



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO  
ESCOLA DE FARMÁCIA



NAIRA CRISTINA MIRANDA XAVIER

**INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO *IN VITRO* DE UMA  
FORMULAÇÃO NANOESTRUTURADA COM POTENCIAL CICATRIZANTE  
CONTENDO *MELALEUCA LEUCADENDRON* E *PROTIUM SPRUCEANUM***

OURO PRETO

2026

NAIRA CRISTINA MIRANDA XAVIER

**INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO *IN VITRO* DE UMA  
FORMULAÇÃO NANOESTRUTURADA COM POTENCIAL CICATRIZANTE  
CONTENDO *MELALEUCA LEUCADENDRON* E *PROTIUM SPRUCEANUM***

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.

Orientadora: Profa. Dra. Paula Melo de Abreu Vieira

Coorientadores: Dra. Viviane Flores Xavier

Prof. Dr. Gustavo Henrique Bianco de Souza

OURO PRETO

2026



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO  
REITORIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



**FOLHA DE APROVAÇÃO**

**Naira Cristina Miranda Xavier**

**Investigação do potencial anti-inflamatório in vitro de uma formulação nanoestruturada com potencial cicatrizante contendo *Melaleuca leucadendron* e *Protium spruceanum***

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 31 de Julho de 2026

**Membros da banca**

Profa. Dra. Paula Melo de Abreu Vieira - Orientadora - Universidade Federal de Ouro Preto  
Dra. Viviane Flores Xavier - Co-orientadora - Universidade Federal de Ouro Preto  
Dra. Thais Lopes Valentim Di Paschoale Ostolin - Universidade Federal de Ouro Preto  
Preto Doutorando César Henrique Pereira - Universidade Federal de Ouro Preto

Paula Melo de Abreu Vieira, orientadora do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito na Biblioteca Digital de Trabalhos de Conclusão de Curso da UFOP em 04/08/2026



Documento assinado eletronicamente por **Paula Melo de Abreu Vieira, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 04/08/2026, às 15:45, 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](http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1152302** e o código CRC **A77633C8**.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, por me conceder força, sabedoria e perseverança para superar os desafios e por iluminar minha caminhada, guiando-me em todos os momentos. À Nossa Senhora Aparecida, pela constante intercessão, proteção e acolhimento, especialmente nos momentos de incerteza.

Ao meu pai, Antônio, por todo o amor, apoio, incentivo e por sempre acreditar em mim. Sua presença, cuidado e dedicação foram fundamentais para que esse sonho se tornasse realidade. À minha mãe, Helena, *in memoriam*, por todo o amor, carinho e dedicação. Sua memória continua sendo minha maior força e inspiração.

À minha família, por ser meu alicerce e minha essência. Ao Mateus, por todo o amor, apoio, companheirismo e incentivo ao longo desta caminhada. Aos meus amigos, Mariana, Laura, Gabriela, João Pedro e Sandrine, por tornarem essa jornada mais leve e especial.

À Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) e à Escola de Farmácia (EFAR), por terem sido minha segunda casa durante todos esses anos, oferecendo oportunidades, desafios e experiências que foram fundamentais para minha formação acadêmica, profissional e pessoal.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro concedido, fundamental para a realização deste trabalho e para o desenvolvimento da pesquisa científica.

Ao Laboratório de Morfopatologia (LMP), por me acolher e proporcionar um ambiente de aprendizado, pesquisa e crescimento científico. Ao Laboratório de Fitotecnologia e ao meu coorientador, Dr. Gustavo Henrique Bianco de Souza, por viabilizarem a realização de parte desta pesquisa. Ao Laboratório de Imunopatologia (LIMP), pela colaboração, disponibilidade e auxílio na execução de parte desta pesquisa. Agradeço pelo suporte e pelas valiosas contribuições para o desenvolvimento deste trabalho.

Em especial, agradeço à minha orientadora, Profa. Dra. Paula Melo de Abreu Vieira, e à minha coorientadora, Dra. Viviane Flores Xavier, pela oportunidade de desenvolver este trabalho e pela confiança depositada em mim. Sou imensamente grata pela orientação, dedicação, incentivo e disponibilidade ao longo de toda a

pesquisa. Agradeço pelos valiosos ensinamentos, pelas contribuições científicas, pela paciência e pelo constante apoio, que foram fundamentais para o meu crescimento acadêmico e para a concretização deste trabalho.

Por fim, agradeço a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho. Cada gesto de apoio, incentivo e colaboração foi essencial para que eu chegasse até aqui. A todos vocês, meu mais sincero agradecimento.

## RESUMO

As feridas crônicas representam um importante problema de saúde pública devido à elevada prevalência, ao impacto na qualidade de vida dos pacientes e aos altos custos relacionados ao tratamento. Diante desse contexto, a combinação de extratos vegetais com sistemas nanoestruturados representa uma estratégia inovadora para o tratamento de feridas, pois alia o potencial biológico dos fitoconstituintes, às vantagens tecnológicas dos sistemas de liberação. Assim, o presente estudo teve como objetivo investigar o potencial anti-inflamatório *in vitro* de uma formulação nanoestruturada contendo extratos das folhas de *Melaleuca leucadendron* (*M. leucadendron*) e *Protium spruceanum* (*P. spruceanum*), considerando seu potencial para favorecer o processo de cicatrização de feridas. A formulação foi caracterizada quanto às propriedades organolépticas, pH, diâmetro hidrodinâmico médio de partícula (DHMP), índice de polidispersão (IPD) e potencial zeta. A citotoxicidade foi avaliada em macrófagos RAW 264.7 pelo método da Sulforodamina B, nos tempos de 24, 48 e 72 horas, para determinação das concentrações seguras de uso. O potencial anti-inflamatório foi investigado por meio da quantificação indireta da produção de óxido nítrico (NO) pelo método de Griess e da dosagem das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$ , TNF e IL-17A pela técnica de Cytometric Bead Array (CBA). A formulação apresentou aspecto homogêneo, pH compatível com aplicação tópica, DHMP de  $245,9 \pm 44,97$  nm, IPD de  $0,476 \pm 0,13$  e potencial zeta de  $-11,5 \pm 0,32$  mV. Os ensaios de citotoxicidade demonstraram maior viabilidade celular em 24 horas de exposição, sendo estabelecidas concentrações inferiores ao menor valor de CC<sub>50</sub> para os ensaios subsequentes. A formulação promoveu redução significativa da produção de NO na maior parte das concentrações e tempos avaliados, com efeito dependente da concentração, enquanto a formulação branco não apresentou efeito significativo. Na avaliação das citocinas, IL-2, IL-4 e IL-17A não foram detectadas. A formulação promoveu redução significativa da produção de IL-6 em todos os tempos avaliados, bem como de TNF nas primeiras 24 e 48 horas e de IL-10 após 48 e 72 horas. Os níveis de IFN- $\gamma$  permaneceram praticamente inalterados entre os grupos experimentais. Os resultados indicam que a formulação estudada apresenta potencial para modular mediadores inflamatórios envolvidos na cicatrização, destacando-se como uma alternativa promissora para o desenvolvimento de terapias tópicas destinadas ao tratamento de feridas.

Palavras-chave: Feridas crônicas; Sistemas nanoestruturados; Atividade anti-inflamatória; *Melaleuca leucadendron*; *Protium spruceanum*.

## ABSTRACT

Chronic wounds represent a major public health concern due to their high prevalence, negative impact on patients' quality of life, and the high costs associated with treatment. In this context, the combination of plant extracts with nanostructured systems represents an innovative strategy for wound treatment by combining the biological potential of phytoconstituents with the technological advantages of drug delivery systems. Thus, the present study aimed to investigate the *in vitro* anti-inflammatory potential of a nanostructured formulation containing leaf extracts of *Melaleuca leucadendron* (*M. leucadendron*) and *Protium spruceanum* (*P. spruceanum*), considering its potential to promote the wound healing process. The formulation was characterized in terms of organoleptic properties, pH, mean hydrodynamic particle diameter (MHPD), polydispersity index (PDI), and zeta potential. Cytotoxicity was evaluated in RAW 264.7 murine macrophages using the Sulforhodamine B assay at 24, 48, and 72 hours to determine safe concentrations for subsequent experiments. The anti-inflammatory potential was investigated by indirect quantification of nitric oxide (NO) production using the Griess assay and by measuring the cytokines IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$ , TNF, and IL-17A using the Cytometric Bead Array (CBA) technique. The formulation exhibited a homogeneous appearance, pH compatible with topical application, MHPD of  $245.9 \pm 44.97$  nm, PDI of  $0.476 \pm 0.13$ , and zeta potential of  $-11.5 \pm 0.32$  mV. Cytotoxicity assays demonstrated greater cell viability after 24 hours of exposure, and concentrations below the lowest CC<sub>50</sub> value were selected for subsequent assays. The formulation significantly reduced NO production at most concentrations and experimental time points in a concentration-dependent manner, whereas the blank formulation showed no significant effect. Regarding cytokine production, IL-2, IL-4, and IL-17A were not detected. The formulation significantly reduced IL-6 production at all evaluated time points, as well as TNF levels at 24 and 48 hours and IL-10 levels at 48 and 72 hours. IFN- $\gamma$  levels remained virtually unchanged among the experimental groups. These findings indicate that the studied formulation has the potential to modulate inflammatory mediators involved in wound healing, highlighting its promise as a topical therapeutic approach for the treatment of wounds.

Keywords: Chronic wounds; Nanostructured systems; Anti-inflammatory activity; *Melaleuca leucadendron*; *Protium spruceanum*.

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                          |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1: Aspecto geral das folhas, flores e árvore de <i>M.leucadendron</i> .....                                                                                                                       | 22 |
| Figura 2: Aspecto geral da árvore e das folhas de <i>P. spruceanum</i> .....                                                                                                                             | 23 |
| Figura 3: Procedimentos para obtenção da formulação nanoestruturada.....                                                                                                                                 | 27 |
| Figura 4: Quantificação indireta da produção de óxido nítrico em macrófagos RAW 264.7 tratados com F-EEBPM ou com FB-EEBPM.....                                                                          | 34 |
| Figura 5: Quantificação de (A)IL-10, (B)IL-6, (C)IFN- $\gamma$ e (D)TNF em sobrenadante de cultura de macrófagos RAW estimulados com LPS+IFN- $\gamma$ e tratados com EEBP+EEBM, F-EEBPM e FB-EEBPM..... | 35 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                                               |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1. Valores de pH das formulações FB-EEBPM e F-EEBPM expressos como média $\pm$ desvio padrão.....                                                                                      | 32 |
| Tabela 2: DHMP, PDI e potencial zeta da formulação branco e da formulação contendo os extratos de <i>M. leucadendron</i> e <i>P. spruceanum</i> .....                                         | 32 |
| Tabela 3: Estimativas de CC <sub>50</sub> dos extratos livres (EEBP + EEBM), formulação contendo extratos (F-EEBPM) e formulação branco (FB-EEBPM) obtidas a partir do ajuste não linear..... | 33 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CBA – Cytometric Bead Array

CC<sub>50</sub> – Concentração Citotóxica para 50% das células

CIPHARMA – Centro de Pesquisa em Ciências Farmacêuticas

COX – Ciclooxigenase

DAMPs – Padrões Moleculares Associados ao Dano

DHMP – Diâmetro Hidrodinâmico Médio de Partícula

DMSO – Dimetilsulfóxido

EEBM – Extrato Etanólico Bruto de *Melaleuca leucadendron*

EEBP – Extrato Etanólico Bruto de *Protium spruceanum*

FB-EEBPM – Formulação branco contendo extratos etanólicos brutos de *Protium spruceanum* e *Melaleuca leucadendron*

F-EEBPM – Formulação contendo extratos etanólicos brutos de *Protium spruceanum* e *Melaleuca leucadendron*

IFN-γ – Interferon gama

IGF-1 – Fator de Crescimento Semelhante à Insulina tipo 1

IL – Interleucina

iNOS – Óxido Nítrico Sintase Induzível

IUPAC – International Union of Pure and Applied Chemistry

LPS – Lipopolissacarídeo

MAPKs – Proteínas Quinases Ativadas por Mitógenos

MEC – Matriz Extracelular

MMPs – Metaloproteinases da Matriz

NF-κB – Fator Nuclear kappa B

NO – Óxido Nítrico

PAMPs – Padrões Moleculares Associados a Patógenos

PBS – Solução Salina Tamponada com Fosfato

PDGF – Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas

PDI – Índice de Polidispersão

PEO – Poli(óxido de etileno)

PICS – Práticas Integrativas e Complementares em Saúde

PPO – Poli(óxido de propileno)

RPMI – Roswell Park Memorial Institute (meio de cultura celular)

SRB – Sulforodamina B

SUS – Sistema Único de Saúde

TGF- $\beta$  – Fator de Crescimento Transformador beta

TNF – Fator de Necrose Tumoral

UFOP – Universidade Federal de Ouro Preto

VEGF – Fator de Crescimento Endotelial Vascular

# SUMÁRIO

|                                                                   |           |
|-------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1 REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>                                 | <b>14</b> |
| 1.1 Cicatrização.....                                             | 14        |
| 1.1.1 Fatores que interferem na cicatrização.....                 | 17        |
| 1.1.2 Epidemiologia.....                                          | 18        |
| 1.1.3 Tratamentos disponíveis.....                                | 19        |
| 1.2 Plantas medicinais cicatrizantes.....                         | 20        |
| 1.2.1 <i>Melaleuca leucadendron</i> .....                         | 21        |
| 1.2.2 <i>Protium spruceanum</i> .....                             | 22        |
| 1.3 Nanoformulações.....                                          | 24        |
| <b>2 JUSTIFICATIVA.....</b>                                       | <b>24</b> |
| <b>3 OBJETIVOS.....</b>                                           | <b>25</b> |
| 3.1 Objetivo Geral.....                                           | 25        |
| 3.2 Objetivo Específico.....                                      | 25        |
| <b>4 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>                                 | <b>26</b> |
| 4.1 Coleta dos materiais vegetais e obtenção do extrato.....      | 26        |
| 4.2 Obtenção da formulação nanoestruturada.....                   | 26        |
| 4.3 Caracterização da formulação.....                             | 27        |
| 4.4. Ensaio <i>in vitro</i> .....                                 | 28        |
| 4.4.1 Cultivo celular e plaqueamento.....                         | 28        |
| 4.4.2 Citotoxicidade em células RAW - Método Sulforodamina B..... | 28        |
| 4.4.3 Quantificação de óxido nítrico.....                         | 29        |
| 4.4.4 Quantificação de citocinas.....                             | 30        |
| 4.5 Análise estatística.....                                      | 31        |
| <b>5 RESULTADOS.....</b>                                          | <b>32</b> |
| 5.1 Caracterização da formulação.....                             | 32        |
| 5.2 Citotoxicidade em células RAW.....                            | 33        |
| 5.3 Quantificação de óxido nítrico.....                           | 34        |
| 5.4 Quantificação de citocinas.....                               | 35        |
| <b>6 DISCUSSÃO.....</b>                                           | <b>37</b> |
| <b>7 CONCLUSÃO.....</b>                                           | <b>47</b> |
| <b>8 REFERÊNCIAS.....</b>                                         | <b>48</b> |

# 1 REFERENCIAL TEÓRICO

## 1.1 Cicatrização

A cicatrização de feridas é um processo biológico complexo e dinâmico, caracterizado por uma coordenada cascata de eventos celulares, moleculares, bioquímicos e fisiológicos que atuam de forma integrada para promover a reconstituição do tecido lesionado. Esse mecanismo é fundamental para garantir a restauração da integridade e da funcionalidade da pele após a ocorrência de danos teciduais. As feridas surgem a partir do rompimento da estrutura e da função da pele, podendo ser desencadeadas por mecanismos agudos ou crônicos, como traumas, doenças primárias da pele ou ainda como consequência de patologias secundárias. Dessa forma, o processo de cicatrização desempenha papel essencial na manutenção da homeostase do organismo, assegurando a recuperação tecidual por meio de eventos que precisam ocorrer de maneira harmoniosa e organizada (SILVA et al., 2024; FERREIRA et al., 2024).

Nesse contexto, o processo cicatricial ocorre por meio de uma sequência organizada e interdependente de eventos celulares e moleculares, tradicionalmente dividida em quatro fases principais: hemostasia, inflamação, proliferação e remodelação dérmica (CIOCE et al., 2024). A hemostasia representa a etapa inicial da cicatrização e tem como principal objetivo interromper o sangramento após a lesão vascular. Inicialmente, ocorre a vasoconstrição dos vasos sanguíneos, seguida pela exposição do colágeno subendotelial, que estimula a ativação, adesão e agregação plaquetária, formando o tampão plaquetário, fenômeno conhecido como hemostasia primária. Posteriormente, ocorre a ativação da cascata de coagulação, promovendo a conversão do fibrinogênio solúvel em filamentos insolúveis de fibrina, formando a rede de fibrina, etapa denominada hemostasia secundária. A associação entre o tampão plaquetário e a rede de fibrina resulta na formação do trombo, responsável por interromper o fluxo sanguíneo e fornecer uma matriz provisória para a migração celular. Além disso, alterações na osmolaridade tecidual e o aumento da produção de peróxido de hidrogênio contribuem para a migração de leucócitos para o local da lesão (CIOCE et al., 2024; PATENALL; CARTER; RAMSEY, 2024).

A fase inflamatória ocorre concomitante à hemostasia e é caracterizada pela atuação de células imunes responsáveis pela contenção da lesão e pelo estabelecimento de uma barreira de defesa contra microrganismos. Após uma lesão, ocorre ruptura celular e vascular, resultando na liberação de moléculas sinalizadoras conhecidas como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e padrões moleculares associados a danos (DAMPs), que ativam células residentes do tecido, como macrófagos, mastócitos e células dendríticas (CIOCE et al., 2024). Paralelamente, as plaquetas ativadas liberam citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, como o fator de crescimento transformador beta (TGF- $\beta$ ) e o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), responsáveis pelo recrutamento de neutrófilos, macrófagos e fibroblastos, células fundamentais para o início e progressão das fases inflamatória e proliferativa da cicatrização (PATENALL; CARTER; RAMSEY, 2024).

Após a detecção do dano pelas células residentes, ocorre intensa produção de citocinas, quimiocinas e mediadores vasoativos, como histamina e prostaglandinas, que induzem alterações vasculares locais caracterizadas por vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, favorecendo o recrutamento de leucócitos para o local da lesão. Inicialmente, predominam os neutrófilos, responsáveis pela fagocitose de microrganismos e remoção de detritos celulares. Posteriormente, monócitos migram para o tecido e diferenciam-se em macrófagos, que coordenam a resposta inflamatória e auxiliam na remoção celular (KUMAR et al., 2025). Inicialmente, predominam macrófagos com perfil pró-inflamatório (M1), também denominados macrófagos classicamente ativados, que participam da amplificação da resposta inflamatória e da remoção de células apoptóticas e detritos celulares no local da lesão. Essas células liberam mediadores pró-inflamatórios, incluindo as citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, IL-23 e TNF- $\alpha$ , que promovem o recrutamento e ativação de células imunológicas, auxiliam na eliminação de agentes infecciosos e contribuem para a ativação da resposta imune adaptativa (CIOCE et al., 2024; PATENALL; CARTER; RAMSEY, 2024).

Em estágios mais tardios da fase inflamatória, as citocinas liberadas no microambiente recrutam linfócitos T, os quais também participam da regulação da resposta imune por meio da produção de citocinas. Por fim, a remoção dos neutrófilos e a transição dos macrófagos para um perfil reparador (M2) promovem a

resolução da resposta inflamatória e o início da fase proliferativa da cicatrização. Os macrófagos M2, também denominados macrófagos alternativamente ativados, desempenham papel fundamental no reparo tecidual por expressarem mediadores anti-inflamatórios e reparadores, como IL-10, TGF- $\beta$ , VEGF-A e IGF-1. Além disso, essas células estimulam processos essenciais para a regeneração, incluindo a proliferação de fibroblastos, síntese de componentes da matriz extracelular (MEC) e angiogênese. Dessa forma, a transição do fenótipo M1 para M2 representa um evento crucial para o controle da inflamação e para o estabelecimento de um microambiente favorável à reconstrução e remodelamento do tecido lesionado (CIOCE et al., 2024; KUMAR et al., 2025).

Com a redução da resposta inflamatória, inicia-se a fase proliferativa, que pode durar de alguns dias a semanas e tem como principal objetivo promover a redução da área lesionada e a restauração do tecido danificado. Essa fase é caracterizada pela reepitelização da ferida, pela formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese) e pelo desenvolvimento do tecido de granulação, composto por grande quantidade de fibroblastos, granulócitos, macrófagos, vasos sanguíneos e feixes de colágeno (CRIOLLO-MENDOZA et al., 2023; CIOCE et al., 2024). Inicialmente, os fibroblastos, ativados por citocinas e fatores de crescimento produzidos por macrófagos e outros leucócitos, migram para o local da ferida e sintetizam componentes da matriz extracelular, como hialuronano, fibronectina e proteoglicanos, que substituem gradualmente o coágulo de fibrina formado durante a hemostasia. Em seguida, essas células passam a produzir colágeno, principalmente do tipo III, fornecendo sustentação estrutural ao tecido em regeneração. Paralelamente, ocorre a formação do tecido de granulação, constituído por fibroblastos, matriz extracelular recém-formada e novos vasos sanguíneos, que atuam como suporte para o reparo tecidual (CRIOLLO-MENDOZA et al., 2023; KUMAR et al., 2025).

Ao mesmo tempo, ocorre a angiogênese, processo responsável pela formação de novos vasos sanguíneos e pelo fornecimento de oxigênio e nutrientes ao tecido em regeneração. Esse processo é estimulado pela hipóxia presente na ferida, que induz a expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), promovendo a proliferação e a migração de células endoteliais. Simultaneamente, citocinas e fatores de crescimento estimulam a proliferação e a migração dos queratinócitos das bordas da ferida, favorecendo a reepitelização e o

restabelecimento da barreira epidérmica. À medida que o processo cicatricial avança, parte dos fibroblastos diferencia-se em miofibroblastos, células especializadas que promovem a contração da ferida, aproximando suas margens e contribuindo para a redução da área lesionada e o fechamento tecidual (CRIOLLO-MENDOZA et al., 2023; PATENALL; CARTER; RAMSEY, 2024).

Na fase final da cicatrização, denominada remodelação, que pode se estender por até dois anos, a matriz extracelular é gradualmente reorganizada e transformada em uma cicatriz madura. Nesse período, o colágeno tipo III, predominante nas fases iniciais do reparo tecidual, é progressivamente substituído pelo colágeno tipo I, mais resistente. Além disso, ocorre redução da formação de novos vasos sanguíneos e do fluxo sanguíneo local, resultando em um tecido cicatricial menos celular e menos vascularizado (CRIOLLO-MENDOZA et al., 2023; ESAD et al., 2025).

#### 1.1.1 Fatores que interferem na cicatrização

Feridas geralmente cicatrizam em cerca de 4 a 6 semanas, sendo consideradas crônicas aquelas que não apresentam resolução dentro desse período. Nessas situações, o processo cicatricial tende a permanecer estagnado entre as fases inflamatória e proliferativa, comprometendo a redução da inflamação e a reconstrução adequada da arquitetura tecidual (WALLACE; BASEHORE; ZITO, 2023; PATENALL; CARTER; RAMSEY, 2024).

A cicatrização deficiente pode estar relacionada a diversos fatores sistêmicos e locais que interferem nas etapas normais do reparo tecidual. Entre os principais fatores sistêmicos estão diabetes, idade avançada, desnutrição e outras doenças crônicas de órgão. Já entre os fatores locais que prejudicam o processo cicatricial, destacam-se pressão sobre o tecido, edema, infecção da ferida, maceração, desidratação, corpos estranhos, hipóxia e isquemia (MONIKA et al., 2022; WALLACE; BASEHORE; ZITO, 2023).

O biofilme bacteriano representa outro importante fator que compromete a cicatrização de feridas, pois forma uma camada viscosa que protege as bactérias contra as defesas do hospedeiro. Além disso, pode reduzir o oxigênio e o pH no leito da ferida e atuar como uma barreira física que dificulta a migração celular e a ação

de medicamentos e anticorpos, contribuindo para a manutenção e piora da lesão (MONIKA et al., 2022; WALLACE; BASEHORE; ZITO, 2023).

Além dos fatores locais e sistêmicos que comprometem a cicatrização, a redução dos fatores de crescimento tecidual, o aumento de enzimas proteolíticas, como as metaloproteinases da matriz (MMPs) e o aumento de mediadores inflamatórios contribuem para a cronificação das feridas, podendo atuar como potenciais biomarcadores desse processo. O estresse oxidativo também desempenha papel relevante, uma vez que estimula a produção de citocinas pró-inflamatórias e MMPs, favorecendo a degradação da matriz extracelular e comprometendo a função de fibroblastos e queratinócitos, o que prejudica o reparo tecidual adequado (MONIKA et al., 2022; PATENALL; CARTER; RAMSEY, 2024).

### 1.1.2 Epidemiologia

As feridas representam um problema crescente na área da saúde mundial e configuram um importante desafio de saúde pública. Trata-se de uma condição ainda subnotificada, mas que acomete milhões de pessoas em todo o mundo, gerando impactos significativos na qualidade de vida dos pacientes e nos sistemas de saúde (RODRIGUES et al., 2025). Nesse contexto, o aumento significativo dos casos de feridas crônicas está diretamente relacionado ao envelhecimento populacional e ao crescimento da prevalência de doenças crônicas associadas (BRASIL, 2025).

De acordo com dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a população idosa no Brasil deverá atingir 41,5 milhões em 2030, podendo alcançar 73,5 milhões em 2060. Esse cenário tende a impactar diretamente os serviços de saúde, com aumento da ocorrência de feridas associadas a doenças crônicas relacionadas ao envelhecimento. Além disso, estima-se que a incidência anual de feridas crônicas no país seja de aproximadamente três a cinco novos casos por mil habitantes, evidenciando a elevada prevalência dessas lesões na população e reforçando sua relevância como um importante problema de saúde pública (LIMA et al., 2024). No Brasil, essas lesões também representam um importante impacto assistencial e econômico, tendo sido responsáveis por mais de 700 mil internações em 2020, com custo aproximado de R\$ 850 milhões ao Sistema Único de Saúde

(SUS), segundo o Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (CRUZ et al., 2024).

A elevada ocorrência de feridas crônicas também pode ser observada em nível mundial. Estima-se que a prevalência dessas lesões seja de aproximadamente 2,2 casos por 1.000 habitantes, sendo as úlceras de membros inferiores de etiologia venosa, arterial ou mista e as lesões em pés de pessoas com diabetes, as manifestações mais frequentes (MARTINENGO et al., 2019).

Diante desse cenário epidemiológico e do aumento progressivo da incidência e prevalência dessas lesões, a cronificação das feridas configura-se como um relevante desafio para os serviços de saúde. Isso se deve aos elevados custos assistenciais, aumento da demanda por serviços especializados e significativa sobrecarga dos sistemas de saúde. Além disso, esses agravos não se restringem ao aspecto clínico, estando também associadas a importantes repercussões econômicas e sociais, como perda de produtividade, impacto financeiro e comprometimento da dinâmica familiar. As repercussões psicossociais incluem ainda alterações na imagem corporal, limitações funcionais e dependência de cuidados contínuos. Nesse sentido, a necessidade de intervenções precoces e terapias adequadas torna-se fundamental para minimizar complicações e favorecer o processo de cicatrização (GONÇALVES, 2024).

### 1.1.3 Tratamentos disponíveis

O tratamento de feridas crônicas tem apresentado avanços significativos ao longo dos anos, com o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas que ampliam as possibilidades de cuidado. Entre essas estratégias, destacam-se limpeza da ferida, desbridamento, controle de infecção, manejo do exsudato e uso de coberturas específicas. Entre os curativos mais utilizados estão hidrogéis, espumas e coberturas com agentes antimicrobianos, como a prata. Esses materiais atuam principalmente na manutenção de um ambiente úmido favorável à cicatrização, favorecendo a migração celular, a formação de tecido de granulação e a reepitelização. Além disso, terapias adjuvantes como terapia por pressão negativa, laser de baixa potência, uso de derivados sanguíneos e ozonioterapia têm sido incorporadas ao manejo clínico com o objetivo de acelerar o processo cicatricial e

reduzir complicações associadas às feridas crônicas (VASCONCELOS et al., 2023; SILVA et al., 2023).

No entanto, apesar dos benefícios observados, muitas dessas terapias ainda apresentam limitações relacionadas ao acesso da população e ao conhecimento dos profissionais de saúde sobre seus mecanismos de ação e indicações. Outro fator relevante é que muitas terapias apresentam custo elevado e baixa acessibilidade no sistema público de saúde. Desse modo, torna-se necessário o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o tratamento de feridas crônicas, considerando a complexidade do processo cicatricial e os desafios relacionados ao custo e à acessibilidade. A busca por terapias mais eficazes, seguras e economicamente viáveis pode contribuir para acelerar o reparo tecidual, reduzir complicações e ampliar o acesso ao cuidado, especialmente no contexto da saúde pública (VASCONCELOS et al., 2023; MELO DA SILVA et al., 2025; OLIVEIRA et al., 2026).

## 1.2 Plantas medicinais cicatrizantes

Muitas plantas medicinais já foram investigadas devido às suas propriedades cicatrizantes. O Brasil apresenta um enorme potencial para o desenvolvimento de fitoterápicos, sendo um dos países com a maior diversidade biológica do mundo, o que o posiciona como uma potência no campo das plantas medicinais. Das aproximadamente 200 mil espécies vegetais nativas brasileiras, estima-se que metade possua algum efeito terapêutico, porém somente cerca de 1% dessas espécies com potencial já foram objeto de pesquisas científicas (VIERA et al., 2016; MELO et al., 2023).

Segundo o Ministério da Saúde, a fitoterapia é caracterizada pelo uso de plantas medicinais em suas diferentes formas farmacêuticas, sem a utilização de substâncias ativas isoladas, constituindo uma prática terapêutica voltada à promoção, proteção e recuperação da saúde (BRASIL, 2025). Nesse contexto, a fitoterapia tem apresentado crescente relevância nas últimas décadas e, atualmente, integra as Práticas Integrativas e Complementares em Saúde (PICS). No cenário nacional, a fitoterapia destaca-se pelo potencial de impactar positivamente a assistência em saúde, não apenas em função das ações terapêuticas atribuídas aos constituintes bioativos presentes nas plantas medicinais e nos fitoterápicos, mas também por representar uma alternativa terapêutica mais acessível

economicamente, favorecendo a ampliação do acesso aos tratamentos e contribuindo para a continuidade do cuidado em saúde (GOMES et al., 2025).

Diante desse cenário, cresce o interesse científico pela investigação de plantas medicinais com potencial cicatrizante. Diversos estudos têm demonstrado que os compostos bioativos presentes nos extratos vegetais, como flavonoides, alcaloides, taninos e outros fitoconstituintes, podem modular importantes mecanismos envolvidos no reparo tecidual. Essas substâncias exercem atividades anti-inflamatórias, antioxidantes e antimicrobianas, contribuindo para a redução do estresse oxidativo e para o controle da resposta inflamatória. Além disso, são capazes de estimular a proliferação e a migração de células essenciais para a regeneração dos tecidos, favorecer a angiogênese e aumentar a deposição de colágeno, acelerando o processo de cicatrização. Dessa forma, os produtos de origem vegetal representam alternativas promissoras para o desenvolvimento de novas terapias destinadas ao tratamento de feridas agudas e crônicas (ESAD et al., 2025).

#### 1.2.1 *Melaleuca leucadendron*

*M. leucadendron*, popularmente conhecida como “árvore-da-casca-de-papel”, “Cajeput” ou “Kayu putih”, é uma espécie pertencente ao gênero *Melaleuca*, integrante da família Myrtaceae. Essa família compreende aproximadamente 133 gêneros e mais de 3.800 espécies identificadas, destacando-se pela ampla diversidade botânica e distribuição geográfica. O gênero *Melaleuca* apresenta distribuição natural pela Austrália e Sudoeste Asiático e reúne mais de 260 espécies catalogadas (OLIVEIRA et al., 2020; PATRAMURTI et al., 2020; SILVA, 2022).

*M. leucadendron* apresenta porte arbóreo, podendo atingir aproximadamente 40 metros de altura, com tronco robusto que alcança até 1,5 metro de diâmetro (**Figura 1**). A espécie distingue-se principalmente pela casca branca, fina e estratificada, com aspecto semelhante a folhas de papel, característica que originou uma de suas denominações populares. Além disso, suas folhas são ricas em óleo essencial, composto por metabólitos bioativos que apresentam relevantes propriedades terapêuticas e estão associados a diversas aplicações medicinais e farmacológicas (SIANI et al., 2016).

Devido às suas propriedades terapêuticas e ao potencial de aplicação na área da saúde, espécies do gênero *Melaleuca* vêm sendo amplamente investigadas. Tradicionalmente, plantas da família Myrtaceae são empregadas no tratamento de tosse, resfriados e infecções de garganta, além de serem utilizadas como antissépticos em feridas e no manejo de afecções cutâneas. Nesse contexto, *M. leucadendron* tem despertado crescente interesse científico por apresentar diversas atividades biológicas, incluindo ações antioxidante, antimicrobiana, antifúngica, anti-inflamatória e antimalárica, evidenciando seu potencial como fonte promissora para o desenvolvimento de produtos terapêuticos e farmacológicos (WRIGHT et al., 2015; BRUN et al., 2019; ZHANG et al., 2019; BAUTISTA-SILVA et al., 2020).

**Figura 1:** Aspecto geral das folhas, flores e árvore de *M.leucadendron*.



À esquerda, detalhe das folhas e flores de *M. leucadendron*; à direita, aspecto geral da árvore. Fotografias registradas na Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil.

Fonte: Acervo do autor (2026)

### 1.2.2 *Protium spruceanum*

Outra espécie que apresenta grande destaque é *P. spruceanum*, pertencente à família Burseraceae e popularmente conhecida como “breu”. Trata-se de uma espécie nativa do Brasil que apresenta porte arbóreo com dossel, podendo atingir até aproximadamente 20 metros de altura (**Figura 2**). Possui ocorrência em diferentes biomas, sendo encontrada na Amazônia, na Mata Atlântica e no domínio Cerrado, especialmente no estado de Goiás. Estudos também demonstram sua

ampla diversidade ecológica, com registros nos estados de Minas Gerais, Bahia, Mato Grosso do Sul e São Paulo, onde ocorre em ambientes de florestas tropicais, matas ciliares, áreas ripárias e regiões de brejo (MENEZES FILHO et al., 2021; AMPARO et al., 2024).

A família botânica Burseraceae é composta por aproximadamente 19 gêneros e 750 espécies (VELOSO et al., 2025). Na medicina tradicional, espécies pertencentes a essa família são amplamente utilizadas devido às suas propriedades terapêuticas, destacando-se atividades anti-inflamatórias, analgésicas, expectorantes e cicatrizantes (CONRADO et al., 2015).

Estudos *in vitro* demonstraram que o extrato hidrometanólico obtido das folhas e dos galhos de *P. spruceanum* apresenta potencial para aplicação no tratamento de infecções cutâneas, em razão de suas atividades anti-inflamatória, antioxidante e antibacteriana. Esses efeitos têm sido associados à presença de compostos fenólicos, com destaque para taninos e flavonoides (AMPARO et al., 2024; VELOSO et al., 2025). É importante ressaltar que os compostos fenólicos auxiliam no processo de reparo tecidual por meio do estímulo da produção de colágeno, pela inibição de radicais livres, indução de angiogênese e modulação de fatores relacionados com a fase inflamatória, além de serem antimicrobianos (MOGHADAM et al., 2017).

**Figura 2:** Aspecto geral da árvore e das folhas de *P. spruceanum*



À esquerda, aspecto geral da árvore de *P. spruceanum*; à direita, detalhe de suas folhas. Fotografias registradas no município de Lavras, Minas Gerais, Brasil.

Fonte: Acervo do autor (2026)

### 1.3 Nanoformulações

Além do crescente reconhecimento das propriedades terapêuticas das plantas medicinais, ressalta-se também a importância do desenvolvimento de sistemas eficientes para a administração de extratos vegetais. Entre as opções mais promissoras, destacam-se os nanossistemas poliméricos para uso tópico, os quais possibilitam a liberação controlada e prolongada dos princípios ativos, aumentam a estabilidade das formulações, reduzem efeitos colaterais, permitem a incorporação de compostos com diferentes polaridades, tanto hidrofílicos quanto hidrofóbicos, diminuem a frequência de aplicação e os custos com o tratamento (CHEN et al., 2022; SILVA et al., 2023).

Nesse contexto, destacam-se os hidrogéis nanoestruturados, sistemas constituídos por redes tridimensionais de cadeias poliméricas com elevada capacidade de absorção e retenção de água. Além das vantagens anteriormente atribuídas aos nanossistemas poliméricos, esses sistemas apresentam propriedades específicas que favorecem sua aplicação tópica. Devido à presença de redes hidrofílicas robustas, os hidrogéis nanoestruturados apresentam características estruturais capazes de mimetizar a matriz extracelular (MEC) da pele. Além disso, possuem propriedades inerentes, como elevada hidratação e biocompatibilidade, que contribuem para a manutenção de um ambiente favorável ao reparo tecidual e, conseqüentemente, para a promoção do processo de cicatrização (LIMA et al., 2020; DAM et al., 2023). Nesse cenário, observa-se um interesse crescente da comunidade científica no desenvolvimento de formulações farmacêuticas em escala nanométrica a partir de extratos vegetais (PORTO et al, 2020).

## 2 JUSTIFICATIVA

As feridas representam um importante problema de saúde pública devido à elevada prevalência, ao impacto na qualidade de vida dos pacientes e aos altos custos associados ao tratamento, especialmente nos casos de lesões de difícil cicatrização. Embora existam diferentes abordagens terapêuticas disponíveis para o tratamento de feridas, muitas ainda apresentam limitações relacionadas ao elevado custo e ao acesso restrito por parte da população. Esses fatores podem comprometer a adesão ao tratamento, prolongar o tempo de recuperação e

aumentar a demanda por recursos e serviços de saúde, evidenciando a necessidade do desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais acessíveis, seguras e eficazes.

Nesse contexto, o uso de produtos de origem vegetal tem despertado crescente interesse científico em razão da presença de compostos bioativos capazes de atuar em diferentes etapas do processo cicatricial, incluindo modulação da resposta inflamatória, atividade antioxidante e antimicrobiana. Além disso, a aplicação de sistemas modernos de liberação, como hidrogéis e nanossistemas, pode aumentar a eficiência terapêutica dos fitoterápicos ao promover maior estabilidade das formulações, liberação controlada dos princípios ativos e redução de efeitos colaterais. Dessa forma, o investimento na pesquisa e no desenvolvimento de formulações fitoterápicas inovadoras, especialmente sistemas nanoestruturados contendo extratos de plantas medicinais, mostra-se uma estratégia promissora para o desenvolvimento de tratamentos mais seguros, acessíveis e eficazes para o manejo de feridas crônicas.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade anti-inflamatória *in vitro* de uma formulação nanoestruturada contendo extratos das folhas de *M. leucadendron* e *P. spruceanum*, visando investigar seu potencial cicatrizante.

#### 3.2 Objetivo Específico

- Produzir a formulação nanoestruturada contendo extrato das folhas de *M. leucadendron* e *P. spruceanum*;
- Caracterizar a formulação através da medição do pH, tamanho das partículas, índice de polidispersão e potencial zeta;
- Avaliar a citotoxicidade da formulação, a fim de estabelecer concentrações seguras para os ensaios posteriores;
- Avaliar a capacidade de modulação da resposta inflamatória por meio da quantificação da produção de NO e da avaliação de citocinas envolvidas no processo de cicatrização após o tratamento com a formulação.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Coleta dos materiais vegetais e obtenção do extrato

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

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

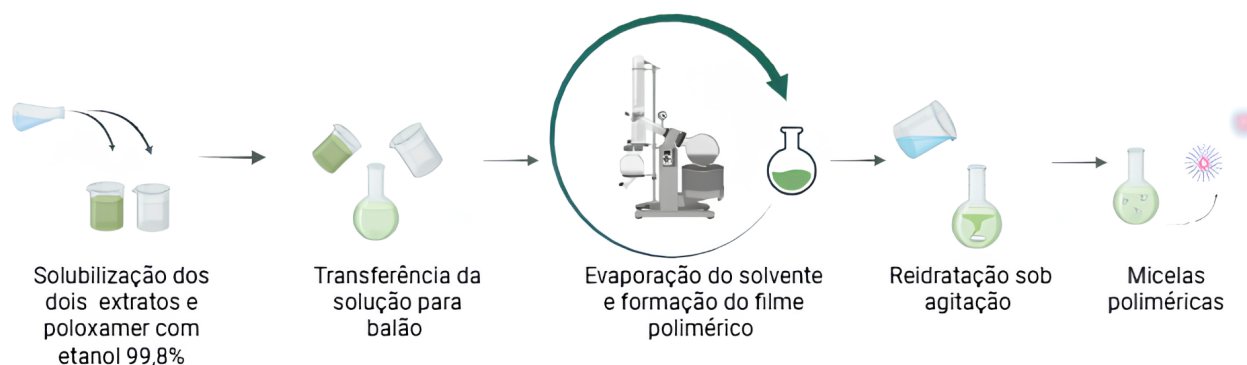
Já as folhas de *M. leucadendron* foram obtidas em 08 de março de 2021, em região compreendida entre as coordenadas -20°39'74,3"S – -43°50'73,7"N e -20°39'70,7"S – -43°50'82,8"N. O material foi depositado no Herbário Professor José Badini (DEBIO/ICEB/UFOP), sob o número de exsicata OUPR 29495, e o registro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

### 4.2 Obtenção da formulação nanoestruturada

O desenvolvimento e a otimização da formulação em estudo foram previamente realizados pelo grupo de pesquisa. Para a obtenção da formulação, os extratos vegetais e o poloxamer foram inicialmente solubilizados em etanol 99,8% P.A. As soluções resultantes foram transferidas para um balão de fundo redondo convencional, e o solvente foi posteriormente removido por meio de evaporação em rotaevaporador, sob pressão reduzida e temperatura controlada a 40 °C (**figura 3**).

Após a formação do filme polimérico, foi realizada a etapa de reidratação, na qual foi adicionada água ultrapura até que se atinja o volume final de 20 mL. Esse processo ocorreu sob agitação leve, utilizando um agitador magnético, com o objetivo de assegurar a homogeneização da formulação e evitar a formação de espuma.

**Figura 3:** Procedimentos para obtenção da formulação nanoestruturada



Fonte: Elaborado pelo autor (2026)

#### 4.3 Caracterização da formulação

A caracterização da formulação foi realizada por meio de análises em níveis macroscópico e microscópico. A avaliação macroscópica abrangeu a análise das propriedades organolépticas da formulação, incluindo cor, odor e aparência visual. Para a mensuração do pH, a amostra foi diluída em água ultrapura na proporção de 1:10, e a leitura foi realizada com o eletrodo do peagâmetro imerso diretamente na amostra, mantendo-se a temperatura constante em 25 °C.

As análises de DHMP, PDI e potencial zeta foram realizadas por meio da técnica de espalhamento de luz dinâmica e eletroforética, utilizando ângulo de retroespalhamento de 173°, a uma temperatura controlada de 25 °C. Para esses ensaios, as amostras foram previamente diluídas em água ultrapura na razão de 1:1000. Os dados foram obtidos com o auxílio do equipamento Zetasizer (modelo PN3702), operado pelo software Zetasizer, disponível no laboratório multiusuários do CIPHARMA-UFOP. Todos os ensaios foram realizados em triplicata, e os resultados foram expressos como média acompanhada do respectivo desvio padrão.

#### 4.4. Ensaios *in vitro*

##### 4.4.1 Cultivo celular e plaqueamento

Para o cultivo das células de macrófagos murinos RAW 264.7 foi utilizado meio RPMI 1640 (Sigma®) contendo 10% de soro fetal bovino (Vitrocell®) e gentamicina 60 µg/L, pH 7,22. As culturas foram incubadas em estufa a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub> por 48 horas ou até o tempo necessário para obter 80% ou mais de crescimento celular, trocando o meio quando o mesmo apresentava mudança de coloração (róseo-laranja para amarelo).

Após o crescimento e expansão das células, foi preparada a solução estoque ( $5 \times 10^5$  de células/ mL) em meio RPMI completo, conforme descrito anteriormente. Para o preparo da solução estoque, o meio de cultura foi descartado e as células foram desprendidas do frasco de cultura celular por raspagem com auxílio do suporte plástico (*cell scraper*), em seguida, foram adicionados aproximadamente 20 mL de meio RPMI completo para a homogeneização. A solução foi centrifugada a 1300 rpm por 07 minutos, o sobrenadante foi descartado e adicionou-se novamente aproximadamente 20 mL de meio RPMI completo para a homogeneização em vórtex.

Para a quantificação das células, as mesmas foram diluídas 20x em azul de tripan. E uma alíquota de 10 µL foi adicionada à câmara de Neubauer para a contagem. Após a devida diluição de forma a obter uma solução com  $5 \times 10^5$  células/mL de meio RPMI, foram pipetados 100 µL da mesma em cada poço da placa de cultura de 96 poços estéril. A placa foi incubada em estufa de CO<sub>2</sub> por 24 horas para que as células aderissem na mesma. Após esse período, o meio foi retirado e as placas foram lavadas com meio RPMI sem fenol completo.

##### 4.4.2 Citotoxicidade em células RAW - Método Sulforodamina B

Após o cultivo e o plaqueamento das células, conforme descrito no item anterior, foram adicionados 200 µL do hidrogel contendo os extratos, previamente solubilizados em meio RPMI, nas concentrações de 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10, 5 e 2,5%, em quadruplicata, às placas de cultura. A formulação branco também foi avaliada nas mesmas concentrações.

Como a formulação é composta por 1% de extrato etanólico bruto de *Protium spruceanum* e 0,65% de extrato etanólico bruto de *Melaleuca leucadendron*, os extratos livres (não incorporados à formulação) também foram submetidos ao ensaio. Para isso, foi preparada uma solução contendo a associação dos extratos de *P. spruceanum* e *M. leucadendron* nas mesmas proporções presentes na formulação (*P. spruceanum* à 1% + *M. leucadendron* à 0,65%). Inicialmente, os extratos foram solubilizados em DMSO e, em seguida, diluídos em meio RPMI até obter uma solução final contendo 1% de *P. spruceanum* e 0,65% de *M. leucadendron*. Essa solução foi avaliada nas concentrações de 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10, 5 e 2,5%, sendo distribuída em quadruplicata nas placas.

Após a adição das amostras, as placas foram incubadas por 24, 48 e 72 horas. Ao término de cada período de incubação, o meio foi removido e os poços foram lavados duas vezes com PBS (pH 7,2). Em seguida, as células foram fixadas com 100 µL de ácido tricloroacético a 20%, previamente resfriado, permanecendo por 1 hora a 4 °C. Após esse período, as placas foram lavadas com água destilada e deixadas secar.

Posteriormente, as células fixadas foram coradas com 40 µL de Sulforodamina B (SRB) a 0,1%, preparada em ácido acético a 1%, durante 30 minutos. Em seguida, o excesso de corante foi removido por meio de lavagens com ácido acético a 1%, e as placas foram novamente secas. Para a solubilização do corante ligado às proteínas celulares, foram adicionados 200 µL de tampão Tris 10 mM (pH 10,5), mantendo-se as placas ao abrigo da luz por aproximadamente 30 minutos, em temperatura ambiente. Ao final desse período, a absorbância foi determinada em leitor de microplacas a 490 nm, e os resultados foram expressos como porcentagem de viabilidade celular em relação ao grupo controle (células não tratadas), conforme descrito por Skehan et al. (1990).

#### 4.4.3 Quantificação de óxido nítrico

A produção de óxido nítrico (NO) foi avaliada em culturas de macrófagos murinos RAW 264.7. As concentrações empregadas nesse ensaio (1,0; 0,5; 0,25 e 0,125%) foram estabelecidas a partir dos resultados obtidos no teste de citotoxicidade, sendo selecionadas concentrações inferiores ao menor valor de CC<sub>50</sub>

determinado, a fim de evitar que possíveis alterações na produção de NO fossem decorrentes da redução da viabilidade celular.

Após o cultivo e o plaqueamento das células, conforme descrito no item 4.4.1, o meio de cultura foi cuidadosamente removido e cada poço recebeu 100 µL das amostras correspondentes a F-EEBPM (formulação de extrato etanólico bruto de *P. spruceanum* e *M. leucadendron* e a FB-EEBPM (formulação branco de extrato etanólico de *P. spruceanum* e *M. leucadendron*), nas concentrações previamente definidas. Em seguida, foram adicionados 100 µL de uma solução de LPS (5 µg/mL) e IFN-γ (100 ng/mL), preparada em meio RPMI. As placas foram mantidas em incubação por 24, 48 e 72 horas. Ao final de cada período, os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -80 °C até a realização das análises.

A determinação da concentração de NO foi realizada pelo método de Griess, que permite a quantificação indireta dessa molécula por meio da detecção de seus metabólitos estáveis, nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) e nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) (GREEN et al., 1982). O reagente de Griess foi preparado pela mistura, na proporção de 1:1, de uma solução de sulfanilamida a 1% em ácido fosfórico a 2,5% com uma solução de naftilenodiamina a 0,1% preparada em água. Para a construção da curva padrão foi utilizada uma solução de nitrito de sódio ( $\text{NaNO}_2$ ; Sigma®), preparada em concentrações variando de 0,500 a 0,00024 nmol/mL por meio de diluições seriadas.

Para a reação, foram transferidos 50 µL das amostras e das soluções padrão para placas de 96 poços, aos quais foram adicionados 50 µL do reagente de Griess. Após incubação por 10 minutos, em temperatura ambiente e ao abrigo da luz, a leitura da absorbância foi realizada a 570 nm em espectrofotômetro. Todas as análises foram conduzidas em quadruplicata, e os valores de concentração de NO foram calculados utilizando a equação da reta gerada pela análise de regressão linear dos dados obtidos na curva padrão.

#### 4.4.4 Quantificação de citocinas

Após o cultivo celular e plaqueamento de macrófagos murinos RAW 264.7 realizados conforme descrito no item 4.4.1, o meio de cultura foi retirado e foram adicionados 100 µL das amostras EEBP + EEBM (extratos livres de *P. spruceanum* e *M. leucadendron*), F-EEBPM (formulação de extrato etanólico bruto de *P. spruceanum* e *M. leucadendron* e FB-EEBPM (formulação branco de extrato

etanólico de *P. spruceanum* e *M. leucadendron*) na concentração de 1%. Em seguida, foram adicionados 100 µL de solução de LPS (Sigma - Aldrich®) (5 µg/mL) com IFN-γ (BD Opteia®) (100 ng/mL) em RPMI e as placas foram incubadas por 24h, 48h e 72h. O sobrenadante foi coletado e armazenado a -80 °C para dosagem de citocinas.

A quantificação dos níveis de citocinas foi realizada pela técnica de Cytometric Bead Array (BD Biosciences) utilizando o Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine kit que permite a quantificação das proteínas interleucina 2 (IL-2), interleucina 4 (IL4), interleucina 6 (IL-6), interleucina 10 (IL-10), Fator de Necrose Tumoral (TNF), Interferongama (IFN-γ) e interleucina 17A (IL-17A). Esse kit fornece sete populações de microesferas com intensidades de fluorescência distintas, revestidas com anticorpos de captura específicos para cada citocina. Os experimentos foram realizados de acordo com as recomendações do fabricante. Células não tratadas e estimuladas foram usadas como controle negativo.

Inicialmente, foram preparados os padrões de citocinas por meio de diluições seriadas, conforme as instruções do fabricante, para obtenção da curva padrão. Em seguida, as microesferas de captura (beads) foram homogeneizadas. Posteriormente, foram adicionados, em cada poço da placa, 21 µL da mistura de microesferas, 25 µL do sobrenadante de cada amostra e 17 µL do reagente de detecção conjugado à ficoeritrina (PE). A placa foi protegida da luz e incubada por 3 horas, à temperatura ambiente, sob agitação contínua em vórtex. Após a incubação, foi adicionado 160 µL de tampão de lavagem (Wash Buffer), seguido de centrifugação a 2000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente e o pellet foi ressuspensionado em 200 µL de tampão de lavagem. As amostras foram analisadas em citômetro de fluxo, e os dados obtidos foram processados por meio do software FCAP Array V3. As concentrações das citocinas foram determinadas pela intensidade da fluorescência emitida, em comparação com a curva padrão.

#### 4.5 Análise estatística

Os testes estatísticos foram realizados com o apoio instrumental do software GraphPad Prism 5 (Prism Software, Irvine, CA, USA), sendo as diferenças consideradas significativas quando os valores de p foram inferiores a 0,05 ( $p < 0,05$ ).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Caracterização da formulação

A avaliação macroscópica das formulações permitiu verificar suas características organolépticas quanto à cor, aparência e odor. A formulação branco (FB-EEBPM) apresentou coloração transparente, enquanto a formulação contendo os extratos (F-EEBPM) apresentou coloração verde-escura. Ambas as formulações apresentaram aspecto homogêneo, consistência de gel, ausência de separação de fases e de partículas visíveis. Em relação ao odor, não foi observada a presença de odor característico marcante em nenhuma das formulações.

Os valores de pH das formulações FB-EEBPM e F-EEBPM estão apresentados na **Tabela 1**.

**Tabela 1.** Valores de pH das formulações FB-EEBPM e F-EEBPM expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

| Formulação | pH              |
|------------|-----------------|
| FB-EEBPM   | 7,23 $\pm$ 0,15 |
| F-EEBPM    | 5,83 $\pm$ 0,06 |

A caracterização físico-química das formulações foi complementada pela determinação do DHMP, do PDI e do potencial zeta. Os resultados obtidos para esses parâmetros encontram-se apresentados na **Tabela 2**.

**Tabela 2:** DHMP, PDI e potencial zeta da formulação branco e da formulação contendo os extratos de *M. leucadendron* e *P. spruceanum*.

|          | DHMP(nm)          | PDI              | Potencial zeta (mV) |
|----------|-------------------|------------------|---------------------|
| F-EEBPM  | 245,9 $\pm$ 44,97 | 0,476 $\pm$ 0,13 | -11,5 $\pm$ 0,32    |
| FB-EEBPM | 503,7 $\pm$ 20,2  | 0,550 $\pm$ 0,02 | -8,68 $\pm$ 0,58    |

## 5.2 Citotoxicidade em células RAW

Os valores de concentração citotóxica para 50% das células ( $CC_{50}$ ) obtidos para os extratos livres (EEBP+EEBM), formulação (F-EEBPM) e formulação branco (FB-EEBPM) encontram-se apresentados na **Tabela 3**.

**Tabela 3:** Estimativas de  $CC_{50}$  dos extratos livres (EEBP + EEBM), formulação contendo extratos (F-EEBPM) e formulação branco (FB-EEBPM) obtidas a partir do ajuste não linear.

| Tempo de análise | (EEBP +EEBM)<br>(%) | F-EEBPM<br>(%) | FB-EEBPM<br>(%) |
|------------------|---------------------|----------------|-----------------|
| 24h              | 122,3*,#            | 91,07*,#       | 249,4*,#        |
| 48h              | 1,823               | 1,185          | 17,47           |
| 72h              | 1,150               | 1,356          | 2,704           |

$CC_{50}$ : concentração citotóxica para 50% das células. \*Diferença significativa em relação aos tempos de análise 48h e 72h, dentro do mesmo grupo experimental; # Diferença significativa em relação aos demais grupos experimentais no tempo de análise 24h.

Ao analisar os resultados, observa-se que a menor citotoxicidade ocorreu em 24 horas de exposição para todos os tratamentos, uma vez que os valores de  $CC_{50}$  foram significativamente maiores quando comparados aos obtidos em 48 e 72 horas.

Na análise realizada após 24 horas de exposição, o EEBP+EEBM apresentou  $CC_{50}$  de 122,3%, valor significativamente maior que o observado para a F-EEBPM, cujo  $CC_{50}$  foi de 91,07%. A FB-EEBPM apresentou  $CC_{50}$  de 249,4%, sendo significativamente superior aos valores obtidos para o EEBP+EEBM e para a F-EEBPM.

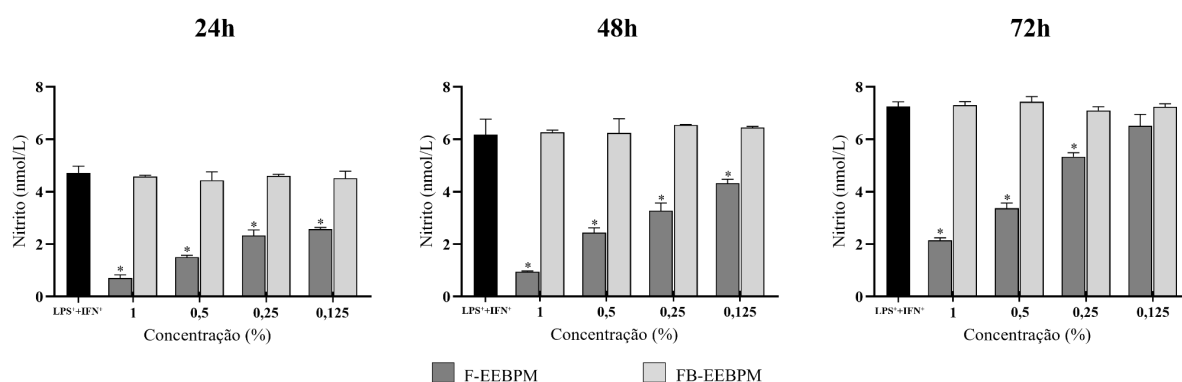
Após 48 horas de exposição, os valores de  $CC_{50}$  foram de 1,823% para o EEBP+EEBM, 1,185% para a F-EEBPM e 17,47% para a FB-EEBPM. Em 72 horas, os valores encontrados foram de 1,150%, 1,356% e 2,704%, respectivamente. Além disso, não foram observadas diferenças significativas entre os valores de  $CC_{50}$  obtidos em 48 e 72 horas para nenhum dos grupos experimentais.

### 5.3 Quantificação de óxido nítrico

Para esta avaliação foram utilizadas as concentrações de 1,0; 0,5; 0,25 e 0,125%, definidas com base no ensaio de citotoxicidade, considerando que a menor concentração citotóxica ( $CC_{50}$ ) obtida foi de 1,150%. Dessa forma, foram selecionadas concentrações inferiores a esse valor para a realização dos experimentos.

A quantificação indireta da produção de óxido nítrico (NO) em sobrenadantes de macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS e IFN- $\gamma$  e tratados com a F-EEBPM ou com a FB-EEBPM, nos tempos de 24, 48 e 72 horas, foi expressa como porcentagem média de inibição da produção de NO em relação ao grupo controle (**Figura 4**).

**Figura 4:** Quantificação indireta da produção de óxido nítrico em macrófagos RAW 264.7 tratados com F-EEBPM ou com FB-EEBPM.



Os resultados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão. \*p < 0,05 em relação ao grupo controle (células estimuladas com LPS + IFN- $\gamma$  e não tratadas).

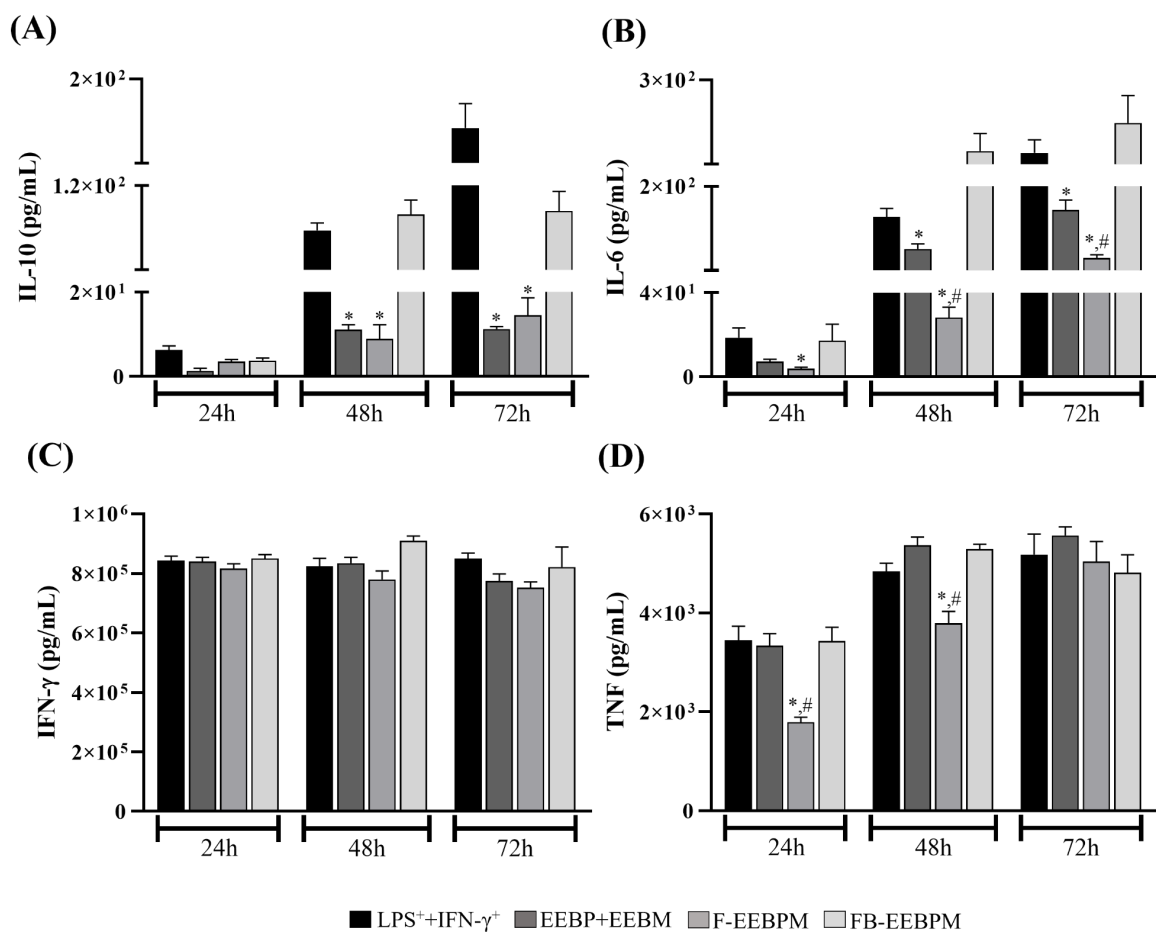
Conforme apresentado na **Figura 4**, o tratamento com a F-EEBPM promoveu redução significativa da produção de óxido nítrico (NO) em todas as concentrações avaliadas nos tempos de 24 e 48 horas e na maior parte das concentrações após 72 horas, quando comparado ao grupo controle. Observou-se ainda um efeito dependente da concentração, de modo que concentrações mais elevadas da formulação promoveram maior redução da produção de NO, sendo o tratamento na concentração de 1% o que apresentou o efeito mais pronunciado. Entretanto, após 72 horas de incubação, a menor concentração avaliada (0,125%) não reduziu

significativamente a produção de NO em relação ao grupo controle. Por outro lado, a formulação branco não promoveu redução significativa da produção de NO em relação ao grupo controle em nenhum dos tempos experimentais.

#### 5.4 Quantificação de citocinas

A quantificação das citocinas IL-2, IL-4 e IL-17 no sobrenadante não resultou em quantidades detectáveis. O resultado da quantificação de IL-10, IL-6, IFN- $\gamma$  e TNF em sobrenadante de macrófagos RAW estimulados com LPS+IFN- $\gamma$  estão apresentados na **figura 5**.

**Figura 5:** Quantificação de (A)IL-10, (B)IL-6, (C)IFN- $\gamma$  e (D)TNF em sobrenadante de cultura de macrófagos RAW estimulados com LPS+IFN- $\gamma$  e tratados com EEBP+EEBM, F-EEBPM e FB-EEBPM.



\*indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle, macrófagos estimulados e não tratados (LPS+IFN- $\gamma^+$ ).#indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo tratado com EEBP+EEBM. Os valores foram expressos como média  $\pm$  erro.

A produção da citocina IL-10 pelos macrófagos do grupo controle apresentou aumento progressivo ao longo dos tempos de avaliação (**Figura 5(A)**). No tempo de 24h, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos experimentais. Em contraste, nos tempos de 48 e 72h, tanto o tratamento com EEBP+EEBM quanto com a F-EEBPM promoveram redução significativa na produção de IL-10 em relação ao grupo controle. Entretanto, não foram observadas diferenças significativas entre a F-EEBPM e o EEBP+EEBM nesses períodos. Por outro lado, o tratamento com a formulação branco (FB-EEBPM) não promoveu alterações significativas nos níveis de IL-10 em relação ao grupo controle em nenhum dos tempos avaliados.

A produção da citocina IL-6 pelos macrófagos do grupo controle apresentou aumento ao longo dos tempos de avaliação (**Figura 5(B)**). No tempo de 24h, apenas o tratamento com a F-EEBPM promoveu redução significativa da produção de IL-6 em relação ao grupo controle. Os tratamentos com EEBP+EEBM e FB-EEBPM não apresentaram diferenças significativas nesse mesmo período. Em 48h, os tratamentos com EEBP+EEBM e com a F-EEBPM promoveram redução significativa na produção de IL-6 em relação ao grupo controle. Além disso, nesse período, a F-EEBPM apresentou redução significativamente maior na produção dessa citocina quando comparada ao EEBP+EEBM. No tempo de 72h, ambos os tratamentos mantiveram a redução significativa da produção de IL-6 em relação ao grupo controle. Além disso, a F-EEBPM apresentou redução significativamente maior na produção dessa citocina quando comparada ao EEBP+EEBM. Em contrapartida, o tratamento com a FB-EEBPM não promoveu alterações significativas na produção de IL-6 em nenhum dos tempos avaliados.

A produção de IFN- $\gamma$  pelos macrófagos do grupo controle manteve-se praticamente constante ao longo dos tempos de avaliação (**Figura 5(C)**). Da mesma forma, os tratamentos com EEBP+EEBM, com a F-EEBPM e com a FB-EEBPM não promoveram alterações significativas na produção dessa citocina em nenhum dos tempos analisados.

A produção de TNF pelos macrófagos do grupo controle apresentou aumento entre 24 e 48 horas, mantendo-se elevada em 72 horas (**Figura 5(D)**). No tempo de 24h, apenas o tratamento com a F-EEBPM promoveu redução significativa da produção de TNF em relação ao grupo controle. Além disso, a F-EEBPM apresentou níveis significativamente menores dessa citocina quando comparada ao EEBP+EEBM. Em 48h, esse efeito foi mantido, com a F-EEBPM promovendo

redução significativa da produção de TNF em relação ao grupo controle e diferença significativa em comparação ao EEBP+EEBM. Após 72h de tratamento, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos experimentais. O tratamento com EEBP+EEBM e com a FB-EEBPM não promoveu alterações significativas nos níveis de TNF quando comparados ao grupo controle em nenhum dos tempos avaliados.

## 6 DISCUSSÃO

A coloração verde-escura observada na formulação contendo os extratos (F-EEBPM) está associada à presença de compostos bioativos naturais presentes no extrato vegetal incorporado. Em contrapartida, a formulação branco (FB-EEBPM) manteve aspecto transparente, uma vez que não contém os extratos em sua composição. A homogeneidade observada em ambas as formulações, evidenciada pela ausência de separação de fases e de partículas visíveis, sugere boa compatibilidade entre os excipientes e o sistema desenvolvido. Quanto ao odor, a ausência de características olfativas marcantes é um aspecto desejável em formulações tópicas, uma vez que contribui para maior aceitabilidade pelo usuário.

O pH da F-EEBPM foi de 5,83, valor que se encontra dentro da faixa dermatologicamente aceitável para formulações de aplicação tópica (4,5–8,0), sugerindo boa compatibilidade cutânea e baixo potencial de irritação, conforme descrito por Rosca et al. (2025). Além disso, esse valor é muito próximo ao pH fisiológico da pele íntegra, que varia entre 4,1 e 5,8, condição considerada essencial para a manutenção da integridade da barreira cutânea e para a prevenção da proliferação microbiana (DERWIN et al., 2022). De acordo com esses autores, a elevação do pH no leito da ferida está associada ao comprometimento da barreira protetora da pele, maior suscetibilidade a infecções, prolongamento da resposta inflamatória e atraso no processo de cicatrização. Dessa forma, o pH obtido para a formulação indica sua adequação para aplicação tópica, além de contribuir para um ambiente favorável ao reparo tecidual. Em contrapartida, a FB-EEBPM apresentou pH de 7,23, embora ainda dentro da faixa considerada aceitável para formulações tópicas, esse valor encontra-se acima do pH fisiológico da pele íntegra. Sabe-se que um ambiente mais alcalino prejudica o processo cicatricial. Desse modo, a incorporação do extrato vegetal parece ter contribuído para o ajuste do pH da

formulação para valores mais próximos das condições fisiológicas da pele, o que representa uma característica favorável para sua aplicação tópica.

Em relação à caracterização, a F-EEBPM apresentou DHMP de  $245,9 \pm 44,97$  nm, permanecendo dentro da faixa descrita para hidrogéis poliméricos nanoestruturados (nanogéis) destinados à aplicação tópica. Embora a definição clássica da IUPAC considere formulações nanoestruturadas como partículas com diâmetro inferior a 100 nm, Ferozekhan, Umashankar e Narayanasamy (2024) e Siafaka *et al.* (2023) destacam que, no contexto farmacêutico, sistemas com tamanho de partícula variando de 1 a 1000 nm também são amplamente aceitos como nanogéis, desde que apresentem uma rede polimérica tridimensional e mantenham suas características estruturais e funcionais. Dessa forma, o tamanho de partícula obtido neste estudo corrobora a classificação da formulação como um hidrogel polimérico nanoestruturado para aplicação cutânea. Além disso, a redução do DHMP observada após a incorporação do extrato vegetal sugere que sua presença não comprometeu a organização nanoestruturada do sistema, podendo, inclusive, ter favorecido uma organização mais compacta da rede polimérica.

Os valores de DHMP observados podem ser explicados pelo comportamento dinâmico característico dos sistemas à base de poloxamer. Esses copolímeros anfifílicos são constituídos por blocos hidrofílicos de poli(óxido de etileno) (PEO) e blocos hidrofóbicos de poli(óxido de propileno) (PPO), apresentando capacidade de auto-organização dependente da temperatura. Com o aumento da temperatura, ocorre a desolvatação dos segmentos de PPO, reduzindo sua hidratação pelo meio aquoso e favorecendo a associação entre as regiões hidrofóbicas. Esse processo leva à formação de micelas poliméricas que, por sua vez, interagem entre si, formando uma rede tridimensional altamente hidratada. Dessa forma, o diâmetro hidrodinâmico determinado por espalhamento dinâmico de luz corresponde às estruturas micelares hidratadas e aos seus agregados organizados, justificando a obtenção de valores de DHMP na faixa observada neste estudo (BONACUCINA *et al.*, 2007; WHITE; CALABRESE, 2022).

O potencial zeta é um parâmetro amplamente utilizado para avaliar a estabilidade de sistemas coloidais, pois representa a carga elétrica superficial das partículas dispersas. Em geral, valores absolutos superiores a  $\pm 30$  mV são considerados indicativos de elevada estabilidade eletrostática, uma vez que

promovem maior repulsão entre as partículas e reduzem a tendência à agregação (MANAIA, et al., 2017).

Embora os valores de potencial zeta obtidos sejam inferiores ao limite clássico de  $\pm 30$  mV, isso não implica, necessariamente, baixa estabilidade da formulação. Em sistemas poliméricos, como hidrogéis nanoestruturados à base de poloxamer, a estabilidade não depende exclusivamente da repulsão eletrostática, mas também da estabilização estérica promovida pelas cadeias poliméricas hidratadas. Esse mecanismo forma uma barreira física ao redor das partículas, reduzindo sua aproximação e, conseqüentemente, a agregação, permitindo que formulações apresentem adequada estabilidade física mesmo com baixos valores de potencial zeta (BODRATTI; ALEXANDRIDIS, 2018; FACHINETTI et al., 2018).

A proximidade entre os valores de potencial zeta da FB-EEBPM e da F-EEBPM, indica que a matriz polimérica exerce importante influência sobre as características superficiais do sistema. Entretanto, o valor mais negativo observado na F-EEBPM pode estar relacionado à presença de compostos presentes em *M. leucadendron* e *P. spruceanum*, como compostos fenólicos, que podem interagir com a superfície das partículas e modificar sua carga superficial.

Assim, embora os valores obtidos estejam abaixo do limite geralmente associado à estabilidade eletrostática, a estabilidade da nanoformulação pode ser favorecida pela ação conjunta do poloxamer, por meio da estabilização estérica, e pelas interações dos constituintes dos extratos com a matriz polimérica.

O PDI é um parâmetro utilizado para avaliar a homogeneidade da distribuição do tamanho das partículas em uma dispersão. Esse índice varia de 0 a 1, sendo que valores próximos de 0 indicam sistemas monodispersos, caracterizados por uma distribuição uniforme do tamanho das partículas, enquanto valores próximos de 1 refletem sistemas altamente polidispersos, com múltiplas populações de partículas de diferentes dimensões. De modo geral, valores de  $PDI \leq 0,3$  são considerados indicativos de uma distribuição de tamanho homogênea, enquanto valores de até 0,5 também são amplamente aceitos (DANAEI et al., 2018; RODRIGUES et al., 2022).

No presente estudo, a FB-EEBPM apresentou PDI de  $0,550 \pm 0,02$ , enquanto a F-EEBPM apresentou PDI de  $0,476 \pm 0,13$ . Embora o valor obtido para a FB-EEBPM tenha sido discretamente superior a 0,5, ambos os resultados são compatíveis com a faixa geralmente aceita para sistemas nanoestruturados poliméricos. Além disso, a redução do PDI observada na F-EEBPM sugere que a

incorporação dos extratos vegetais pode ter contribuído para uma distribuição de tamanho de partículas mais homogênea, possivelmente em decorrência de interações entre os compostos bioativos e a matriz polimérica, favorecendo uma organização mais uniforme do sistema.

Em relação à citotoxicidade, para o estudo foi utilizada a linhagem celular RAW 264.7, derivada de macrófagos murinos. Essa linhagem foi escolhida pois desempenha um papel importante nos mecanismos associados ao sistema imunológico, dentre eles a secreção de NO, molécula abordada no item posterior (KETHA et al., 2018; JEONG et al., 2024).

Foi utilizado o ensaio de SRB pois o mesmo é amplamente utilizado para avaliar citotoxicidade e proliferação celular *in vitro*, baseado na quantificação de proteínas celulares totais como parâmetro de viabilidade, onde, o corante SRB se liga eletricamente à porção básica dos resíduos de aminoácidos das proteínas fixadas. Através deste ensaio, é possível comparar diferentes tratamentos e estabelecer níveis de citotoxicidade (GAVANJI et al., 2023).

Até o momento não existem estudos na literatura que abordem sobre a existência de hidrogel polimérico composto pelos extratos etanólico bruto de *P. spruceanum* e *M. leucadendron*. Por ser uma formulação inédita, o primeiro teste biológico realizado foi o de citotoxicidade com o objetivo de conhecer a  $CC_{50}$ , ou seja, a concentração da formulação que reduz a viabilidade celular em 50%. Esta determinação é importante para se conhecer, dentre outros fatores, a aplicabilidade prévia da formulação, até que ponto a mesma é tóxica para as células em teste.

Os maiores valores de  $CC_{50}$  observados em 24 horas indicam que esse foi o período de menor citotoxicidade para todos os tratamentos. Neste contexto, é importante ressaltar que 24h é o menor tempo de exposição testado, nos demais tempos, 48 e 72 h, as amostras permanecem no meio. Sendo assim, é provável que o maior tempo de exposição tenha favorecido o acúmulo de danos celulares, resultando em aumento da citotoxicidade.

Neste estudo, não foram realizados testes para verificar os possíveis mecanismos de toxicidade das amostras testadas. Entretanto, na literatura é possível verificar que muitas substâncias não causam morte celular imediata, mas iniciam processos de dano mitocondrial, bloqueio do ciclo celular ou ativação de apoptose com o tempo. À medida que a exposição aos compostos passa por mais ciclos celulares, há maior probabilidade de que os danos acumulados interfiram em

pontos de checagem do ciclo, aumentando apoptose ou necrose (LARSSON et al., 2020; ABEDI et al., 2024).

Por outro lado, a ausência de diferença significativa entre os valores de  $CC_{50}$  obtidos em 48 e 72 horas sugere que, a partir de 48 horas, as amostras atingiram um platô de toxicidade, sugerindo que prolongar a exposição não aumenta o dano de forma significativa além desse ponto. Uma hipótese é que em 48h a maioria das células suscetíveis já são eliminadas, restando apenas uma fração de células mais resistentes ou adaptadas ao tratamento, de modo que a exposição por 72h não leva ao aumento da morte celular (MARTELLI et al., 2009; BLOIS et al., 2011).

Além do hidrogel contendo os extratos, foi avaliada a citotoxicidade dos extratos livres nas mesmas concentrações presentes na formulação. Apenas na análise realizada em 24h de exposição, foi observado que o  $CC_{50}$  da F-EEBPM foi significativamente menor que o observado para o EEBP+EEBM, indicando maior citotoxicidade da formulação nesse período. Esse resultado sugere que a incorporação dos extratos ao sistema nanoestruturado pode ter contribuído para a diminuição da viabilidade celular, possivelmente em decorrência do aumento da disponibilidade dos compostos bioativos no meio. Sistemas nanoestruturados, como a formulação em estudo permitem a melhoria da solubilidade dos ativos, tornando-os mais disponíveis no meio o que pode ter contribuído para este aumento de toxicidade observado em 24h (LIU et al., 2024; ZHUO et al., 2024).

A FB-EEBPM, constituída por todos os ingredientes que compõem a formulação, com exceção dos extratos, apresentou baixa citotoxicidade inicial, indicando que a base da formulação, isoladamente, exerceu reduzido efeito sobre a viabilidade celular após 24 horas de exposição. No entanto, a diminuição dos valores de  $CC_{50}$  nos tempos de exposição subsequentes sugere que os componentes da formulação não são inertes, ou seja, também podem contribuir para a redução da viabilidade celular quando mantidos em contato com as células por períodos mais prolongados. Apesar disso, a ausência de diferenças significativas entre a F-EEBPM e o EEBP+EEBM após 48 e 72 horas indica que a incorporação dos extratos ao hidrogel não alterou a atividade citotóxica observada para os extratos livres nesses tempos de exposição.

O óxido nítrico (NO) é um importante mediador da resposta inflamatória produzido principalmente por macrófagos ativados. No presente estudo, as células RAW 264.7 foram estimuladas com LPS e IFN- $\gamma$ , combinação amplamente utilizada

para induzir um fenótipo pró-inflamatório. Essa estimulação promove a ativação das vias de sinalização NF- $\kappa$ B e MAPK, culminando na expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e no aumento da produção de NO, além da secreção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$  (KETHA et al., 2018; JEONG et al., 2024).

O NO desempenha um papel essencial na cicatrização de feridas, participando da regulação da homeostase vascular, da resposta inflamatória e da defesa antimicrobiana. Após a lesão tecidual, esse mediador contribui para a manutenção da homeostase vascular ao inibir a adesão plaquetária ao endotélio. Entretanto, sua inativação por espécies reativas de oxigênio liberadas pela vasculatura danificada favorece a agregação plaquetária e a formação do coágulo, etapa fundamental para conter o sangramento inicial. Na fase inflamatória, atua como um importante modulador da resposta imune, regulando a produção de citocinas inflamatórias, a migração e a adesão de neutrófilos ao endotélio, o recrutamento de leucócitos e a atividade de metaloproteinases de matriz (MMPs), processos indispensáveis para o controle da inflamação e o início do reparo tecidual. Além disso, o NO apresenta importante atividade antimicrobiana, promovendo a eliminação de microrganismos por meio da formação de espécies reativas de nitrogênio, capazes de promover danos ao DNA e às membranas de microrganismos, o que reduz a carga bacteriana e favorece o reparo tecidual (MALONE-POVOLNY; MALONEY; SCHOENFISCH, 2019).

Entretanto, embora desempenhe funções fisiológicas essenciais, sua produção exacerbada durante processos inflamatórios pode tornar-se prejudicial. Em concentrações elevadas, esse mediador reage rapidamente com espécies reativas de oxigênio, especialmente o ânion superóxido, formando peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), uma espécie altamente reativa capaz de promover oxidação e nitração de proteínas, lipídios e DNA. Como consequência, ocorre intensificação do estresse nitrosativo, perpetuação da resposta inflamatória e comprometimento do reparo tecidual (SONEJA; DREWS; MALINSKI, 2005; PÉREZ DE LA LASTRA et al., 2022; MAN et al., 2022; LUNDBERG; WEITZBERG, 2022).

Diante desse contexto, a identificação de substâncias capazes de modular a produção de NO representa uma estratégia promissora para o controle da resposta inflamatória. Embora os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) sejam amplamente utilizados no tratamento de processos inflamatórios, seu principal

mecanismo de ação consiste na inibição das enzimas ciclooxigenases (COX) e da síntese de prostaglandinas, não atuando diretamente sobre a produção de NO (BRUNTON; KNOLLMANN, 2024). Por outro lado, os corticosteroides podem reduzir a expressão da óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e, conseqüentemente, a produção de NO. Entretanto, seu uso prolongado está associado a importantes efeitos adversos sistêmicos (MATSUMURA et al., 2001; RICE et al., 2017). Nesse cenário, produtos naturais capazes de modular esse mediador inflamatório surgem como alternativas promissoras para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas.

No presente estudo, a F-EEBPM promoveu redução significativa da produção NO na maior parte das concentrações avaliadas, ao longo dos três tempos experimentais, quando comparada ao grupo controle. Em contrapartida, a formulação branco não promoveu redução significativa da produção desse mediador em nenhum dos tempos avaliados. Esses resultados indicam que a atividade observada está relacionada aos compostos bioativos presentes nos extratos vegetais, e não aos componentes da base da formulação, reforçando o potencial anti-inflamatório da formulação desenvolvida.

Além disso, a inibição da produção de NO apresentou comportamento dose-dependente, evidenciado pela maior redução desse mediador inflamatório com o aumento da concentração da F-EEBPM. Esse resultado sugere que a quantidade de compostos bioativos presentes exerce influência direta sobre a capacidade da formulação em modular a resposta inflamatória. Embora a menor concentração avaliada (0,125%) tenha promovido redução significativa da produção de NO nos tempos de 24 e 48 horas, esse efeito não foi observado após 72 horas de incubação, indicando que, nesse período, a quantidade de compostos bioativos disponível pode não ter sido suficiente para manter a modulação da produção desse mediador. De modo geral, os achados obtidos reforçam o potencial da formulação desenvolvida como agente modulador da inflamação e a relevância da continuidade dos estudos com a mesma. Entre as concentrações testadas, a de 1% foi selecionada para o ensaio de quantificação de citocinas por apresentar a maior capacidade de redução da produção de NO, representando a concentração com melhor desempenho na modulação desse mediador.

Em relação à quantificação de citocinas, a ausência de níveis detectáveis de IL-2, IL-4 e IL-17 no sobrenadante pode ser atribuída às características do modelo

experimental utilizado, uma vez que essas citocinas não integram o perfil secretório clássico de macrófagos ativados, os quais produzem predominantemente mediadores como TNF, IL-1, IL-6, IL-10 e IL-12 (LI et al., 2018; CIOCE et al., 2024). Dessa forma, a ausência de níveis detectáveis dessas citocinas está de acordo com o perfil de citocinas esperado para macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS e IFN- $\gamma$ .

A produção de IL-6 apresentou aumento progressivo no grupo controle ao longo dos tempos avaliados, indicando uma resposta pró-inflamatória persistente dos macrófagos frente ao estímulo utilizado. A IL-6 é uma citocina multifuncional envolvida tanto na ativação da resposta inflamatória inicial quanto na regulação de eventos associados ao reparo tecidual, como angiogênese, reepitelização e formação de tecido de granulação (MAHMOUD et al., 2024). Entretanto, a produção excessiva e prolongada dessa citocina pode contribuir para a manutenção de um microambiente inflamatório, prejudicando a transição adequada para as fases posteriores da cicatrização (JOHNSON et al., 2020).

Nesse contexto, o tratamento com a F-EEBPM promoveu redução significativa da produção de IL-6 nos tempos de 24, 48 e 72 horas em comparação ao grupo controle, enquanto a FB-EEBPM não apresentou efeito significativo. Esse resultado sugere que os compostos bioativos presentes nos extratos vegetais foram responsáveis pela modulação da resposta inflamatória observada, uma vez que a ausência de alterações promovidas pela formulação sem extratos indica que o sistema de liberação isoladamente não foi suficiente para interferir na produção dessa citocina.

Embora a F-EEBPM tenha promovido redução significativa da produção de IL-6 em relação ao grupo controle no tempo de 24 horas, não foi observada diferença significativa quando comparada ao EEBP+EEBM nesse período. Esse achado sugere que os extratos livres já foram suficientes para modular a produção de IL-6 nas primeiras horas de exposição. Entretanto, nos tempos de 48 e 72 horas, a F-EEBPM apresentou redução significativamente maior dos níveis dessa citocina, indicando que a nanoestruturação pode ter potencializado e prolongado a atividade anti-inflamatória dos extratos, possivelmente pela maior estabilidade dos compostos bioativos e manutenção de sua disponibilidade ao longo do tempo.

A modulação da produção de IL-6 promovida pela F-EEBPM pode estar associada à capacidade dos compostos presentes nos extratos vegetais de regular a

ativação dos macrófagos, reduzindo a produção exacerbada de mediadores inflamatórios. Embora a IL-6 desempenhe funções essenciais durante as etapas iniciais da cicatrização, sua expressão elevada e mantida por períodos prolongados pode favorecer a persistência da resposta inflamatória e interferir na transição adequada para as fases proliferativa e de remodelamento tecidual. Dessa forma, a diminuição observada nos grupos tratados não indica necessariamente prejuízo aos processos reparativos mediados por essa citocina, mas pode representar um mecanismo de controle da resposta inflamatória, evitando a manutenção de um microambiente inflamatório excessivo.

Esse efeito torna-se ainda mais relevante quando analisado em conjunto com a redução da produção de TNF observada após o tratamento com a F-EEBPM. O TNF- $\alpha$  é uma das principais citocinas envolvidas na fase inflamatória inicial da cicatrização, sendo produzido por uma variedade de células, incluindo macrófagos ativados. Essa citocina participa do recrutamento e ativação de células inflamatórias, estimula a produção de outros mediadores inflamatórios, como a IL-6, e contribui para eventos essenciais ao reparo, incluindo ativação celular, angiogênese e promoção da proliferação e migração de queratinócitos e fibroblastos, que são vitais para a reepitelização e formação de tecido de granulação (MAHMOUD et al., 2024).

No entanto, os efeitos benéficos do TNF- $\alpha$  durante a fase inicial da cicatrização podem ser comprometidos quando sua expressão ocorre de forma excessiva ou prolongada. Níveis elevados dessa citocina podem favorecer a manutenção de um estado inflamatório persistente, prejudicando o equilíbrio entre as respostas pró-inflamatórias e reparativas. Esse desequilíbrio pode resultar em atraso no fechamento da ferida, comprometimento da regeneração tecidual e alterações na deposição de componentes da matriz extracelular, incluindo o colágeno, essencial para a organização e remodelamento do tecido em reparação (MAHMOUD et al., 2024).

Nesse contexto, a redução da produção de TNF- $\alpha$  promovida pela F-EEBPM nos tempos de 24 e 48 horas pode representar um mecanismo favorável de modulação da resposta inflamatória, evitando a manutenção excessiva desse mediador sem comprometer a ativação inicial necessária ao reparo. Diferentemente do observado para a IL-6, a F-EEBPM promoveu redução significativamente maior da produção de TNF- $\alpha$  em comparação com o EEBP+ EEBM já nas primeiras 24 horas de tratamento. Esse resultado pode estar relacionado ao fato de o TNF- $\alpha$

constituir uma das primeiras citocinas produzidas após a ativação dos macrófagos, atuando como mediador central da resposta inflamatória inicial e estimulando a produção de outros mediadores pró-inflamatórios, incluindo a IL-6. Assim, a maior eficiência da formulação em modular precocemente a produção de TNF- $\alpha$  sugere que a nanoestruturação pode ter favorecido a ação dos compostos bioativos sobre esse mediador, uma vez que o TNF- $\alpha$  está entre as primeiras citocinas produzidas após a ativação dos macrófagos.

De acordo com Mahmoud et al. (2024), a persistência de níveis elevados de TNF- $\alpha$  está associada ao desenvolvimento de feridas de difícil cicatrização, como as úlceras diabéticas, nas quais a inflamação prolongada compromete a progressão ordenada das fases do reparo tecidual. Dessa forma, a capacidade da F-EEBPM em reduzir a produção de TNF- $\alpha$ , juntamente com a diminuição observada para IL-6, sugere que a formulação pode favorecer um ambiente inflamatório mais equilibrado, contribuindo para a resolução da inflamação e posterior remodelamento tecidual.

A IL-10 é uma citocina imunorreguladora essencial para o controle da resposta inflamatória durante a cicatrização. Essa citocina atua inibindo a produção de mediadores pró-inflamatórios, como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, contribuindo para a resolução da inflamação e favorecendo a transição para as fases proliferativa e de remodelamento tecidual. Além disso, a IL-10 estimula a migração e a proliferação de queratinócitos, favorecendo a reepitelização da ferida, e contribui para a organização da matriz extracelular, desempenhando papel importante na reparação tecidual (SUN et al., 2020; MAHMOUD et al., 2024).

A redução da produção de IL-10 após o tratamento com a F-EEBPM deve ser interpretada em conjunto com os demais mediadores inflamatórios avaliados. A IL-10 é uma importante citocina reguladora da resposta imune, atuando na limitação da produção de citocinas pró-inflamatórias e favorecendo a resolução da inflamação. De acordo com Saraiva e O'Garra (2010), sua produção é frequentemente induzida concomitantemente à produção de citocinas pró-inflamatórias, desempenhando papel central no controle da intensidade da resposta inflamatória e na prevenção de danos teciduais decorrentes de uma inflamação exacerbada.

Desta forma, a diminuição dos níveis de IL-10 observada nos grupos tratados, associada à redução concomitante de IL-6 e TNF- $\alpha$ , sugere que o tratamento com a F-EEBPM promoveu uma modulação da resposta inflamatória dos macrófagos. Assim, a menor produção de IL-10 pode refletir uma menor necessidade de ativação

dos mecanismos regulatórios da inflamação, e não necessariamente um comprometimento da resposta anti-inflamatória. Além disso, a ausência de efeito da formulação branco reforça que essa modulação está relacionada aos compostos bioativos presentes nos extratos vegetais.

A ausência de diferenças significativas na produção de IFN- $\gamma$  entre os grupos pode estar relacionada ao próprio modelo experimental, uma vez que essa citocina foi utilizada como estímulo para ativação dos macrófagos. Além disso, macrófagos não constituem uma fonte importante de IFN- $\gamma$ , sendo essa citocina produzida predominantemente por células NK e linfócitos T, conforme descrito por Alspach, Lussier e Schreiber (2019). Dessa forma, em modelos de ativação utilizando LPS e IFN- $\gamma$ , espera-se principalmente a modulação de mediadores produzidos pelos próprios macrófagos, como TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10, enquanto alterações na produção de IFN- $\gamma$  tendem a ser discretas ou ausentes.

## 7 CONCLUSÃO

O presente estudo permitiu produzir e caracterizar uma formulação nanoestruturada contendo os extratos de *M. leucadendron* e *P. spruceanum*, bem como avaliar seu potencial anti-inflamatório *in vitro* por meio de ensaios de quantificação de óxido nítrico e modulação da resposta inflamatória. A formulação apresentou características físico-químicas compatíveis com sistemas destinados à administração tópica, incluindo pH adequado e partículas em escala nanométrica, além de apresentar perfil de citotoxicidade que permitiu sua avaliação biológica.

Os ensaios biológicos demonstraram que a formulação foi capaz de modular a resposta inflamatória em macrófagos RAW 264.7 estimulados, reduzindo a produção de óxido nítrico e modulando mediadores inflamatórios envolvidos no processo de cicatrização. Além disso, a ausência de efeito da formulação branco reforça que a atividade observada está relacionada aos extratos vegetais incorporados ao sistema nanoestruturado.

Dessa forma, a associação entre *M. leucadendron* e *P. spruceanum* em um sistema nanoestruturado representa uma estratégia promissora para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas voltadas ao tratamento de feridas. Entretanto, considerando que os resultados foram obtidos em modelo *in vitro*, estudos adicionais, incluindo modelos *in vivo* e investigações dos mecanismos

moleculares envolvidos, são necessários para confirmar o potencial terapêutico, a segurança e a aplicabilidade clínica da formulação no tratamento de feridas.

## 8 REFERÊNCIAS

ABEDI, Adel et al. Cytotoxic activity and apoptosis induction by supernatant of *Lentilactobacillus buchneri* on HT-29 colon cancer cells. *Iranian Journal of Microbiology*, v. 16, n. 2, p. 219, 2024.

ALSPACH, E.; LUSSIER, D. M.; SCHREIBER, R. D. Interferon gamma and its important roles in promoting and inhibiting spontaneous and therapeutic cancer immunity. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, v. 11, n. 3, e028480, 2019. DOI: 10.1101/cshperspect.a028480.

AMPARO, T. R.; SOUSA, L. R. D.; XAVIER, V. F.; SEIBERT, J. B.; PAIVA, D. L.; SILVA, D. D. S.; TEIXEIRA, L. F. M.; SANTOS, O. D. H.; VIEIRA, P. M. A.; SOUZA, G. H. B. Extrato de *Protium spruceanum* aumenta a atividade da mupirocina quando combinado com hidrogel à base de nanoemulsão. *Pharmaceutics*, v. 16, p. 700, 2024. DOI: 10.3390/pharmaceutics16060700.

BAUTISTA-SILVA, J. P.; SEIBERT, J. B.; AMPARO, T.R.; RODRIGUES, I.V.; TEIXEIRA, L.F.M; SOUZA, G. H.B.; DOS SANTOS, O. D. H. *Melaleuca leucadendra* essential oil promotes loss of cell membrane and wall integrity and inhibits bacterial growth: An in silico and in vitro approach. *Current microbiology*, 77(1), 2020. DOI: 10.1007/s00284-020-02024-0.

BLOIS, Joseph; SMITH, Adam; JOSEPHSON, Lee. The slow cell death response when screening chemotherapeutic agents. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, v. 68, n. 3, p. 795-803, 2011.

BODRATTI, A. M.; ALEXANDRIDIS, P. Formulation of Poloxamers for Drug Delivery. *Journal of Functional Biomaterials*, v. 9, n. 1, p. 11, 2018. DOI: 10.3390/jfb9010011.

BONACUCINA, G.; MISICI-FALZI, M.; CESPI, M.; PALMIERI, G. F. Characterization of micellar systems by the use of acoustic spectroscopy. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Hoboken, v. 96, n. 12, p. 3591–3603, 2007. DOI: 10.1002/jps.21156.

BRASIL. Ministério da Saúde. Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no Sistema Único de Saúde (CONITEC). *Relatório para sociedade nº 594: transplante de membrana amniótica para o tratamento de pacientes com feridas crônicas e do pé diabético*. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2025.

BRASIL. Ministério da Saúde. *Plantas medicinais e fitoterápicos*. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2025. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/composicao/sectics/plantas-medicinais-e-fitoterapico>.

BRUN, P.; BERNABÈ, G.; FILIPPINI, R.; PIOVAN, A. In Vitro Antimicrobial Activities of Commercially Available Tea Tree (*Melaleuca alternifolia*) Essential Oils. *Curr Microbiol.* 2019 Jan;76(1):108-116. DOI: 10.1007/s00284-018-1594-x.

BRUNTON, Laurence L.; KNOLLMANN, Björn C. *As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman*. 14. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2024. E-book. ISBN 978-65-5882-240-0.

CHEN, I. C.; SU, C. Y.; CHEN, P. Y.; HOANG, T. C.; TSOU, Y. S.; FANG, H. W. Investigation and characterization of factors affecting rheological properties of poloxamer-based thermo sensitive hydrogel. *Polymers*, v. 14, n. 24, p. 5353, 2022. DOI: 10.3390/polym14245353.

CIOCE, A.; CAVANI, A.; CATTANI, C.; SCOPELLITI, F. Papel do sistema imunológico da pele na cicatrização de feridas. *Cells*, v. 13, p. 624, 2024. DOI: 10.3390/cells13070624.

CONRADO, G. G.; SIMPLICIO, F. G.; COSTA, K. R. C.; REHDER, V. L. G.; ESPINAR, M. F.; SOUZA, G. O.; SAMPAIO, P. T. B. Antibacterial activity and chemical compounds of leaves and branches of *Protium hebetatum*. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, v. 17, n. 4, p. 865–874, 2015. DOI: [10.1590/1983-084X/14\\_123](https://doi.org/10.1590/1983-084X/14_123).

CRIOLLO-MENDOZA, M. S.; CONTRERAS-ANGULO, L. A.; LEYVA-LÓPEZ, N.; GUTIÉRREZ-GRIJALVA, E. P.; JIMÉNEZ-ORTEGA, L. A.; HEREDIA, J. B. Wound healing properties of natural products: mechanisms of action. *Molecules*, v. 28, n. 2, p. 598, 2023. DOI: 10.3390/molecules28020598.

CRUZ, S. M. L. T.; BARROS, G. S. P.; NASCIMENTO, L. F. M.; FAUSTO, M. V. F.; OLIVEIRA, T. K. B. Implantação de extratos fitoterápicos em materiais cicatrizantes: uma abordagem avançada da promoção da cicatrização. *Anais da Faculdade de Medicina de Olinda*, v. 12, n. 1, p. 105–114, 2024. DOI: 10.56102/afmo.2024.359.

DAM, P.; CELIK, M.; USTUN, M.; SAHA, S.; SAHA, C.; KACAR, E. A.; KUGU, S.; KARAGULLE, E. N.; TASOGLU, S.; BUYUKSERIN, F.; MONDAL, R.; ROY, P.; MACEDO, M. L. R.; FRANCO, O. L.; CARDOSO, M. H.; ALTUNTAS, S.; MANDAL, A. K. Wound healing strategies based on nanoparticles incorporated in hydrogel wound patches. *RSC Advances*, v. 13, n. 31, p. 21345–21364, 2023. DOI: 10.1039/D3RA03477A.

DANAEI, M.; DEHGHANKHOLD, M.; ATAEI, S.; HASANZADEH DAVARANI, F.; JAVANMARD, R.; DOKHANI, A.; KHORASANI, S.; MOZAFARI, M. R. Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. *Pharmaceutics*, v. 10, n. 2, p. 57, 2018. DOI: 10.3390/pharmaceutics10020057.

ERWIN, R.; PATTON, D.; AVSAR, P.; STRAPP, H.; MOORE, Z. The impact of topical agents and dressing on pH and temperature on wound healing: a systematic, narrative review. *International Wound Journal*, Hoboken, v. 19, n. 6, p. 1397–1408, 2022. DOI: 10.1111/iwj.13733.

ESAD, M.; DIMOV, I.; CHONEVA, M.; POPOVA, M.; KOKOVA, V.; APOSTOLOVA, E.; BIVOLARSKA, A. Mecanismos moleculares da cicatrização de feridas: o papel das plantas medicinais. *Life*, v. 15, p. 1748, 2025. DOI: 10.3390/life15111748.

FACHINETTI, N.; RIGON, R. B.; ELOY, J. O.; SATO, M. R.; DOS SANTOS, K. C.; CHORILLI, M. Comparative Study of Glyceryl Behenate or Polyoxyethylene 40 Stearate-Based Lipid Carriers for Trans-Resveratrol Delivery: Development, Characterization and Evaluation of the In Vitro Tyrosinase Inhibition. *AAPS PharmSciTech*, v. 19, n. 3, p. 1401–1409, 2018. DOI: 10.1208/s12249-018-0961-z.

FEROZEKHAN, S.; UMASHANKAR, M. S.; NARAYANASAMY, D. A comprehensive review of nanogel-based drug delivery systems. *Cureus*, v. 16, n. 9, e68633, 2024. DOI: 10.7759/cureus.68633.

FERREIRA, A. C. G. R.; MOHAMED, Y. I.; SILVA, A. L. F. S.; SOUZA, C. R. S. Cicatrização cutânea: uma revisão da literatura. *Journal Archives of Health*, v. 5, n. 3, p. e2004, 2024. DOI: 10.46919/archv5n3espec-319.

GAVANJI, Shahin et al. Cytotoxic activity of herbal medicines as assessed *in vitro*: a review. *Chemistry & Biodiversity*, v. 20, n. 2, p. e202201098, 2023.

GOMES, V. A.; JORDÃO, A. J. J. M. L.; BRITO, P. E. T.; SANTOS, J. F.; MEDEIROS, B. F.; FARIAS, S. S. C.; MARIZ, S. R.; ANGELINO, Ê. M.; ALMEIDA, L. S. O lugar da fitoterapia na formação de profissionais de saúde. *Revista Fitos*, v. 19, p. e1761, 2025. DOI: 10.32712/2446-4775.2025.1761.

GONÇALVES, Amanda Mesquita Mendes. *Aspectos epidemiológicos, clínicos e econômicos de indivíduos com feridas crônicas tratados na estomatoterapia do Hospital Universitário de Brasília entre 2014 e 2020*. 2024. 108 f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) — Universidade de Brasília, Brasília, 2024.

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry*, v. 126, n. 1, p. 131-138, 1982. DOI: 10.1016/0003-2697(82)90118-X.

JEONG, Yun Hee et al. Immune-Enhancing Effects of Gwakhyangjeonggi-san in RAW 264.7 Macrophage Cells through the MAPK/NF-κB Signaling Pathways. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 25, n. 17, p. 9246, 2024.

JOHNSON, B. Z.; STEVENSON, A. W.; PRÊLE, C. M.; FEAR, M. W.; WOOD, F. M. The Role of IL-6 in Skin Fibrosis and Cutaneous Wound Healing. *Biomedicines*, v. 8, n. 5, p. 101, 2020. DOI: 10.3390/biomedicines8050101.

KETHA, Kiranmayi; GUDIPATI, Muralikrishna. Immunomodulatory activity of non starch polysaccharides isolated from green gram (*Vigna radiata*). *Food Research International*, v. 113, p. 269-276, 2018.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. *Robbins & Kumar patologia básica*. 11. ed. Rio de Janeiro: GEN Guanabara Koogan, 2025.

LARSSON, P. et al. Optimization of cell viability assays to improve replicability and reproducibility of cancer drug sensitivity screens. *Scientific Reports*, v. 10, p. 5798, 2020.

LI, C.; XU, M. M.; WANG, K.; ADLER, A. J.; VELLA, A. T.; ZHOU, B. Macrophage polarization and metainflammation. *Translational Research*, v. 191, p. 29–43, 2018. DOI: 10.1016/j.trsl.2017.10.004.

LIMA, C. S. A.; BALOGH, T. S.; VARCA, J. P. R. O.; VARCA, G. H. C.; LUGÃO, A. B.; CAMACHO-CRUZ, L. A.; BUCIO, E.; KADLUBOWSKI, S. S. An updated review of macro, micro, and nanostructured hydrogels for biomedical and pharmaceutical applications. *Pharmaceutics*, v. 12, n. 10, p. 970, 2020. DOI: 10.3390/pharmaceutics12100970.

LIMA, V. C. N.; GARCIA, A. M.; WEIRICH, A.; GONÇALVES, A. O. S.; GALDINO-JÚNIOR, H. Tratamento de pessoas com feridas crônicas nos diferentes níveis de atenção à saúde no Brasil. *Contribuciones a las Ciencias Sociales*, [S. l.], v. 17, n. 10, e11777, 2024. DOI: 10.55905/revconv.17n.10-269.

LIU, Yifan et al. Advances in nanotechnology for enhancing the solubility and bioavailability of poorly soluble drugs. *Drug Design, Development and Therapy*, p. 1469-1495, 2024.

LUNDBERG, J. O.; WEITZBERG, E. Nitric oxide signaling in health and disease. *Cell*, v. 185, p. 2853-2878, 4 aug. 2022. DOI: [10.1016/j.cell.2022.06.010](https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.06.010).

MALONE-POVOLNY, M. J.; MALONEY, S. E.; SCHOENFISCH, M. H. Nitric oxide therapy for diabetic wound healing. *Advanced Healthcare Materials*, Weinheim, v. 8, n. 12, e1801210, 2019. DOI: 10.1002/adhm.201801210.

MAHMOUD, N. N. et al. Investigating inflammatory markers in wound healing: understanding implications and identifying artifacts. *ACS Pharmacology & Translational Science*, Washington, v. 7, n. 1, p. 18–27, 2024. DOI: 10.1021/acsptsci.3c00336.

MAN, M. Q.; WAKEFIELD, J. S.; MAURO, T. M.; ELIAS, P. M. Regulatory role of nitric oxide in cutaneous inflammation. *Inflammation*, v. 45, n. 3, p. 949-964, 2022. DOI: 10.1007/s10753-021-01615-8.

MANAIA, E. B.; ABUÇAFY, M. P.; CHIARI-ANDRÉO, B. G.; SILVA, B. L.; OSHIRO JUNIOR, J. A.; CHIAVACCI, L. A. Physicochemical characterization of drug nanocarriers. *International Journal of Nanomedicine*, Auckland, v. 12, p. 4991–5011, 2017. DOI: 10.2147/IJN.S133832.

MARMITT, D. J.; REMPEL, C.; GOETTERT, M. I.; COUTO, A. (2015). Plantas medicinais da RENISUS com potencial anti-inflamatório: revisão sistemática em três bases de dados científicas. *Revista Fitos*, 9(2), 129-144. DOI:10.5935/2446-4775.20150011.

MARTELLI, Laura et al. Cisplatin and oxaliplatin cytotoxic effects in sensitive and cisplatin-resistant human cervical tumor cells: time and mode of application dependency. *Anticancer Research*, v. 29, n. 10, p. 3931-3937, 2009.

MARTINENGO, L.; OLSSON, M.; BAJPAI, R.; SOLJAK, M.; UPTON, Z.; SCHMIDTCHEN, A.; CAR, J.; JÄRBRINK, K. Prevalence of chronic wounds in the general population: systematic review and meta-analysis of observational studies. *Annals of Epidemiology*, v. 29, p. 8-15, 2019. DOI: 10.1016/j.annepidem.2018.10.005.

MATSUMURA, M.; KAKISHITA, H.; SUZUKI, M.; BANBA, N.; HATTORI, Y. Dexamethasone suppresses iNOS gene expression by inhibiting NF-kappaB in vascular smooth muscle cells. *Life Sciences*, v. 69, n. 9, p. 1067-1077, 20 jul. 2001. DOI: 10.1016/S0024-3205(01)01196-1.

MELO, D. B.; SOUZA, C. H.; SILVA, I. A. C.; OLIVEIRA, L. A.; SANTOS, M. F.; SILVA, R. O.; SOUSA, S. S. Espécies vegetais fitoterápicas essenciais no Brasil: economia, legislação e aspectos clínico-farmacológicos. *Diálogos & Ciência*, v. 3, n. 1, p. 75–97, 2023.

MELO DA SILVA, W.; CORTEZ, M. J. S.; BRITO, M. V. H.; LIMA JUNIOR, F. A.; SANTOS, R. S.; SIQUEIRA, H. G. A. S. et al. Estratégias terapêuticas para prevenção e tratamento de feridas crônicas e lesões cutâneas: uma revisão da literatura. *Revista Enfermagem Atual In Derme*, v. 99, n. 3, e025112, 2025. DOI: 10.31011/reaid-2025-v.99-n.3-art.2576.

MENEZES FILHO, A. C. P.; SANTOS, M. C.; CASTRO, C. F. S. Avaliação fitoquímica, físico-química e atividades antioxidante, hemotóxica e antibacteriana do extrato de *Protium spruceanum* (Benth.) Engl. *Journal of Biotechnology and Biodiversity*, v. 9, n. 1, p. 48–59, 2021. DOI: 10.20873/jbb.uft.cemaf.v9n1.menezesfilho.

MOGHADAM, S. R.; EBRAHIMI, S. N.; SALEHI, P. Wound healing potential of chlorogenic acid and myricetin-3-O- $\beta$ -rhamnoside isolated from *Parrotia persica*. *Molecules*, v. 22, n. 9, p. 1501, 2017.

MONIKA, P.; CHANDRAPRABHA, M. N.; RANGARAJAN, A.; WAIKER, P. V.; CHIDAMBARA MURTHY, K. N. Challenges in healing wound: role of complementary and alternative medicine. *Frontiers in Nutrition*, v. 8, art. 791899, 2022. DOI: 10.3389/fnut.2021.791899.

OLIVEIRA, J. R. R.; ILHA, S.; NAVARINE, T. R. R.; MARQUES, L. P. S.; MUNHOZ, O. L.; CASARIN, F. Feridas crônicas no Sistema Único de Saúde: revisão narrativa. *Revista Recien – Revista Científica de Enfermagem*, v. 16, n. 44, p. 196–209, 2026. DOI: 10.24276/rrecien2026.16.44019.

OLIVEIRA, T. R.; TEIXEIRA, A. L.; BARBOSA, J. P.; BUSATO DE FEIRIA, S. N.; BONI, G. C.; MAIA, F.; ANIBAL, P. C.; WIJESINGHE, G. K.; HÖFLING, J. F. Melaleuca spp. essential oil and its medical applicability. *Brazilian Journal of Natural Sciences*, v. 3, n. 1, p. 249, 2020. DOI: 10.31415/bjns.v3i1.89.

PATENALL, B. L.; CARTER, K. A.; RAMSEY, M. R. Kick-starting wound healing: a review of pro-healing drugs. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 25, n. 2, p. 1304, 2024. DOI: 10.3390/ijms25021304.

PATRAMURTI, C.; AMIN, R.; NASTITI, C. M. R. R.; HARIONO, M. A review on the potency of *Melaleuca leucadendron* leaves solid waste in wood preservation and its in silico prediction upon biological activities. *International Journal of Forestry Research*, v. 2020, p. 1–13, 2020. DOI: 10.1155/2020/8885259.

PÉREZ DE LA LASTRA, J. M.; ANDRÉS JUAN, C.; PLOU, F. J.; PÉREZ-LEBEÑA, E. The nitration of proteins, lipids and DNA by peroxynitrite derivatives—Chemistry involved and biological relevance. *Stresses*, v. 2, n. 1, p. 53-64, 2022. DOI: 10.3390/stresses2010005.

PORTO, A. S.; ALMEIDA, I. V.; VICENTINI, V. E. P. Nanoemulsões formuladas para uso tópico: estudo de síntese e toxicidade. *Revista Fitos*, v. 14, n. 4, p. 513-527, 2020. DOI:10.32712/2446-4775.2020.1060.

RICE, J. B.; WHITE, A. G.; SCARPATI, L. M.; WAN, G.; NELSON, W. W. Long-term systemic corticosteroid exposure: a systematic literature review. *Clinical Therapeutics*, v. 39, n. 11, p. 2216-2229, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2017.09.011>.

RODRIGUES, G. C.; SOUZA, E.; SANTOS, M. S.; MACEDO, A. B. T.; PAZ, A. A.; MONTANARI, C. C. Parâmetros utilizados para avaliar feridas em adultos atendidos por enfermeiros: revisão de escopo. *Revista Enfermagem Atual In Derme*, v. 99, n. 3, e025263, 2025. DOI: 10.31011/reaid-2025-v.99-n.3-art.2563.

RODRIGUES, M. L.; GOMES, A. J.; FUNEZ, M. I.; MARQUES, M. A. S.; LUNARDI, C. N. *Euphorbia tirucalli* latex loaded polymer nanoparticles: synthesis, characterization, in vitro release and in vivo antinociceptive action. *PLOS ONE*, v. 17, n. 9, e0274432, 2022. DOI: 10.1371/journal.pone.0274432.

ROȘCA, O.-J.; CONEAC, G.-H.; RACOVICIANU, R.; NISTOR, A.; OLARIU, I.-V.; COTAN, A.-M.; NEGREA-GHIULAI, R.; DEHELEAN, C. A.; VLAIA, L. L.; ȘOICA, C. M. Optimizing Burn Wound Healing: The Critical Role of pH and Rheological Behavior in Plant-Derived Topical Formulations. *Pharmaceutics*, Basel, v. 17, n. 7, art. 853, 2025. DOI: 10.3390/pharmaceutics17070853.

SERAGLIO, S. K. T.; SCHULZ, M.; NEHRING, P.; DALLA SANTA, O. R.; BALDISSARELLI, V.; COSTA, A. C. O. Nutritional and bioactive potential of Myrtaceae fruits during ripening. *Food Chemistry*, v. 239, p. 649–656, 2018. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.06.118.

SIAFAKA, P. I.; BÜLBÜL, E. Ö.; OKUR, M. E.; KARANTAŞ, I. D.; ÜSTÜNDAĞ OKUR, N. The application of nanogels as efficient drug delivery platforms for dermal/transdermal delivery. *Gels*, Basel, v. 9, n. 9, art. 753, 2023. DOI: 10.3390/gels9090753.

SIANI, A. C.; NAKAMURA, M. J.; DAS NEVES, G. P.; MONTEIRO, S. S.; RAMOS, M. F. S. Leaf essential oil from three exotic Myrtaceae species growing in the Botanical Garden of Rio de Janeiro, Brazil. *American Journal of Plant Sciences*, v. 7, n. 6, p. 834–840, 2016. DOI: 10.4236/ajps.2016.76079.

SILVA, L. D. *Extratos e frações de Melaleuca leucadendron (L.) L.* 2022. 75 f. Monografia (Graduação em Farmácia) — Universidade Federal de Ouro Preto, 2022.

SILVA, M. T.; KREMER, T. S.; COSTA, S. P.; RUIZ, L. S.; GANDRA, R. F.; AULER, M. E. Os desafios na conduta terapêutica em pacientes acometidos com feridas crônicas. *Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR*, v. 27, n. 3, p. 1242–1268, 2023. DOI: 10.25110/arqsaude.v27i3.2023-013.

SILVA, T. E.; VALE, C. M. G. C.; BRITO, T. S. Evidências clínicas do uso de plantas medicinais e fitoterápicos na cicatrização de feridas cutâneas. *Revista Ciência Plural*, v. 10, n. 1, p. e35109, 2024. DOI: 10.21680/2446-7286.2024v10n1ID35109.

SONEJA, A.; DREWS, M.; MALINSKI, T. Role of nitric oxide, nitroxidative and oxidative stress in wound healing. *Pharmacological Reports*, v. 57, suppl. 1, p. 108–119, 2005. PMID: 16415491.

SUN, Z.-L.; FENG, Y.; ZOU, M.-L.; ZHAO, B.-H.; LIU, S.-Y.; DU, Y.; YU, S.; YANG, M.-L.; WU, J.-J.; YUAN, Z.-D.; LV, G.-Z.; ZHANG, J.-R.; YUAN, F.-L. Emerging role of IL-10 in hypertrophic scars. *Frontiers in Medicine*, v. 7, p. 438, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmed.2020.00438>.

VASCONCELOS, A. F.; NASCIMENTO, T. S. V.; DIAS, R. S.; NUNES, M. P. V.; LEARDINI, G. M.; ARAÚJO, G. S. S.; RODRIGUES, D. A. S.; MACEDO, A. B. T. Topical therapies for pressure wound healing: identifying the effectiveness in research of the last five years. *Revista de Medicina*, São Paulo, v. 102, n. 6, e-209828, 2023. DOI: 10.11606/issn.1679-9836.v102i6e-209828.

VELOSO, P. H. F.; LACERDA, G. A. Avaliação da capacidade antioxidante, quantificação de fenólicos e perfil UV do extrato acetato de etila de *Protium spruceanum* Benth. Engl. *Revista Fitos*, v. 19, p. e1825, 2025. DOI: 10.32712/2446-4775.2025.1825.

VIERA, V. B. Compostos bioativos, atividade antioxidante e antimicrobiana na casca de cebola roxa (*Allium cepa* L.) submetidos a diferentes métodos de extração. 2016. 123 p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Santa Maria, 2016.

WALLACE, Heather A.; BASEHORE, Brandon M.; ZITO, Patrick M. Wound healing phases. In: *STATPEARLS*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023.

WHITE, J. M.; CALABRESE, M. A. Impact of small molecule and reverse poloxamer addition on the micellization and gelation mechanisms of poloxamer hydrogels. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 638, p. 128246, 2022. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2021.128246.

WRIGHT, M. H.; GREENE, A. C.; COCK, I. E. Inhibition of *Bacillus anthracis* growth by Australian native plants used traditionally as antibacterial medicines. *Pharmacognosy Journal*, v. 7, n. 6, 2015. DOI:10.5530/pj.2015.6.13.

ZHANG, J.; WU, H.; JIANG, D.; YANG, Y.; TANG, W.; XU, K. The antifungal activity of essential oil from *Melaleuca leucadendra* (L.) L. grown in China and its synergistic

effects with conventional antibiotics against *Candida*. *Natural Product Research*, v. 33, n. 17, p. 2545-2548, 2019. DOI: 10.1080/14786419.2018.1448979.

ZHUO, Yue; ZHAO, Yong-Gang; ZHANG, Yun. Enhancing drug solubility, bioavailability, and targeted therapeutic applications through magnetic nanoparticles. *Molecules*, v. 29, n. 20, p. 4854, 2024.