 6.2.3. Efeito matriz..... | 29 |
| 6.2.4. Precisão..... | 30 |
| 6.2.5. Exatidão..... | 31 |
| 6.2.6. Limites de quantificação e de detecção..... | 31 |
| 6.2.7. Robustez..... | 32 |
| 6.3. Determinação da solubilidade da rutina..... | 32 |
| 6.4. Liberação..... | 33 |
| 7. CONCLUSÃO | 39 |
| 8. REFERÊNCIAS | 40 |

1. INTRODUÇÃO

Os primeiros registros do uso de produtos naturais com finalidade terapêutica, são datados de mais de 4600 anos atrás. Além de muito antigo, seu emprego é de abrangência global e carrega muitas práticas e tradições dos mais diversos povos e culturas (NEWMAN et al., 2000). Embora possua registros muito antigos, a atividade terapêutica baseada em produtos naturais não é algo ultrapassado. Atualmente, muitos estudos têm trazido novas aplicabilidades e benefícios dessa prática. Produtos naturais têm potencial para contribuir e potencializar tratamentos de doenças muito prevalentes nos tempos atuais, como câncer, diabetes, dores crônicas, malária e muitas outras. Logo, estes produtos se posicionam como uma alternativa de tratamento menos agressiva, ou até mesmo aprimorando os tratamentos clássicos (NAEEM et al., 2022; DZOBO, 2022). A cada ano, novas doenças e epidemias surgem em todo o mundo, e os produtos naturais sempre serão possíveis contribuintes no seu combate. Destaca-se a descoberta de compostos naturais com potencial de tratamento contra a mpox, zoonose descoberta no século passado, mas que causou recentemente, uma epidemia global (ABDULJALIL et al., 2023).

A riqueza vegetal no planeta, faz com que haja inúmeras espécies com as mais variadas empregabilidades terapêuticas. A *Protium spruceanum*, planta pertencente à família Burseraceae, apresenta atividade anti-inflamatória descrita e bem elucidada (AMPARO et al., 2019). Além disso, alguns autores descreveram atividades antinociceptivas e antimicrobianas provenientes desta mesma espécie (RODRIGUES et al., 2013; AMPARO et al., 2018). Portanto, a *Protium spruceanum* se destaca como um excelente objeto de estudo das ciências farmacêuticas.

Dentro do desenvolvimento de formulações farmacêuticas, grandes vantagens são observadas em produtos de uso tópico. Estas, propiciam tratamentos mais seguros, evitando maior toxicidade e efeitos adversos, bem como o contorno de limitações impostas pela via oral de administração (RUELA et al., 2016). Entretanto, toda via de administração apresenta suas limitações, e as da via tópica estão associadas principalmente às características do tecido cutâneo, que intrinsecamente é uma barreira do organismo (BOLLA et al., 2020). Assim, o desenvolvimento de formulações contendo carreadores nanoestruturados se apresenta como uma alternativa muito interessante na melhora da absorção e permeação de membranas, contornando a limitação chave da via (ZHAI & ZHAI, 2014).

Dessa forma, a regulamentação brasileira para a aprovação de formulações de uso tópico e transdérmico é orientada pelo Guia nº 20/2019, publicado pela Agência Nacional de

Vigilância Sanitária (Anvisa). Esse guia descreve os requisitos, métodos de análise e parâmetros que devem ser atendidos para que uma formulação com essas características seja aprovada. Entre os ensaios exigidos, destaca-se o ensaio de liberação *in vitro*, essencial para avaliar a liberação do princípio ativo em um sistema que simula as condições da pele humana (BRASIL, 2021).

Um dos modelos mais utilizados e reconhecidos pela sua eficácia nesse tipo de análise é a célula de difusão de Franz, que consegue reproduzir de forma satisfatória o processo de absorção cutânea observado em condições *in vivo*. Logo, este modelo é amplamente recomendado para ensaios de liberação *in vitro* (FRANZ, 1975; KICHOU et al., 2023; RUIZ et al., 2022).

2. JUSTIFICATIVA

Sabe-se que produtos de origem natural podem apresentar vantagens dentre os sintéticos, como por exemplo, a melhor biocompatibilidade. Logo, caracterizam-se como uma excelente alternativa em diversos tratamentos, principalmente se formulados em nanoestruturas, o que pode conferir melhor liberação do princípio ativo, mais eficácia e menos efeitos adversos.

O conhecimento do perfil de liberação de uma formulação é fundamental para o pleno conhecimento do produto, bem como direcionar aprimoramentos farmacotécnicos, cinéticos e físico-químicos. Entender o comportamento da liberação, pode orientar estudos de definição de posologia, visando garantir eficácia e segurança da formulação. Assim, os conceitos discutidos neste estudo podem servir como base referencial para avanços futuros.

Com o grande avanço na pesquisa e desenvolvimento de produtos transdérmicos e tópicos, a legislação brasileira preconiza testes e ensaios de análise de qualidade para a validação de novas formulações, sendo o sistema de células de difusão de Franz um dos mais usuais.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. Produtos naturais

Desde a antiguidade, a utilização de produtos naturais no tratamento e prevenção de doenças é conhecida. Mesmo antes do conhecimento de métodos de extração, solventes extratores e até mesmo das substâncias responsáveis pelos efeitos terapêuticos, uma ampla variedade de espécies vegetais já era empregada como ingrediente em diferentes produtos (NAJMI et al., 2022).

Apesar do grande avanço tecnológico na síntese de compostos farmacêuticos, a utilização de componentes naturais como matéria prima de novos fármacos não foi deixada de lado. Há uma grande quantidade de fármacos lançados nos últimos anos que consistem em produtos naturais, derivados vegetais e análogos semissintéticos (NEWMAN & CRAGG, 2020). No ano de 2023, 55 novas drogas foram aprovadas pelo FDA (*Food and Drug Administration*), órgão regulatório farmacêutico americano de grande relevância internacional. Destas, 19 são derivadas de produtos naturais, ou seja, 34,5% desse mercado (ZHONGWEN et al., 2024).

É comum que a população de forma geral, acredite que os medicamentos obtidos através de produtos naturais sejam mais simples e menos eficazes. Entretanto, atualmente conhece-se uma gama de variáveis distúrbios, doenças e condições de saúde, em que os produtos derivados de matéria prima natural têm ação terapêutica conhecida, como: câncer, infecções, doenças cardiovasculares, autoimunes, neurológicas e metabólicas (ZHONGWEN et al., 2024). De acordo com a OMS (Organização Mundial de Saúde), aproximadamente 60% da população global faz uso da fitoterapia. E em países em desenvolvimento, 80% da população tem a fitoterapia como principal tratamento de saúde primário (HILAL et al., 2024).

Um dos motivos da persistente utilização de produtos naturais em formulações farmacêuticas se dá ao fato de que produtos naturais tendem a ser mais biocompatíveis. Podendo apresentar parâmetros farmacocinéticos mais adequados (ANAND et al., 2019). Portanto, a tecnologia farmacêutica avançou muito nesse campo, pois houve um somatório do conhecimento etnofarmacológico tradicional e métodos biotecnológicos e informatizados avançados que aprimoram a identificação e o desenvolvimento de compostos bioativos (CHIHOMVU et al., 2024). Até meados do século 20, muitos metabólitos secundários ainda não haviam sido identificados e bem descritos. Porém com o surgimento de tecnologias como cromatografia, eletroforese e RMN (ressonância magnética nuclear), foi possível

melhor identificá-los, bem como definir melhor suas características físico-químicas, sua rota biossintética e consequentemente elucidar propostas farmacológicas (HILAL et al., 2024).

No âmbito dos produtos naturais vegetais, os metabólitos secundários são os principais componentes relacionados às ações terapêuticas (AGGARWAL et al., 2024). Dentre eles há várias classes existentes e algumas se destacam no potencial farmacêutico. Os alcalóides são conhecidos por serem um grande grupo de substâncias orgânicas de baixo peso molecular que apresentam nitrogênio em sua estrutura e são encontrados naturalmente. Seu uso terapêutico é reportado para tratamento de: febre, problemas respiratórios, dores, inflamações, infecções e muitas outras condições (GUPTA, 2024). Além dos alcalóides, destaca-se os compostos fenólicos, conhecidos por terem subclasses muito importantes para a indústria farmacêutica, como os flavonóides. Estes são caracterizados por possuírem dois anéis aromáticos conectados por uma ponte de três carbonos. Eles são responsáveis por muitas das cores vibrantes de frutas, vegetais e flores. Seu uso terapêutico também é bem vasto pois apresenta atividade: antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória, antidiabética e muitas outras (HASNAT et al., 2024).

3.2. *Protium spruceanum*

A família Burseraceae apresenta uma distribuição geográfica ampla, compreendendo cerca de 18 gêneros e 700 espécies já descritas. Na América do Sul, destaca-se o gênero *Protium*, que representa o mais diverso da família, com 135 espécies identificadas. As espécies pertencentes a esse gênero são amplamente reconhecidas pela capacidade de produzir óleos essenciais, característica que as confere um elevado potencial de aplicação na área farmacêutica. Essa propriedade não é exclusiva do gênero *Protium*, sendo também observada em outras espécies da família, como a *Commiphora myrrha*, tradicionalmente utilizada para fins terapêuticos em regiões da África e da Ásia (RÜDIGER et al., 2007).

A Burseraceae tem sido amplamente empregada em diferentes contextos, que vão desde práticas tradicionais indígenas até a indústria cosmética e de fragrâncias. Essa versatilidade está relacionada à produção de exsudatos e resinas voláteis pelas plantas da família, substâncias com múltiplas aplicações. Gêneros como *Canarium*, *Boswellia* e *Commiphora* se destacam nesse setor, sendo utilizados na produção de fragrâncias e como agentes fixadores em perfumes, especialmente na perfumaria oriental. Na região amazônica, espécies dessa família têm papel relevante para as populações locais, servindo como matéria prima para acender fogo, fabricar tintas e canoas, além de fazerem parte da dieta humana e animal. Diversos mamíferos e aves consomem os frutos produzidos por plantas da Burseraceae (MACHADO et al., 2003). Além de sua relevância na alimentação e no uso

artesanal tradicional, a família Burseraceae também possui aplicações no campo terapêutico. Diversas espécies do gênero *Protium* são amplamente utilizadas na medicina popular para o tratamento de diferentes enfermidades, o que evidencia a presença de uma diversidade de compostos ativos nesses vegetais. Ensaio farmacológicos conduzidos com essas espécies, apontam propriedades gastroprotetoras, hepatoprotetoras, antialérgicas e anti-inflamatórias (RODRIGUES et al., 2013).

Análises fitoquímicas realizadas com espécies do gênero *Protium* indicam que seus principais constituintes são terpenos, com variações de acordo com a espécie estudada, sendo a alfa-amirina e a beta-amirina, os compostos mais encontrados. A identificação desses metabólitos estimulou o desenvolvimento de novos estudos, voltados à investigação da relação entre essas substâncias e as atividades farmacológicas tradicionalmente associadas às plantas (RÜDIGER et al., 2007; RODRIGUES et al., 2013). Ressalta-se, ainda, que a concentração desses compostos pode ser influenciada por fatores sazonais, como o período do ano em que ocorre a coleta do material vegetal (MACHADO et al., 2003).

A espécie *Protium spruceanum*, foco deste estudo, apresenta-se como uma árvore de grande porte, comum em regiões de alta umidade, e que pode chegar a 20 metros de altura (MENEZES FILHO, 2021). As **figuras 1 e 2** trazem os aspectos morfológicos da espécie. Conhecida popularmente como breu-branco, a *Protium spruceanum* é reconhecida por suas propriedades anti-inflamatórias. Essa atividade está relacionada, principalmente, à presença dos triterpenos alfa-amirina e beta-amirina, encontrados nas frações apolares do extrato vegetal, bem como aos taninos e flavonoides presentes nas frações polares (RODRIGUES et al., 2013; AMPARO et al., 2019). O efeito anti-inflamatório do extrato hidrometanólico é atribuído à modulação de diversas substâncias envolvidas na resposta inflamatória, como citocinas, enzimas inflamatórias, óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio. A ação anti-inflamatória ocorre, principalmente, pela indução da interleucina-10, uma citocina que atua como inibidor potente de outras citocinas pró-inflamatórias. Estudos demonstraram resultados significativos com extratos obtidos tanto das raízes, quanto das folhas de *Protium spruceanum* (AMPARO et al., 2019).

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



Fonte: Resultado de busca para *Protium spruceanum* (Benth.) Engl. com filtros de “material vivo” e forma de vida “árvore”. Disponível em: <https://specieslink.net/search>. Acesso em: 29/07/2025. Dados provenientes dos herbários HDJF e CEN.

Figura 2 -Tronco de *Protium Spruceanum*



Fonte: http://ecologia.ib.usp.br/guiaigapo/familias/burseraceae/protium_spruceanum/protium_spruceanum.html. Acesso em: 29/07/2025.

3.3. Formulações nanoestruturadas

A administração de medicamentos pela via cutânea traz numerosas vantagens para um tratamento. Sabe-se que a utilização dessa via é menos invasiva, gera menos efeitos adversos sistêmicos, apresenta menor toxicidade, e não passa pelo metabolismo de primeira passagem. Com isso, esses fatores podem contribuir para a melhor adesão do indivíduo a um tratamento, o que se torna mais uma vantagem da via transdérmica. Entretanto, a administração tópica pode não ser tão simples, já que a pele é naturalmente uma barreira de proteção que muitas vezes pode não permitir a permeação de fármacos (BOLLA et al., 2020).

Portanto, a quantidade de fármacos que podem ser administrados via transdérmica é limitada, e além disso essa via pode apresentar algumas desvantagens, como: possibilidade de irritação no local da aplicação, seja relacionada à droga ou a algum excipiente. Porém, pensando nisso, foram desenvolvidos diversos tipos de carreadores que facilitam a passagem do fármaco pela pele. Assim, moléculas com pouca afinidade à pele e com pouca capacidade de permeação podem atravessar essa barreira se forem associadas a um carreador ideal (ESCOBAR-CHÁVEZ et al., 2012).

Existem diversos carreadores diferentes que podem ser utilizados na administração de fármacos via cutânea. Eles podem apresentar diferentes características, vantagens e desvantagens, conforme a natureza do carreador. Mas, de forma geral, algumas propriedades físico-químicas são universalmente conhecidas pela sua influência na permeação ou não do fármaco, como: rigidez, formato esférico, carga superficial positiva e tamanho pequeno, que favorecem a permeação (ESCOBAR-CHÁVEZ et al., 2012). Os carreadores podem ser nanoemulsões, sistemas vesiculares, nanopartículas lipídicas ou poliméricas, nanocristais ou micelas (PAIVA-SANTOS et al., 2022).

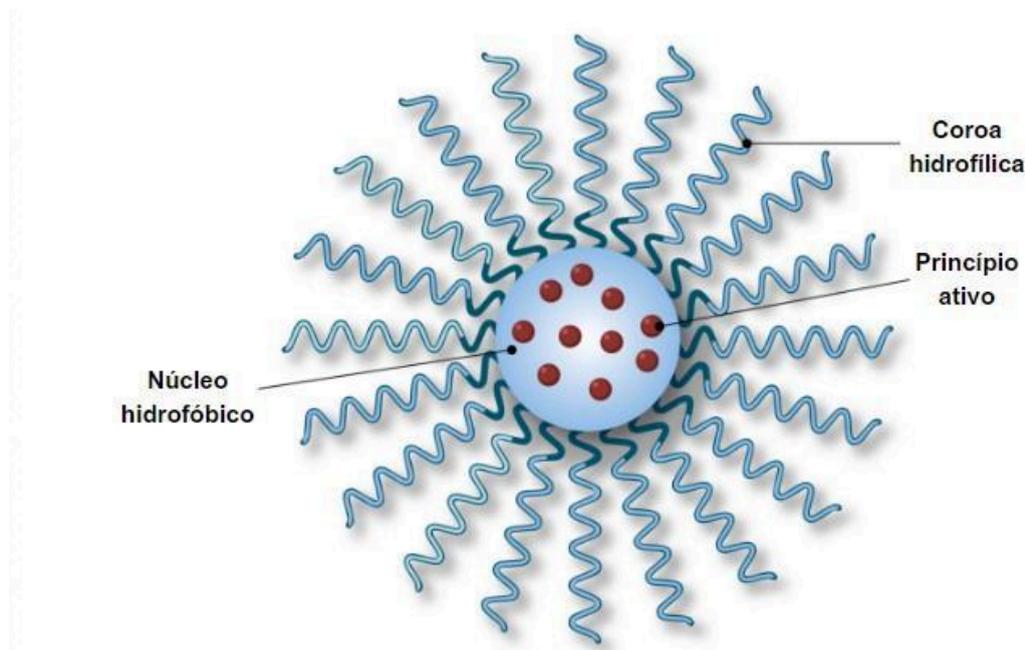
3.3.1. Formulações micelares

As formulações micelares têm tido grande destaque recentemente, devido à variedade de polímeros que podem ser utilizados na sua criação, gerando uma grande versatilidade e diversidade de aplicações. A depender do tipo de micela, pode-se obter diferentes perfis de permeação e absorção, podendo ter ação local ou até mesmo sistêmica. Assim, as micelas variam basicamente conforme seu polímero de origem e método de obtenção (KOTTA et al., 2022).

O poloxamer 407 é um copolímero tribloco não iônico constituído por unidades de polietilenoglicol (PEO) e polipropilenoglicol (PPO), dispostas na forma PEO–PPO–PEO, o que lhe confere caráter anfifílico. Em meio aquoso, apresenta a capacidade de autoagregação, formando micelas em que o núcleo hidrofóbico de PPO acomoda moléculas lipofílicas,

enquanto a coroa hidrofílica de PEO interage com a fase aquosa, favorecendo a estabilidade coloidal. Essas propriedades tornam o poloxamer 407 amplamente aplicado em formulações farmacêuticas nanoestruturadas, atuando como solubilizante, estabilizador e veículo de liberação controlada, especialmente em sistemas como micelas, nanocápsulas e hidrogéis termossensíveis, que apresentam comportamento sol-gel dependente da temperatura, permanecendo líquidos em condições ambientais e formando géis em temperaturas fisiológicas (DUMORTIER et al., 2006). A **figura 3** representa a estrutura de uma micela polimérica.

Figura 3: Representação estrutural de uma micela polimérica.



Fonte: Adaptado de PAIVA-SANTOS et al., 2022.

Portanto, a aplicação de micelas pode melhorar significativamente a eficácia de um medicamento. Nesse sentido, NEGI et al., 2020 comprovou o aumento da eficácia de um fármaco de origem natural de uso tópico por meio da utilização de micelas. A timoquinona, usualmente utilizada como cicatrizante, foi formulada a partir de micelas de quitosana-lectina e apresentou eficácia superior à timoquinona tradicional e até mesmo à sulfadiazina de prata (outro fármaco amplamente utilizado como cicatrizante).

3.4. Cinética de liberação

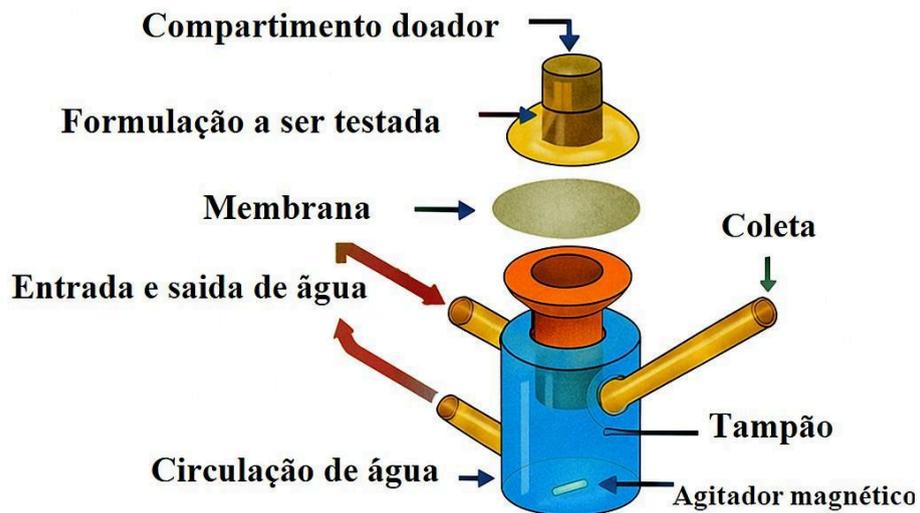
Como discutido ao longo deste trabalho, a eficácia de um fármaco administrado por via tópica depende diretamente de certas propriedades da formulação em que está inserido. Dessa forma, é fundamental a realização de ensaios específicos que permitam avaliar a

liberação e, conseqüentemente, a capacidade de permeação do ativo. Nesse contexto, os testes de liberação *in vitro* se destacam como ferramentas essenciais para quantificar a velocidade e a extensão da liberação do fármaco (TIFFNER et al., 2018).

No Brasil, os critérios de qualidade exigidos para o registro de formulações tópicas e transdérmicas são definidos na segunda edição do Guia nº 20/2019 da ANVISA. Esse documento estabelece condições e parâmetros para a avaliação da qualidade desses produtos, incluindo a obrigatoriedade de ensaios laboratoriais específicos. Entre esses, o teste de liberação *in vitro* é fortemente recomendado durante a fase de desenvolvimento, sendo um dos principais requisitos para a posterior aprovação da formulação (BRASIL, 2021).

A metodologia de liberação *in vitro* foi grandemente aprimorada em 1975, quando Thomas Franz propôs o modelo conhecido como célula de difusão de Franz (**Figura 4**). Esse novo método proporcionou uma forma eficiente de simular o processo de permeação cutânea em condições controladas de laboratório, aproximando-se dos resultados esperados em testes *in vivo*. Desde então, a técnica tem sido amplamente empregada em pesquisas e avaliações farmacotécnicas em todo o mundo (FRANZ, 1975; VORA et al., 2022; RINCÓN et al., 2021).

Figura 4: Representação de um sistema de células de difusão de Franz.



Fonte: adaptado de SILVA et al., 2010.

4. OBJETIVO

4.1. Objetivo geral

Avaliar a cinética de liberação do extrato etanólico bruto das folhas de *Protium spruceanum* encapsulado em micelas.

4.2. Objetivos específicos

- Validar o método de quantificação do marcador fitoquímico no extrato etanólico bruto das folhas de *Protium spruceanum*;
- Otimizar o fluido receptor;
- Realizar o ensaio de liberação *in vitro*;
- Quantificar o marcador fitoquímico por CLAE;
- Caracterizar o perfil de liberação da formulação.

5. METODOLOGIA

5.1. Obtenção da formulação

Os extratos utilizados neste estudo foram obtidos previamente nos trabalhos de Cruz, 2022 e Monteiro, 2022. Foi utilizada a técnica de percolação exaustiva, sendo o solvente extrator, álcool etílico a 70% (CRQ®) para a amostra de *P. spruceanum* e álcool etílico absoluto (Chemiflex®) para a amostra de *M. leucadendron*.

Folhas da espécie *P. spruceanum* (Benth.) Engler., foram coletadas no dia 04 de agosto de 2020 em Lavras-MG (entre coordenadas 21°17'33, 6"S e 44°59'15, 1"N, 21°18'11, 9"S e 44°59'18, 8"N). Exsicata: 16399 HESAL (Herbário da Universidade Federal de Lavras). Registro no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN): A2B5290.

Para obtenção do hidrogel, o extrato foi solubilizado em etanol 99,8% PA, juntamente com polaxamer. Posteriormente, o solvente foi evaporado em rota-evaporador (Fisatom®), a 40°C e pressão reduzida. Após completa evaporação, reidratou-se com água ultrapura, até completar o volume de 20 mL, sob agitação magnética. A formulação foi armazenada em geladeira para reduzir a espuma. A formulação “branco” foi executada da mesma maneira, com a retirada dos extratos.

5.2. Determinação das condições cromatográficas

Para este estudo, foram utilizadas as condições cromatográficas inicialmente estabelecidas por AMPARO et al., 2019, com modificações, para adequação às amostras em teste. O desenvolvimento do método analítico foi conduzido utilizando sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) da marca Waters®, modelo Alliance 2695, equipado com detector de arranjo de diodos (DAD), modelo 2996. As análises foram realizadas no Laboratório Multiusuário 1, pertencente ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPG CiPharma) da UFOP.

Para as análises cromatográficas, a coluna Phenomenex Luna® C18 (2), 100 Å, 5 µm, com dimensões de 250 x 4,6 mm foi utilizada. A fase móvel foi composta por metanol (Sigma Aldrich®, grau cromatográfico, pureza 99,5%) e água ultrapura com 0,5% de ácido acético (Proc9®), com resistividade de 18,2 MΩ·cm a 25°C. A eluição foi realizada em gradiente, conforme a seguinte programação: 10–20% de metanol (0–5 min), 20–40% (5–10 min), 40–60% (10–20 min), 60–100% (20–30 min), 100–10% (30–35 min), e manutenção em 10% até 40 min. A vazão foi ajustada para 1,0 mL/min, a temperatura mantida a 30°C e o volume de injeção foi de 20 µL. As detecções ocorreram a 254 nm.

5.3. Validação do método analítico

A validação da metodologia empregada para quantificar rutina no extrato etanólico bruto de *Protium spruceanum* (EEBP) e na formulação contendo o extrato (F-EEBP) seguiu as diretrizes propostas pela RDC nº 166/2017 da Anvisa. Esta resolução define os parâmetros obrigatórios para validação de métodos utilizados em insumos farmacêuticos, medicamentos e produtos biológicos ao longo de todas as fases de produção (BRASIL, 2017). Seguindo as orientações do documento, os principais critérios avaliados foram: seletividade, linearidade, efeito matriz, precisão, exatidão, robustez, limites de detecção e quantificação. As amostras de EEBP, F-EEBP e a solução padrão de rutina foram preparadas em metanol (grau cromatográfico, Sigma Aldrich®) e filtradas por membranas PVDF de 0,22 µm.

5.3.1. Seletividade

A seletividade do método foi verificada por meio de amostras de EEBP e da formulação branco (FB-EEBP) enriquecidas com padrão de rutina (70 µg/mL). A ausência de picos de componentes das amostras no tempo de retenção da rutina, comprova a especificidade do método. A pureza do pico correspondente à rutina foi avaliada por meio dos parâmetros de ângulo e limite de pureza, utilizando o software da Waters®.

5.3.2. Linearidade

Para a análise da linearidade, foram preparadas seis concentrações distintas do padrão de rutina (1,0; 5,0; 10,0; 20,0; 35,0 e 70,0 µg/mL), todas em metanol, com injeções realizadas em triplicata. A curva analítica foi obtida por regressão linear, utilizando as áreas dos picos cromatográficos. O coeficiente de determinação (r^2), o coeficiente de correlação (r), os resíduos e a significância estatística da inclinação da reta foram analisados com auxílio do software GraphPad Prism® versão 5.0.

5.3.3. Efeito matriz

O estudo do efeito matriz consistiu na comparação das curvas de calibração obtidas em meio puro (metanol) e nas matrizes (EEBP 1mg/mL e F-EEBP 5%) fortificadas com o padrão. As soluções variaram entre 1,0 e 70,0 µg/mL (segundo as mesmas concentrações da curva analítica preparada) e foram preparadas em: A avaliação do paralelismo das curvas foi feita utilizando o teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$) no GraphPad Prism® 5.0. A porcentagem de interferência da matriz foi calculada com a fórmula: $\%EM = 100 \times [1 - (I_s/I_m)]$, sendo I_s a inclinação da curva no solvente e I_m a inclinação na matriz (NEMITZ et al., 2015).

5.3.4. Precisão

A precisão do ensaio (repetibilidade) foi determinada com seis réplicas independentes a 100% da concentração analítica. O desvio padrão relativo (DPR) foi calculado com base na

fórmula: $DPR = (DP/CMD) \times 100$, onde DP é o desvio padrão e CMD a concentração média determinada. Destaca-se a importância da preparação independente das amostras desde o início do procedimento para essa análise.

5.3.5. Exatidão

A exatidão foi determinada utilizando o método de adição do padrão, com fortificação das amostras de EEBP e F-EEBP em seis níveis distintos da curva. Cada nível foi avaliado em triplicata. A recuperação foi calculada pela equação: $Recuperação (\%) = (CA/CTA) \times 100$, sendo CA a concentração analisada (experimental) e CTA a concentração teórica do analito.

5.3.6. Limites de quantificação e de detecção

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) são parâmetros que representam a menor concentração de analito que o método é capaz de detectar e quantificar, respectivamente, com precisão e exatidão. Ambos foram obtidos a partir da curva analítica, por meio das seguintes fórmulas: $LD = (3,3 \times \sigma) / IC$ e $LQ = (10 \times \sigma) / IC$, onde IC representa a inclinação da curva e σ o desvio padrão do intercepto com o eixo Y.

5.3.7. Robustez

A robustez do método foi avaliada com seis soluções-padrão de rotina (1,0; 5,0; 10,0; 20,0; 35,0 e 70,0 $\mu\text{g/mL}$), analisadas nas condições padrão e sob variações de fluxo (0,9 e 1,1 mL/min) e temperatura (27°C e 33°C). Foram avaliadas alterações na área dos picos cromatográficos e nos coeficientes de correlação para determinar a estabilidade do método frente às variações.

5.4. Determinação da solubilidade da rutina

Para determinar a solubilidade da rutina, foi adicionado excesso do composto ao meio receptor tampão PBS (pH 7,4), a fim de gerar uma solução saturada. Essa mistura foi homogeneizada e mantida sob agitação constante a $32 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas. Após esse período, a solução foi centrifugada a 2000 rpm por 10 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi filtrado com membrana PVDF 0,22 μm , e 1 mL do filtrado foi transferido para o vial para análise por CLAE, utilizando o método previamente validado. O procedimento foi repetido em triplicata.

5.5. Estudo de liberação *in vitro*

Considerando os critérios de qualidade exigidos para formulações de uso tópico e transdérmico, a Anvisa publicou o Guia nº 20/2019, no qual estão descritas orientações e ensaios recomendados para garantir o desempenho de novos medicamentos, genéricos e similares. Um dos testes exigidos é a avaliação *in vitro* de liberação do fármaco (BRASIL, 2019).

O ensaio foi conduzido em células de difusão vertical com coletor automático Hanson Research®, modelo Phoenix RDS, disponíveis no laboratório multiusuário 1 do PPG CiPharma – UFOP. Foram utilizadas membranas de celulose de tubos de diálise com 25 mm de diâmetro (Merck®), previamente hidratadas em PBS (pH 7,4) por 30 minutos. Após hidratação, as membranas foram abertas e posicionadas entre os compartimentos doador e receptor das células de Franz.

No compartimento doador, foram adicionados 1 mL do EEBP ou da F-EEBP, em triplicata. O compartimento receptor foi preenchido com 22 mL de PBS (pH 7,4) com agitação constante de 300 rpm. Este, foi mantido à temperatura de $32 \pm 1^\circ\text{C}$, a fim de mimetizar a superfície da pele. Alíquotas de 1 mL foram retiradas nos tempos: 0,5; 1; 2; 4; 6; 8; 10; 12; 18 e 24 horas, sendo imediatamente substituídas por igual volume de meio fresco. As quantificações de rutina foram realizadas com base no método previamente validado.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Determinação das condições cromatográficas

Ao analisar os cromatogramas obtidos, é necessário que haja boa resolução dos picos, a fim de proporcionar a plena identificação do marcador fitoquímico (rutina). A **figura 5**, apresenta o cromatograma comparativo entre o EEBP e o padrão de rutina (850µg/mL). Essa comparação foi realizada com a finalidade de identificar o pico cromatográfico de interesse. Nela é possível observar a sobreposição dos picos do marcador fitoquímico em ambas as amostras (EEBP e solução padrão).

Figura 5: Cromatogramas do EEBP e rutina em CLAE-DAD, extraídos em 254 nm. Preto: rutina (850µg/mL); Azul: EEBP (1mg/mL); 1: rutina; 2: quercitrina; 3: quercetina.

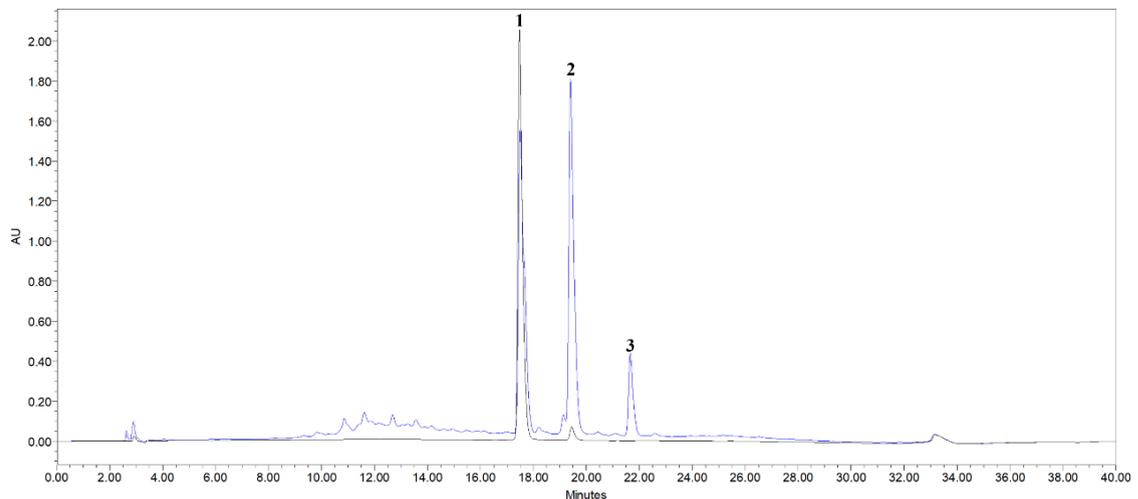
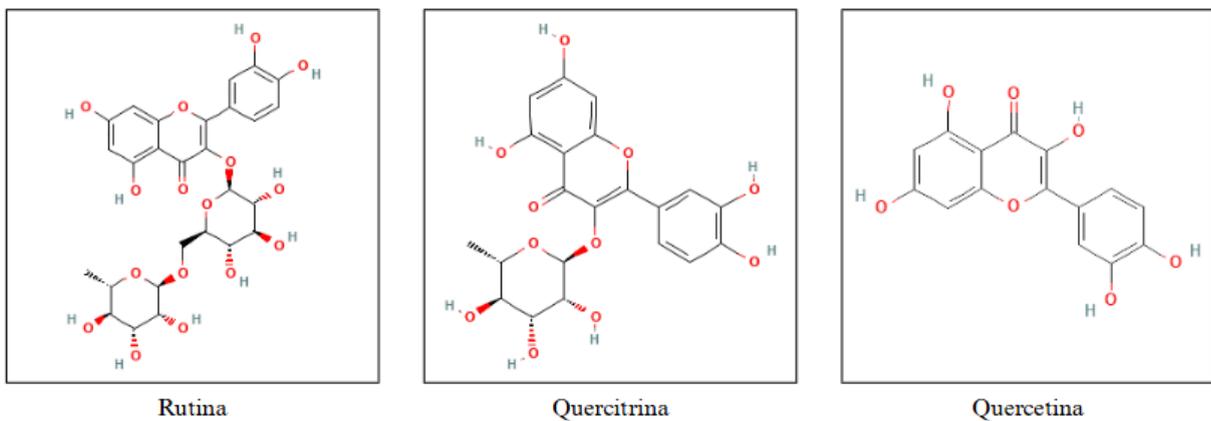


Figura 6: Representação das estruturas químicas das moléculas rutina, quercitrina e quercetina.



Fonte: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> Acesso em: 15/09/2025.

Outro parâmetro relevante, é a verificação do pico de interesse na F-EEBP, pois é necessário que o processo de formulação não elimine, nem altere as características do marcador fitoquímico. Garantindo assim que as condições estabelecidas sejam adequadas para a identificação da rutina na F-EEBP. As **figuras 7 e 8**, apresentam os tempos de retenção da rutina no EEBP e na F-EEBP. É notável a similaridade entre os tempos nas duas amostras.

Figura 7: Cromatogramas do EEBP (1mg/mL) em CLAE-DAD, extraído em 254 nm. Vermelho: rutina com tempo de retenção 17,505

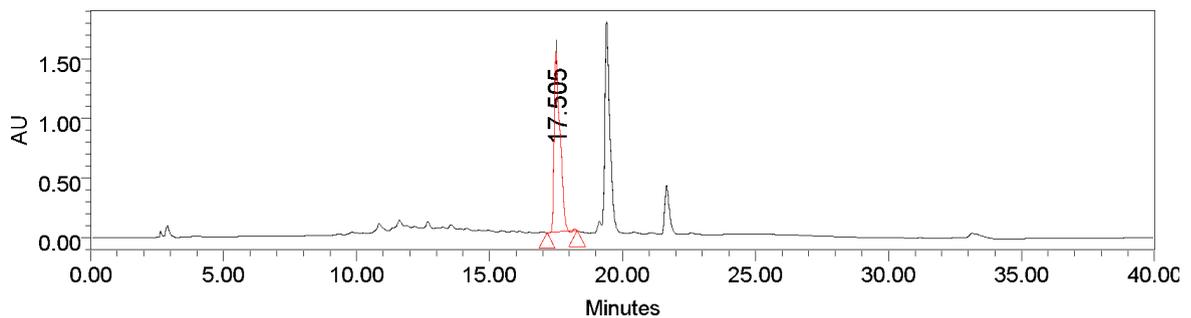
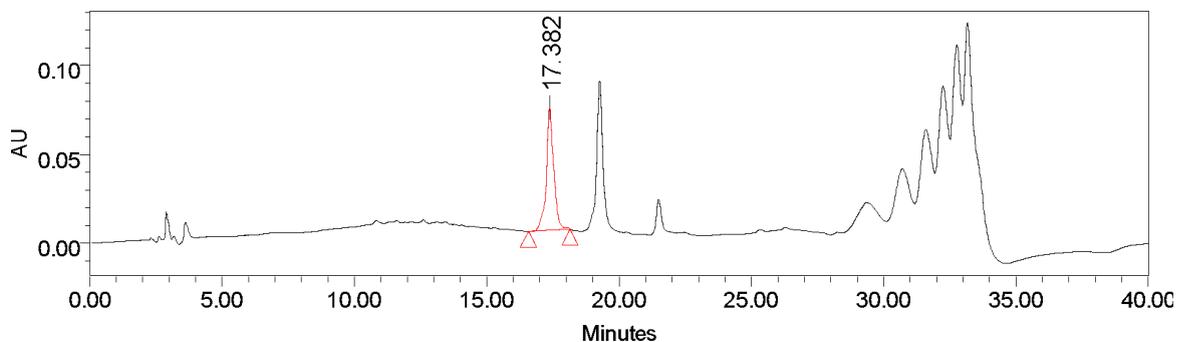


Figura 8: Cromatogramas da F-EEBP (5% no vial) em CLAE-DAD, extraído em 254 nm. Vermelho: rutina com tempo de retenção 17,382



Assim, as condições cromatográficas empregadas proporcionaram adequabilidade satisfatória, apresentando boa resolução entre os picos e garantindo a plena identificação do marcador fitoquímico, bem como visto por AMPARO et al., 2019.

6.2. Validação do método

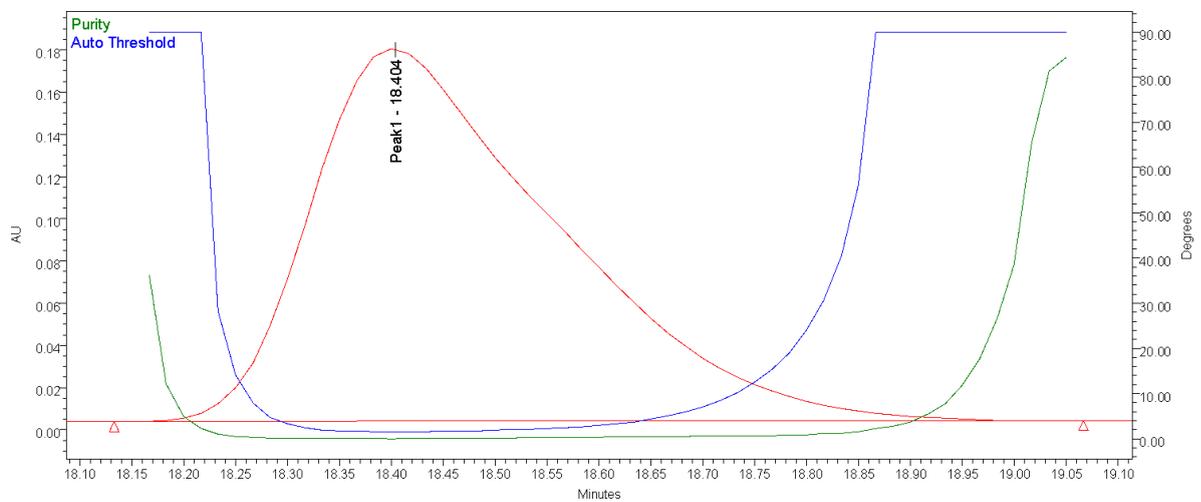
6.2.1. Seletividade

Sabe-se que o método desenvolvido produz respostas para vários analitos presentes no EEBP e F-EEBP. Logo, a avaliação da seletividade do método consiste em avaliar sua capacidade de distinção de resposta do analito de interesse, dentre os demais presentes nas amostras.

Na **figura 9** pode-se observar o gráfico de pureza de pico no EEBP, o qual indica o nível de seletividade do método para o analito em estudo. Para que um método seja considerado seletivo o suficiente, o ângulo de pureza deve ser inferior ao valor limite (REDDY SADDALA et al., 2022). Observa-se que o valor limite está em 2,584 graus (indicado em azul), enquanto o ângulo de pureza se encontra em 0,191 graus (indicado em verde). Portanto, confirma-se a seletividade do método.

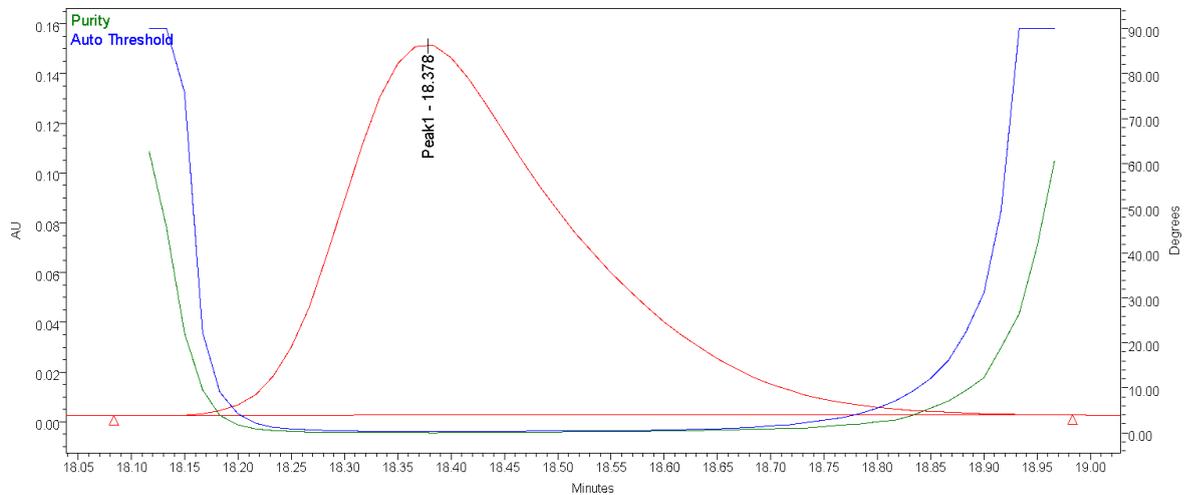
Figura 9: Pureza de pico da rutina na análise do EEBP 1mg/mL e rutina 70ug/mL em CLAE-DAD.

Verde: Ângulo de pureza; Azul: Ângulo limite; Vermelho: Pico rutina.



Assim como observado para o EEBP, o método também mostrou ser seletivo na análise da FB-EEBP (**figura 10**). Observa-se que o valor limite se encontra em 0,417 graus (indicado em azul), enquanto o ângulo de pureza se encontra em 0,162 graus (indicado em verde). Com isso, o método demonstrou ser capaz de garantir que os demais componentes da formulação, como os excipientes, não interfiram na quantificação da rutina, já que, não apresentam picos cromatográficos com tempos de retenção similares ao da rutina.

Figura 10: Pureza de pico da rutina na análise da FB-EEBP e Rutina 70ug/mL em CLAE-DAD. Verde: Ângulo de pureza; Azul: Ângulo limite; Vermelho: Pico rutina.



6.2.2. Linearidade

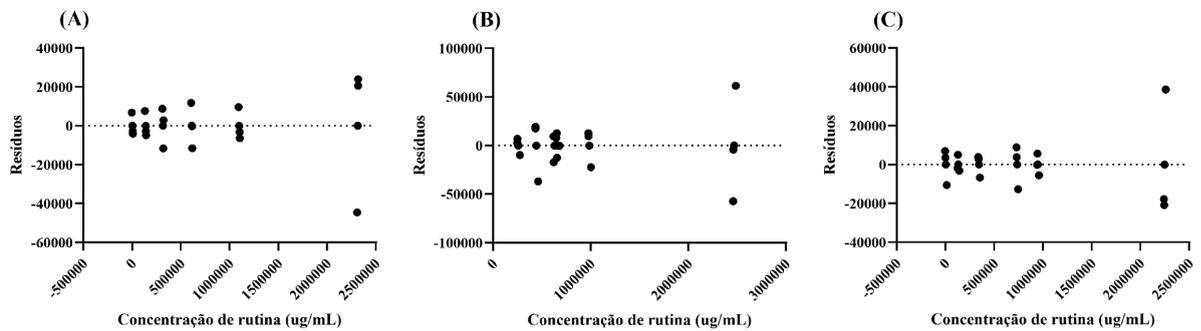
Segundo a RDC 166/2017 (BRASIL, 2017), a linearidade consiste na obtenção de respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração do analito de interesse. E para a avaliação deste parâmetro, preconiza-se a utilização de, no mínimo, 5 (cinco) concentrações diferentes, em triplicata, do padrão. Todos os parâmetros obtidos pela regressão linear foram satisfatórios: Os coeficientes de correlação (r) apresentaram-se maiores que 0,99 e os coeficientes angulares foram significativamente diferentes de zero (**tabela 1**).

Tabela 1: Parâmetros avaliados na linearidade.

| Parâmetros | Curva no solvente | | Curva na matriz |
|---|----------------------|-------------------|----------------------|
| | Metanol | EEBP | F-EEBP |
| Solvente/matriz | Metanol | EEBP | F-EEBP |
| Equação da reta | $y = 33297x - 34255$ | $32531x + 290585$ | $y = 32899x - 20576$ |
| r | 0,9997 | 0,9985 | 0,9995 |
| r² | 0,9994 | 0,9971 | 0,9991 |
| Coefficiente angular diferente de zero | $p < 0,0001$ | $p < 0,0001$ | $p < 0,0001$ |

Além disso, a **figura 11** apresenta a análise de dispersão de resíduos, a qual indicou a não ocorrência de desvio de linearidade significativo. Portanto, observa-se uma resposta analítica diretamente proporcional à concentração de rutina. Logo, o método desenvolvido apresenta linearidade adequada para a do marcador fitoquímico.

Figura 11: Dispersão dos resíduos: (A) Curva no solvente; (B) Curva na matriz (EEBP); (C) Curva na matriz (F-EEBP).

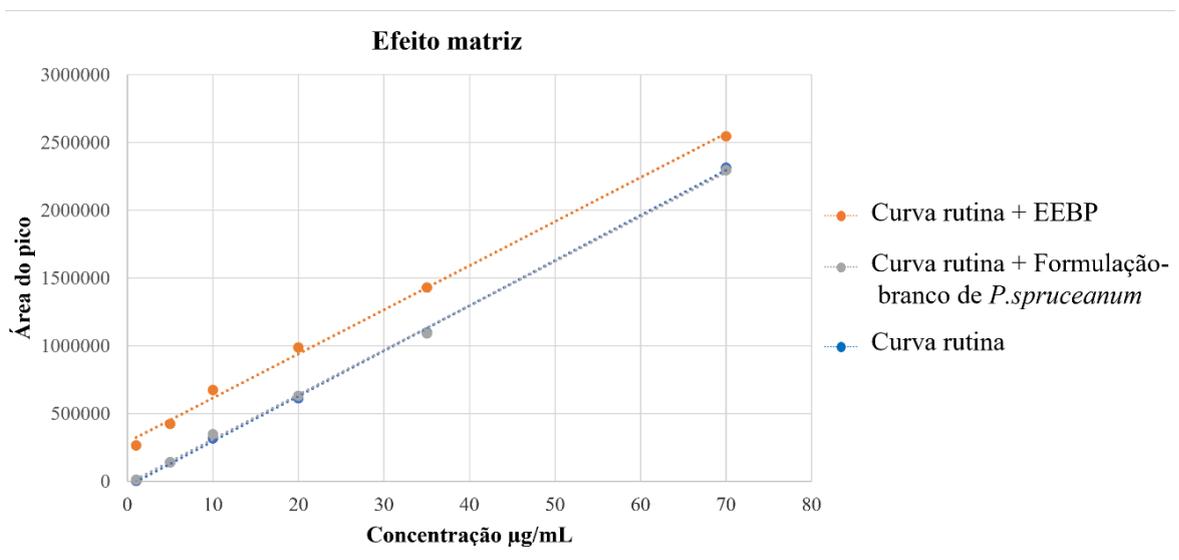


6.2.3. Efeito matriz

O efeito matriz é definido como a alteração da resposta analítica do analito de interesse, devido a componentes interferentes presentes na amostra. Portanto, a avaliação deste parâmetro, visa verificar se os componentes presentes na amostra não prejudicam a quantificação do analito de interesse (GUIDELINE, 2019). No Brasil, a Anvisa tornou obrigatória a avaliação do efeito matriz na validação de métodos analíticos para amostras complexas. Caso em que este estudo se encaixa (BRASIL, 2017).

A **figura 12** representa o gráfico de avaliação do efeito matriz, comparando as retas de concentração *versus* resposta analítica do EEBP, FB-EEBP e as curvas de calibração do padrão de rutina. A regulamentação preconiza que deve haver paralelismo entre as retas analisadas (BRASIL, 2017).

Figura 12: Curvas analíticas médias (n=3) da rutina no EEBP, rutina na FB-EEBP e rutina em metanol.



Com a análise dos coeficientes angulares das retas, é possível afirmar que estas são paralelas, devido ao fato de que esses parâmetros não são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$). Ademais, é interessante calcular a porcentagem de efeito matriz (%EM), para poder avaliar este efeito de forma quantitativa. Não há valores oficialmente definidos como adequados para a %EM, porém documentos amplamente reconhecidos em validações de métodos analíticos de diferentes matrizes também complexas (biológicas), como guias do ICH, FDA e EMA, adotam o limite de aceitação de $\pm 15\%$ (GUIDELINE, 2019; FDA, 2018; EMA, 2011). Neste estudo, os resultados de porcentagem do efeito matriz resultaram em $-2,35\%$ para o EEBP e $-1,21\%$ para a FB-EEBP. Portanto pode-se afirmar que os outros componentes presentes no extrato e na formulação não comprometem a resposta analítica, não interferindo na quantificação do analito.

6.2.4. Precisão

O parâmetro de precisão refere-se à dispersão das medidas de área comparadas à sua média, calculando assim o desvio padrão relativo (DPR). Autores utilizam diferentes valores de aceitação para este parâmetro, com isso a revisão de CHAVAN & DESAI, 2022 apresenta alguns dos critérios mais utilizados na validação de métodos analíticos. Sendo um $DPR < 15\%$, como o mais aceito para a precisão. Alguns autores como REDDY SADDALA, et al. 2022, baseiam-se em um limite ainda menor: $DPR < 5\%$. Neste estudo, os valores de DPR obtidos se encontram abaixo de 3% , o que confirma a precisão do método na quantificação do marcador fitoquímico (**tabela 2**).

Tabela 2: Análise da precisão do método analítico.

| Concentração ($\mu\text{g/mL}$) | DPR (%) |
|-----------------------------------|---------|
| 1 | 1,25 |
| 5 | 0,56 |
| 10 | 2,55 |
| 20 | 1,07 |
| 35 | 0,23 |
| 70 | 1,93 |

6.2.5. Exatidão

Consoante a regulamentação brasileira, a exatidão é o parâmetro obtido através do grau de concordância entre os resultados individuais do método desenvolvido em relação a um valor aceito como verdadeiro (BRASIL, 2017). Conforme descrito na metodologia, a técnica de ensaios de recuperação foi utilizada para a avaliação da precisão. Quantidades conhecidas do padrão são adicionadas às amostras e a taxa de recuperação (TR) indica o nível de precisão do método analítico. Os critérios de aceitação para a exatidão variam muito conforme o método, as características da amostra e do analito, bem como o objetivo do estudo (GUIDELINE, 2022). Sabe-se que matrizes complexas, como dos vegetais (objeto deste estudo), podem apresentar uma taxa de recuperação bem variada. LAZARJANI et al., 2024, relatou a faixa de 73-121% de recuperação em seu estudo, enquanto BARANOWSKA et al., 2017, obteve a faixa de 85-115%, portanto, entende-se que a taxa de recuperação em um trabalho com uma matriz vegetal complexa, deve estar próxima desses valores.

Na **tabela 3** pode-se observar os dados da análise de exatidão do método desenvolvido. Uma taxa de recuperação de 97,24-111,06% foi observada, corroborando com os autores previamente citados. Destaca-se ainda os baixos valores de DPR mostrando que os resultados estão dentro dos critérios de aceitação anteriormente citados. Com isso, pode-se afirmar que o método se mostrou satisfatoriamente exato para quantificar a rutina.

Tabela 3: Análise da exatidão do método analítico.

| Concentração adicionada ($\mu\text{g/mL}$) | Recuperação média (%) | Desvio padrão relativo (DPR %) |
|--|----------------------------------|---|
| 1 | 111,06 | 0,62 |
| 5 | 103,88 | 0,46 |
| 10 | 102,65 | 2,31 |
| 20 | 97,47 | 1,02 |
| 35 | 97,24 | 0,23 |
| 70 | 101,79 | 1,90 |

6.2.6. Limites de quantificação e de detecção

O limite de detecção (LD) é a quantidade mínima capaz de ser detectada na execução do método analítico, sendo importante para a definição de segurança da faixa de trabalho das amostras. O LD da rutina calculado foi de $0,062\mu\text{g/mL}$.

O limite de quantificação (LQ), por sua vez, é a quantidade mínima capaz de ser quantificada na execução do método analítico. Também sendo de suma importância para a segurança da faixa de trabalho das amostras e dos resultados obtidos. O LQ da rotina foi calculado em 0,188µg/mL. Esses resultados evidenciam a adequada sensibilidade do método para a detecção e quantificação do marcador fitoquímico nas amostras.

6.2.7. Robustez

A robustez é um fator que expressa a capacidade do método de resistir a pequenas variações paramétricas que podem ocorrer durante a sua execução. Portanto, a avaliação da robustez visa garantir que a performance não será afetada na realização real do método (GUIDELINE, 2022). A orientação é de que haja uma leve alteração deliberada nas condições cromatográficas, seguida da avaliação estatística da correlação entre o método padronizado (sem variações deliberadas) e o método deliberadamente ajustado. O fluxo de fase móvel e a temperatura foram alterados em 10%, para a avaliação neste estudo.

A **tabela 4**, representa os resultados da correlação entre o método padrão e o método ajustado. Não foi observado uma alteração significativa no valor de área do pico de interesse ($p < 0,05$), e, além disso, o coeficiente de correlação (r^2) evidenciou a relação linear entre os dados obtidos.

Tabela 4: Coeficiente de correlação no teste de robustez.

| Parâmetros avaliados | | Fluxo | | Temperatura | |
|----------------------------------|-------|-----------|-----------|-------------|--------|
| | | 0.9mL/min | 1.1mL/min | 27°C | 33°C |
| Coeficiente de correlação | r^2 | 0,9983 | 0,9942 | 0,9978 | 0,9974 |

Logo, o método desenvolvido mostra-se resistente a pequenas variações nas condições cromatográficas, o que confere robustez satisfatória.

6.3. Determinação da solubilidade da rotina

O teste de liberação *in vitro* é preconizado e aceito por muitas organizações no mundo todo, como a própria Anvisa em termos nacionais (BRASIL, 2021) e a *Food and Drug Administration* (FDA) em termos internacionais (FDA, 2022). A existência de alguns fatores críticos para a fiabilidade do estudo, geram a necessidade da criação de guias e normas para a execução desse tipo de teste. O FDA apresenta um documento contendo orientações e

recomendações para a plena aplicação de um teste de permeação *in vitro*. Nele, é possível encontrar requisitos de qualidade para diversas etapas e componentes do estudo. Como, os equipamentos utilizados, o tipo de membrana escolhido, e a solução receptora empregada (FDA, 2022).

Possuir uma solução receptora adequada é um fator extremamente importante para o sucesso do estudo de liberação. Suas características são críticas para o desfecho do ensaio e, portanto, sua escolha deve ser feita cuidadosamente. Conforme FDA, 2022, o meio receptor utilizado nos estudos de permeação *in vitro* deve ser compatível com a pele, e o analito em questão deve ter satisfatória estabilidade e solubilidade nele. Portanto, o pH e a composição da solução devem ser avaliados criteriosamente. Além disso, ainda segundo o guia, é crucial que a solubilidade do fármaco na solução receptora seja determinada de forma empírica, ou seja, com base em testes práticos, e em triplicata. Essa verificação precisa mostrar que a solubilidade do fármaco na solução receptora é superior à maior concentração do analito nas amostras do estudo.

O meio PBS pH 7,4 foi o escolhido para este estudo, já que este é biocompatível e suas características como pH e solubilidade são semelhantes às condições biológicas. Para garantir que a saturação do PBS não atue como um fator limitante na liberação do analito, a sua *sink condition* foi previamente determinada. A *sink condition* é a condição de não saturação do meio receptor e para que esta seja adequada, o volume de meio utilizado deve ser no mínimo três vezes maior que seu volume de saturação. Ou seja, a concentração do analito deve ser no mínimo três vezes menor que a sua solubilidade máxima. Com isso, garante-se que a permeação do analito não seja limitada pela saturação do meio receptor (BRASIL, 2024).

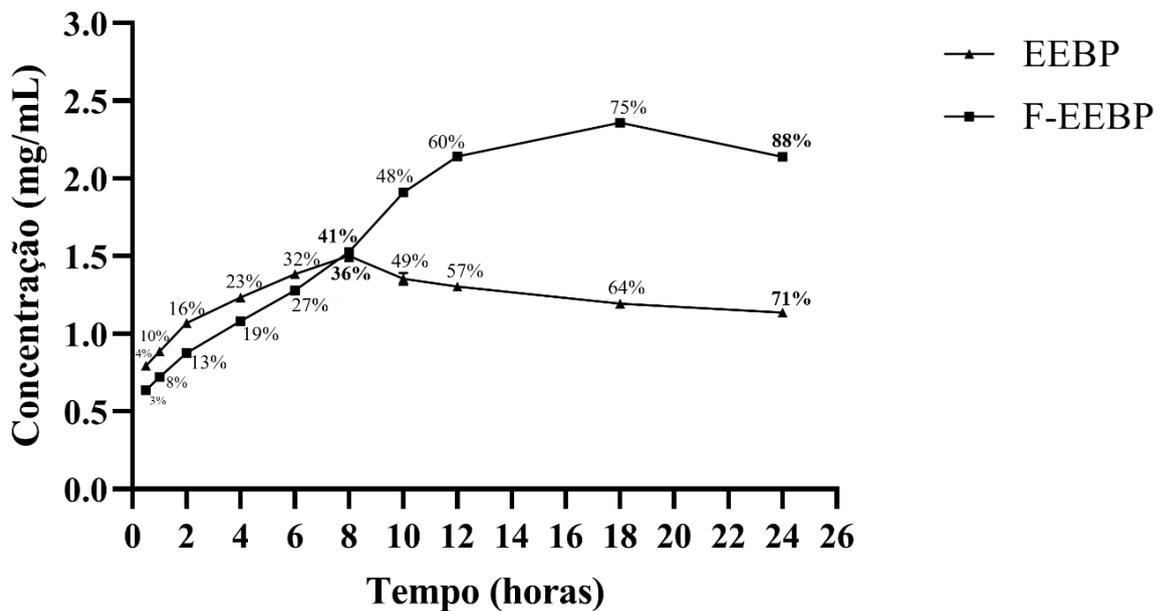
Assim, para chegar à condição adequada, inicialmente foi realizado o estudo de solubilidade da rutina no meio receptor. Utilizando-se métodos cromatográficos, determinou-se que a solubilidade máxima do marcador no PBS pH 7,4, é de 55,67µg/mL à temperatura de 32 ± 1 °C. Com isso, verificou-se que o EEBP e F-EEBP nas concentrações 6,01mg/mL e 40%, respectivamente, respeitam as condições para estabelecimento da *sink condition*. À primeira vista, aparentemente a concentração utilizada excede a solubilidade máxima definida. Porém, a concentração utilizada refere-se à quantidade de extrato por mL, e a solubilidade máxima definida refere-se à quantidade de rutina por mL. Portanto, reafirma-se que a concentração de 6,01mg/mL de extrato, não extrapola a *sink condition*, já que nem todo conteúdo do extrato corresponde a rutina.

6.4. Liberação

Com a comprovação da adequabilidade do método analítico desenvolvido, já que este

demonstrou cumprir todos os requisitos preconizados (linearidade, especificidade, precisão, exatidão e robustez), o ensaio de liberação *in vitro* foi realizado. O perfil de liberação da F-EEBP e do EEBP, são demonstrados na **figura 13**. O gráfico representa o cumulativo de liberação em função do tempo. Observa-se que, nas primeiras 8 horas de análise, as amostras apresentaram comportamento semelhante. A F-EEBP liberou 36% do analito, enquanto o EEBP liberou 41%.

Figura 13: Perfil de liberação da F- EEBP e do EEBP em função do tempo.



O equilíbrio observado nas horas iniciais do teste pode ser atribuído aos fatores relacionados ao contato inicial das duas amostras com o meio receptor. Apesar de apresentarem fatores comportamentais diferentes, estes atuam de forma paralela e resultam num perfil de liberação semelhante. Enquanto o EEBP apresenta baixa solubilidade por não estar incorporado a um sistema de liberação; A F-EEBP apresenta o extrato totalmente solubilizado. Entretanto, o extrato está totalmente solubilizado dentro das micelas, e assim a própria matriz polimérica da F-EEBP pode atuar como fator limitante na liberação. Logo, ambas amostras apresentam limitações na passagem pela membrana. Com isso, o grande responsável pela liberação nas 8 horas iniciais de análise, é o gradiente de concentração, que atua fortemente nas duas amostras.

Nas horas seguintes da análise, o panorama se tornou completamente diferente. Com o passar da liberação inicial, o gradiente de concentração tende a se estabilizar, diminuindo assim a taxa de liberação do ativo. Esse efeito é nitidamente observado nos dados do EEBP,

pois este não apresenta um sistema que proporcione a extensão da sua liberação. Com isso, após as 8 horas iniciais, a falta do gradiente aliado à baixa solubilidade do extrato, faz com que a taxa de liberação caia. Já na F-EEBP, a taxa de liberação após as primeiras 8 horas segue em crescimento. Assim como no EEBP, o gradiente de concentração já não é tão preponderante, porém neste caso, a solubilidade do extrato é amplamente aprimorada pelo sistema micelar. Logo, a liberação dos ativos para o meio receptor é facilitada, o que explica a continuação do aumento na taxa de liberação. Autores como GUPTA et al., 2020, afirmam que a otimização da solubilidade de compostos pouco solúveis é uma das principais aplicações de formulações micelares, o que corrobora com os resultados obtidos neste estudo. Outro fator contribuinte a se destacar, é o efeito de *burst release*, fenômeno que é responsável por causar uma rápida liberação de ativos em sistemas de liberação. Este efeito, é caracterizado pela brusca liberação de ativos adsorvidos na superfície das micelas e na porção livre não encapsulada (YOO & WON, 2020). O *burst release* é importante em um sistema transdérmico, pois faz com que um depósito de ativo seja rapidamente formado nas camadas mais superficiais da pele, fazendo assim com que haja um gradiente de concentração que possa estabelecer um fluxo dos componentes do produto através das camadas cutâneas e assim é possível ter a combinação de uma ação terapêutica imediata e prolongada (CAM et al., 2020; HUANG & BRAZEL, 2001).

Na F-EEBP, a queda na taxa de liberação iniciou apenas no tempo de 18 horas, bem diferente da EEBP, que mostrou sofrer queda logo no tempo de 8 horas. Desse modo, ao analisar o cumulativo de liberação no final da análise, observou-se diferença nos perfis de liberação das amostras. Após 24 horas de análise, a F-EEBP apresentou um percentual de liberação igual a 88%, enquanto o EEBP apresentou um percentual igual a 71%. Corroborando com GAO, et al., 2020, estes resultados confirmam que o aumento da solubilidade do ativo pode proporcionar aprimoramento do perfil de liberação através da melhora da absorção, biodisponibilidade, redução do tempo de eliminação, e por consequência pode até reduzir a toxicidade.

Portanto, o encapsulamento do ativo em um sistema micelar, mostrou ser eficaz no aprimoramento de sua liberação. Isso corrobora com alguns autores que também evidenciaram a melhora do perfil de liberação após o encapsulamento, como: ALI et al., 2021, que também utilizou um sistema micelar e observou um aumento de 6 vezes da liberação do seu ativo em questão, quando comparado a uma formulação etanólica. E POUSTFOROOSH et al., 2022, que observou um aumento de 4 vezes na liberação de meloxicam num sistema micelar, em comparação ao fármaco livre. Ambos os estudos também utilizaram a técnica de

célula de difusão de Franz para estudar o perfil de liberação.

Um outro passo importante no estudo de liberação de uma formulação é compreender seu mecanismo de liberação. Há conhecimento de diversos mecanismos de liberação de ativos em formulações nanoestruturadas: difusão, biodegradação, erosão, inchaço, osmose e troca iônica são alguns exemplos (WANG, et al., 2020). Entender como a liberação ocorre possibilita otimizações farmacotécnicas, farmacocinéticas e físico-químicas. Estudos de cinética de liberação são amplamente utilizados com essa finalidade, e modelos matemáticos possibilitam uma melhor elucidação do mecanismo (PORBAHA et al., 2024).

Os modelos matemáticos mais usuais atualmente foram selecionados para a avaliação neste estudo e são os de ordem zero, primeira ordem, Higuchi e Korsmeyer-Peppas (BAYER, 2023). O modelo cinético de ordem zero descreve uma liberação constante do fármaco ao longo do tempo, resultando em uma taxa fixa de liberação. Já no modelo de primeira ordem, a velocidade de liberação está diretamente relacionada à concentração do fármaco presente na formulação. Quando a liberação segue o modelo de Higuchi, o processo ocorre predominantemente por mecanismos combinados de difusão e dissolução. Já o modelo de Korsmeyer-Peppas é utilizado para identificar o tipo de mecanismo difusional envolvido na liberação do princípio ativo.

Através do método de regressão linear, é possível prever qual modelo matemático é o mais adequado para a formulação em questão. Portanto, a regressão foi aplicada nos dados de liberação seguindo os tempos de análise e percentual de liberação acumulado. O desejado é possuir um modelo em que a linearização seja quase perfeita, ou seja, aquela em que o coeficiente de correlação (r^2) seja mais próximo de 1,0 (BAYER, 2023). Tendo isso em vista, a **tabela 5** traz os resultados dos parâmetros matemáticos calculados e foi constatado que o modelo mais adequado à liberação da F-EEBP, foi o de Korsmeyer-Peppas.

Tabela 5: Dados da cinética de liberação da F-EEBP.

| Modelo cinético | r^2 | k | n |
|-------------------------|-------------------------|----------|----------|
| Ordem zero | 0,9821 | - 22,27 | 2,0855 |
| Primeira ordem | 0,883 | - 20,883 | 34,516 |
| Higuchi | 0,9714 | - 2,4559 | 0,3647 |
| Korsmeyer-Peppas | 0,9937 | 1,3453 | 1,0416 |

No modelo de Korsmeyer-Peppas, os valores do expoente de liberação (n), são

utilizados para caracterizar de maneira mais específica, os mecanismos de liberação da formulação (PORBAHA et al., 2024). A **tabela 6**, apresenta a relação do mecanismo de liberação em função do expoente de liberação:

Tabela 6: Mecanismo de liberação em função do expoente de liberação.

| Expoente de liberação | Mecanismo de liberação |
|------------------------------|-------------------------------------|
| $n = 0,5$ | Modelo Fickiano (Caso I) |
| $n = 1,0$ | Modelo não-Fickiano (Caso II) |
| $0,5 < n < 1,0$ | Modelo não-Fickiano (Caso Anômalo) |
| $n < 0,5$ | Comportamento pseudo Fickiano |
| $n > 1,0$ | Modelo não-Fickiano (Super Caso II) |

Quando $n = 0,5$, o mecanismo de transporte segue o Modelo de Fick, onde a liberação ocorre por difusão. Quando $n = 1,0$, o mecanismo segue o Modelo não-Fickiano, o qual a cinética de liberação é de ordem zero (constante e independente da concentração do ativo). Quando os valores de n estão entre 0,5 e 1,0, a liberação ocorre pela combinação da difusão e do inchamento do polímero. Nesse contexto, o rearranjo das cadeias poliméricas acontece de maneira gradual e simultânea à difusão do ativo, resultando em um comportamento anômalo e dependente do tempo. Caso os valores sejam menores que 0,5, o mecanismo segue um comportamento pseudo-Fickiano, o qual se assemelha ao modelo de Fick, tendo a difusão como principal característica. Entretanto, o comportamento é levemente anômalo, pois ocorre mais rapidamente que uma difusão ideal. Se os valores de n são maiores que 1,0, situação em que a F-EEBP se encontra, o mecanismo de liberação ocorre por fenômenos de tensão e quebra de cadeias poliméricas, que por consequência, rompem o núcleo e liberam os ativos.

A elucidação do mecanismo de liberação é de fato muito importante, já que pode servir como base para o aprofundamento no estudo de liberação da F-EEBP. Sabe-se que existem variados fatores que podem influenciar na liberação dos ativos ou até mesmo na formação das micelas no sistema formulado. Variações no pH da formulação podem afetar a liberação, em razão de ionização dos ativos incorporados, ou pela ruptura da micela formada. (BASAK & BANDYOPADHYAY, 2013; MANNA et al., 2024). A temperatura cumpre um papel fundamental, já que os sistemas micelares apresentam a *lower critical solution temperature* (LCST), que é a temperatura característica acima da qual o sistema polimérico deixa de ser solúvel em água e passa a se separar em duas fases. Temperaturas abaixo do

LCST, conferem alta hidratação do polímero, aumentando sua hidrofilia. Já em temperaturas acima do LCST, as ligações de hidrogênio são rompidas e a cadeia desidrata (NAJAFI et al., 2021; DAS, et al., 2020). Um outro conceito onde a temperatura atua é o *critical micelle concentration* (CMC), que é a concentração mínima de polímero em solução para que a formação de micelas aconteça. Estudos afirmam que a CMC é dependente de temperatura e não apresenta um comportamento linear (ABO GABAL et al., 2023; KHOSHNOOD et al., 2016). Todos esses fatores influentes, podem ser estudados e utilizados para otimizações, melhorias, ampliação de aplicabilidade do sistema e inovações em geral.

7. CONCLUSÃO

Foi possível avaliar a cinética de liberação do extrato etanólico bruto das folhas de *Protium spruceanum* encapsulado em micelas, pois, o método analítico desenvolvido apresentou-se linear, específico, preciso, exato e robusto. O perfil de liberação foi descrito e caracterizado, sendo este adequado para o uso tópico, já que o encapsulamento em micelas conferiu melhora na liberação em termos de prolongamento e de quantidade de extrato liberado.

Vale ressaltar que o estudo realizado compreende uma etapa na avaliação da cinética de liberação da formulação em teste (F-EEBP) e, portanto, pode servir como base para a continuação da avaliação. Assim, testes *ex vivo*, utilizando pele suína podem mimetizar bem a pele humana e agregar no entendimento da cinética de liberação da formulação, bem como da permeação cutânea. Testes *in vivo*, também devem ser uma etapa futura a fim de se avaliar diretamente em animais a liberação do extrato e poder compreender a sua cinética no uso real. Espera-se que os resultados obtidos neste estudo sejam referência para aprimoramentos farmacotécnicos, cinéticos e físico-químicos da formulação. Bem como, para discussões clínicas futuras envolvendo o produto estudado, como a definição da posologia ideal, por exemplo.

8. REFERÊNCIAS

ABDULJALIL, Jameel M.; ELFIKY, Abdo A.; ELGOHARY, Alaa M. Exploration of natural compounds against the human mpox virus DNA-dependent RNA polymerase *in silico*. *Journal of Infection and Public Health*, v. 16, n. 7, p. 996-1003, 2023.

ABO GABAL, Raghda et al. Micellization thermodynamics as a function of the temperature of a cationic zwitterionic dodecyl phosphocholine and anionic sodium dodecyl sulfate mixed micelles with fluorometry. *Applied Physics A*, v. 129, n. 3, p. 201, 2023.

AGGARWAL, Gaurav et al. Plant-based natural product chemistry: An overview of the multistep journey involved in scientific validation of traditional knowledge. *Studies in Natural Products Chemistry*, v. 80, p. 327-377, 2024.

ALI, Md Korban et al. Biocompatible ionic liquid-mediated micelles for enhanced transdermal delivery of paclitaxel. *ACS applied materials & interfaces*, v. 13, n. 17, p. 19745-19755, 2021.

AMPARO, Tatiane Roquete et al. Antibacterial activity of extract and fractions from branches of *Protium spruceanum* and cytotoxicity on fibroblasts. *Natural product research*, v. 32, n. 16, p. 1951-1954, 2018.

AMPARO, Tatiane Roquete et al. Anti-inflammatory activity of *Protium spruceanum* (Benth.) Engler is associated to immunomodulation and enzymes inhibition. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 241, p. 112024, 2019.

ANAND, Uttpal et al. A comprehensive review on medicinal plants as antimicrobial therapeutics: potential avenues of biocompatible drug discovery. *Metabolites*, v. 9, n. 11, p. 258, 2019.

BASAK, Rajib; BANDYOPADHYAY, Ranjini. Encapsulation of hydrophobic drugs in Pluronic F127 micelles: effects of drug hydrophobicity, solution temperature, and pH. *Langmuir*, v. 29, n. 13, p. 4350-4356, 2013.

BAYER, Ilker S. Controlled drug release from nanoengineered polysaccharides. *Pharmaceutics*, v. 15, n. 5, p. 1364, 2023.

BOLLA, Pradeep Kumar et al. Evaluation of formulation parameters on permeation of ibuprofen from topical formulations using Strat-M® membrane. *Pharmaceutics*, v. 12, n. 2, p. 151, 2020.

BRASIL, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Diretoria Colegiada. Resolução RDC nº 166, de 24 de julho de 2017.

BRASIL, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Farmacopeia Brasileira, Volume 1. 6ª Ed. Brasília, 2019.

BRASIL, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Farmacopeia Brasileira, Volume 1. 7ª Ed. Brasília, 2024.

BRASIL, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Guia nº20, de 10 de fevereiro de 2021. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2, 1-19, 2021.

CAM, Muhammet Emin et al. Evaluation of burst release and sustained release of pioglitazone-loaded fibrous mats on diabetic wound healing: an *in vitro* and *in vivo* comparison study. *Journal of The Royal Society Interface*, v. 17, n. 162, p. 20190712, 2020.

CHAVAN, Sushila Dagadu; DESAI, Deepa Mahendra. Analytical method validation: A brief review. *World Journal of Advanced Research and Reviews*, v. 16, n. 2, p. 389-402, 2022.

CHIHOMVU, Patience et al. Phytochemicals in drug discovery—A confluence of tradition and innovation. *International journal of molecular sciences*, v. 25, n. 16, p. 8792, 2024.

DAS, Sabya Sachi et al. Stimuli-responsive polymeric nanocarriers for drug delivery, imaging, and theragnosis. *Polymers*, v. 12, n. 6, p. 1397, 2020.

DUMORTIER, Gilles et al. A review of poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics. *Pharmaceutical research*, v. 23, n. 12, p. 2709-2728, 2006.

DZOBO, Kevin. The role of natural products as sources of therapeutic agents for innovative drug discovery. *Comprehensive pharmacology*, p. 408, 2022.

EMA. EMA Guideline on bioanalytical method validation. 2011.

ESCOBAR-CHÁVEZ, José Juan et al. Nanocarriers for transdermal drug delivery. *Research and Reports in Transdermal Drug Delivery*, p. 3-17, 2012.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Bioanalytical method validation: guidance for industry. Rockville, MD: U.S. Department of Health and Human Services, 2018.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Draft Guidance: *In Vitro* Permeation Test Studies for Topical Drug Products Submitted in ANDAs. Rockville, MD: U.S. Department of Health and Human Services, 2022.

FRANZ, Thomas J. Percutaneous absorption. On the relevance of *in vitro* data. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 64, n. 3, p. 190-195, 1975.

GAO, Xiaoling et al. Design and preparation of nanostructures based on Krafft point of nonionic amphiphiles for delivery of poorly water-soluble compounds. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 588, p. 119789, 2020.

GUIDELINE, ICH Harmonised. Bioanalytical method validation M10. European Medicines Agency: Amsterdam, The Netherlands, 2019.

GUIDELINE, I. H. T. Validation of analytical procedures Q2 (R2). ICH: Geneva, Switzerland, v. 1, 2022.

GUPTA, Anand et al. Formulation and characterization of curcumin loaded polymeric micelles produced via continuous processing. *International journal of pharmaceutics*, v. 583, p. 119340, 2020.

GUPTA, Namrata S. Therapeutic Efficacy of the Plant Bioactive Phytochemicals with Special Reference to Alkaloids, Terpenoids, Phenolics and Cardiac Glycosides. *International journal of plant and environment*, v. 10, n. 01, p. 22-30, 2024.

HASNAT, Hasin et al. Flavonoids: A treasure house of prospective pharmacological potentials. *Heliyon*, v. 10, n. 6, 2024.

HILAL, Bisma; KHAN, Mohammad Mansoob; FARIDUDDIN, Qazi. Recent advancements in deciphering the therapeutic properties of plant secondary metabolites: phenolics, terpenes, and alkaloids. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 211, p. 108674, 2024.

HUANG, Xiao; BRAZEL, Christopher S. On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems. *Journal of controlled release*, v. 73, n. 2-3, p. 121-136, 2001.

KHOSHNOOD, Atefeh; LUKANOV, Boris; FIROOZABADI, Abbas. Temperature effect on micelle formation: Molecular thermodynamic model revisited. *Langmuir*, v. 32, n. 9, p. 2175-2183, 2016.

KICHOU, Hichem et al. Efficiency of emulsifier-free emulsions in delivering caffeine and α -tocopherol to human skin. *International Journal of Cosmetic Science*, v. 45, n. 3, p. 329-344, 2023.

KOTTA, Sabna et al. Progress in polymeric micelles for drug delivery applications. *Pharmaceutics*, v. 14, n. 8, p. 1636, 2022.

LAZARJANI, Masoumeh et al. Development and validation of HPLC and GC methods for quantification of cannabinoids and terpenes extracted by ultrasound assisted extraction technique. *Drug Analytical Research*, v. 8, n. 1, p. 33-45, 2024.

MACHADO, Líbia Bentes; ZOGHBI, Maria das Graças B.; ANDRADE, Eloisa Helena A. Seasonal variation in the composition of the essential oils from the leaves, thin branches and resin of *Protium spruceanum* (Benth.) Engl. *Flavour and fragrance journal*, v. 18, n. 4, p. 338-341, 2003.

MANNA, Kalipada et al. Alginic acid-based pH and thermo responsive reversible switched polymeric micelle via RAFT polymerization. *Polymer*, v. 291, p. 126581, 2024.

MENEZES FILHO, Antonio Carlos Pereira; SANTOS, M. C.; DE SOUZA CASTRO, C. F. 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.

MORETTO, L.D.; CALIXTO, J. *Qualificações e Validações: Guia Sindusfarma para a Indústria Farmacêutica*. Sindusfarma, 2016.

NAEEM, Abid et al. Natural products as anticancer agents: current status and future perspectives. *Molecules*, v. 27, n. 23, p. 8367, 2022.

NAJAFI, Marzieh et al. LCST polymers with UCST behavior. *Soft Matter*, v. 17, n. 8, p. 2132-2141, 2021.

NAJMI, Asim et al. Modern approaches in the discovery and development of plant-based natural products and their analogues as potential therapeutic agents. *Molecules*, v. 27, n. 2, p. 349, 2022.

NEWMAN, David J.; CRAGG, Gordon M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal of natural products*, v. 83, n. 3, p. 770-803, 2020.

NEWMAN, David J.; CRAGG, Gordon M.; SNADER, Kenneth M. The influence of natural products upon drug discovery. *Natural product reports*, v. 17, n. 3, p. 215-234, 2000.

NEGI, Poonam et al. Novel thymoquinone loaded chitosan-lecithin micelles for effective wound healing: Development, characterization, and preclinical evaluation. *Carbohydrate polymers*, v. 230, p. 115659, 2020.

OECD. *Test Guideline 428: Skin absorption: Guidance Document for the testing of chemicals*. OECD, Paris, 2004.

PAIVA-SANTOS, Ana Cláudia et al. Nanocarrier-based dermopharmaceutical formulations for the topical management of atopic dermatitis. *International journal of pharmaceutics*, v. 618, p. 121656, 2022.

PORBAHA, Pedram et al. A comparative mathematical analysis of drug release from lipid-based nanoparticles. *AAPS PharmSciTech*, v. 25, n. 7, p. 208, 2024.

POUSTFOROOSH, Alireza et al. Preparation of nano-micelles of meloxicam for transdermal drug delivery and simulation of drug release: A computational supported experimental study. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, v. 100, n. 11, p. 3428-3436, 2022.

REDDY SADDALA, Madhu Prakash et al. Development and validation of novel RP-HPLC method for midostaurin determination using analytical quality by design approach from regulatory perspective and determination of major degradation compounds of midostaurin using LC-MS. *Biomedical Chromatography*, v. 36, n. 12, p. e5486, 2022.

RINCÓN, María et al. Enhanced transdermal delivery of pranoprofen using a thermo-reversible hydrogel loaded with lipid nanocarriers for the treatment of local inflammation. *Pharmaceuticals*, v. 15, n. 1, p. 22, 2021.

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

RUELA, André Luís Morais et al. Evaluation of skin absorption of drugs from topical and transdermal formulations. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 52, p. 527-544, 2016.

RÜDIGER, André Luis; SIANI, Antônio Carlos; JUNIOR, VF Veiga. The chemistry and pharmacology of the South America genus *Protium* *Burm. f.*(Burseraceae). *Pharmacognosy reviews*, v. 1, n. 1, p. 93-104, 2007.

RUIZ, Victor H. et al. Design, physicochemical characterization, and *in vitro* permeation of innovative resatorvid topical formulations for targeted skin drug delivery. *Pharmaceutics*, v. 14, n. 4, p. 700, 2022.

SANKAR, Panchumarthy Ravi et al. Analytical method development and validation for the determination of mirabegron in pharmaceutical dosage form by RP-HPLC. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, v. 11, n. 5, p. 2223-2228, 2020.

SILVA, José Aleksandro da et al. Administração cutânea de fármacos: desafios e estratégias para o desenvolvimento de formulações transdérmicas. *Revista de Ciências Farmacêuticas básica e aplicada*, v. 31, n. 3, 2010.

TIFFNER, Katrin I. et al. A comprehensive approach to qualify and validate the essential parameters of an *in vitro* release test (IVRT) method for acyclovir cream, 5%. *International journal of pharmaceutics*, v. 535, n. 1-2, p. 217-227, 2018.

VORA, Deepal et al. Formulation development for transdermal delivery of raloxifene, a chemoprophylactic agent against breast cancer. *Pharmaceutics*, v. 14, n. 3, p. 680, 2022.

WANG, Shuying et al. Release mechanisms and applications of drug delivery systems for extended-release. *Expert Opinion on Drug Delivery*, v. 17, n. 9, p. 1289-1304, 2020.

YOO, Jin; WON, You-Yeon. Phenomenology of the initial burst release of drugs from PLGA microparticles. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, v. 6, n. 11, p. 6053-6062, 2020.

ZHAI, Yingjie; ZHAI, Guangxi. Advances in lipid-based colloid systems as drug carrier for topic delivery. *Journal of controlled release*, v. 193, p. 90-99, 2014.

ZHONGWEN, L. U. O. et al. Progress in approved drugs from natural product resources. *Chinese Journal of Natural Medicines*, v. 22, n. 3, p. 195-211, 2024.