



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS I
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

LUCAS MATHEUS BARRETO SANTANA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE SISTEMAS
MICROEMULSIONADOS PARA USO TÓPICO CONTENDO ÓLEO-RESINA DE
Copaifera multijuga HAYNE (FABACEAE)**

**CAMPINA GRANDE
2018**

LUCAS MATHEUS BARRETO SANTANA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE SISTEMAS
MICROEMULSIONADOS PARA USO TÓPICO CONTENDO ÓLEO-RESINA DE
Copaifera multijuga HAYNE (FABACEAE)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual da Paraíba, em cumprimento à exigência para obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Bolívar Ponciano Goulart de Lima Damasceno

Coorientador: Prof. Dr. João Walter de Souza da Silveira

**CAMPINA GRANDE
2018**

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

S231a Santana, Lucas Matheus Barreto.
Avaliação da atividade anti-inflamatória de sistemas microemulsionados para uso tópico contendo óleo-resina de *Copaifera multijuga* Hayne (Fabaceae) [manuscrito] : / Lucas Matheus Barreto Santana , . - 2018.
51 p. : il. colorido.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde , 2018.

"Orientação : Prof. Dr. Bolívar Ponciano Goulart de Lima Damasceno , Coordenação do Curso de Farmácia - CCBS."

"Coorientação: Prof. Dr. João Walter de Souza da Silveira , Coordenação do Curso de Farmácia - CCBS.""

1. Plantas medicinais. 2. Medicina popular. 3. Copaíba. 4. Farmacologia. I. Título

21. ed. CDD 615.321

LUCAS MATHEUS BARRETO SANTANA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE SISTEMAS
MICROEMULSIONADOS PARA USO TÓPICO CONTENDO ÓLEO-RESINA DE
Copaifera multijuga HAYNE (FABACEAE)

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao curso de graduação em
Ciências Biológicas da Universidade
Estadual da Paraíba, em cumprimento à
exigência para obtenção do título de
bacharel em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Farmacologia

Aprovado em: 05/ 07/2018.

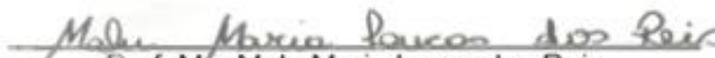
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Bolívar Ponciano Goulart de Lima Damasceno (Orientador)
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Prof. Dr. João Augusto Oshiro Junior
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Prof. M^c. Malu Maria Lucas dos Reis
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Aos meu pais, Maria e Luiz,
maiores exemplos da minha vida
DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ser minha força e maior fonte de inspiração, por estar presente em todos os momentos da minha vida, por me proporcionar a oportunidade de me graduar e me fazer amadurecer durante esta jornada.

Aos meu pais, Maria e Luiz, por sempre estarem comigo, por todo o carinho e por todo o esforço para me proporcionar tudo o que precisei em meus estudos.

Aos meus irmãos Aline, Amanda e Diego, por sempre estarem presentes.

Ao meu Orientador Bolívar, por me proporcionar diversas oportunidades de crescer cientificamente.

Ao meu outro orientador e amigo João, por me ensinar por mais de dois anos os caminhos da ciência, por ser meu maior exemplo de profissional e pesquisador.

As minhas amigas Karoll e Malu, por seu companheirismo, paciência e ensinamentos, por muitas vezes terem sido as pessoas nas quais me espelhei, tanto em momentos pessoais, bem como, durante as pesquisas ao longo dessa caminhada.

A minha irmã científica Joyce, por toda sua força e companheirismo.

A todos os meus colegas de laboratório que estiveram comigo nos mais diversos momentos, nos quais aprendemos muita coisa juntos.

A todos os meus colegas de classe, por cada momento vivido e cada desafio superado, por toda a diversão e companheirismo que me proporcionaram ao longo de quatro anos e meio, por todos os momentos que ficaram para sempre em minha memória.

A todos os amigos que adquiri durante a graduação, entre os quais posso citar Anderson, Eduardo, Betsy, Vitoria, Maraisa, Moacyr, Marcia, Jefferson, Rafaela, Stefanny, Yorran e Stephanie.

Ao professor Alexandre, por me iniciar nos caminhos da ciência, me ajudar de diferentes formas em várias situações, por sua amizade.

Ao professor Cavalcante, um dos homens de maior coração que já tive o prazer de conhecer, por ser um excelente exemplo de profissional e ser humano.

A os muitos professores que encontrei ao longo da graduação e me cativaram a dar o meu melhor como futuro profissional.

As minhas amigas Karoline, Ellen e Rosália, por todos os momentos de diversão.

Aos meus amigos Felipe e Jocélio por se tornarem meus irmãos ao longo da minha vida.

Enfim, a todas as pessoas que passaram ou estão em minha vida e me mostram, me ensinam, me ajudam, e me inspiram ao longo dessa caminhada. Sou profundamente grato a pessoas que mesmo sem me conhecer me ensinaram e mostraram muito sobre a vida em suas palestras, discussões e aulas, a muitos que com pequenos gestos do dia a dia me ajudam a continuar caminhando. A cada um que mesmo sem saber me influenciou a ser melhor.

“A educação é o nosso passaporte para o futuro, pois, o amanhã pertence as pessoas que se preparam hoje”

Malcon X

RESUMO

As espécies do gênero *Copaifera* são umas das mais utilizadas na medicina popular brasileira, sendo utilizadas no tratamento de diferentes doenças, incluindo as que apresentam quadros clínicos inflamatórios. A inflamação que é uma resposta de defesa do organismo a diferentes estímulos, quando se torna crônica está associada a um grande número de doenças. Por causa da necessidade de inovação terapêutica é crescente o número de trabalhos com nanotecnologia que buscam melhorar a eficácia dos tratamentos. Por isso, este trabalho teve como objetivo desenvolver microemulsões (ME) bicontínuas para a incorporação do óleo de copaíba e avaliar sua atividade anti-inflamatória. Os componentes foram escolhidos a partir de seu uso na literatura, em seguida o Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo (EHL) foi calculado. A partir do EHL foi construído um diagrama de fases pseudoternário (DFPT) utilizando água deionizada, miristato de isopropila e os tensoativos Kolliphor[®] HS15 e Monoestearato de Sorbitano 80 (Span[®] 80). Analisando o DFPT foi selecionado um ponto de possível formação de ME bicontínua, que não apresentou separação de fases, sem turbidez e opticamente transparente e viscoso para a incorporação do óleo nas proporções de 1 e 5%. Os sistemas foram avaliados físico-quimicamente pela análise macroscópica e pelos testes de pH e condutividade elétrica. A atividade anti-inflamatória foi avaliada pelo teste de edema de pata induzido por carragenina em camundongos *Swiss*. Os sistemas apresentaram características organolépticas satisfatórias, com a forma de um gel límpido, brilhante, homogêneo, transparente, sem separação de fases ou turbidez. O óleo puro apresentou caráter ácido ($4,32 \pm 0,07$) porém quando incorporado aos sistemas microemulsionados, as MEs apresentaram pH neutro (ME de 1% $7,34 \pm 0,05$ e ME de 5% $7,34 \pm 0,4$), ideal para aplicações tópicas. No ensaio farmacológico, observou-se que o óleo possui atividade anti-inflamatória e após ser incorporado a MEs o efeito tornou-se mais rápido e efetivo, significativamente iguais aos controles positivos. Por isso, conclui-se que a utilização de MEs como sistema carreador para o óleo de copaíba é uma importante alternativa para viabilização do uso tópico racional deste óleo na terapêutica de processos inflamatórios.

Palavras-Chave: Antidematogênico. Copaíba. Plantas medicinais.

ABSTRACT

The species of the genus *Copaifera* are some of the most used in Brazilian folk medicine, being used in the treatment of different diseases, including those that feature inflammatory clinical. The inflammation is a defense of the organism's response to different stimuli, it becomes chronic is associated with a large number of diseases. Because of the need for therapeutic innovation is increasing the number of works with nanotechnology that seek to improve the effectiveness of treatments. Therefore, the purpose of this work was to develop bicontinuous microemulsions (ME) for the incorporation of copaiba oil and to evaluate its anti-inflammatory activity. The components were chosen from your use in literature, the the Balance Hydrophilic-Lipophilic (BHL) was calculated. From the BLH, a pseudoternary phase diagram (PTPD) was constructed using deionized water, isopropyl myristate and Kolliphor™ HS15 and Sorbitan 80 monostearate (Span™ 80) as surfactants. Analyzing the PTPD was selected a point of possible formation of bicontinuous ME, which did not show phase separation, without turbidity, optically transparent and viscous to incorporate the oil in proportions of 1 and 5%. The systems was physico-chemically evaluated by macroscopic analysis, pH and electric conductivity tests. Its anti-inflammatory activity was evaluated by the carrageenan-induced paw edema test in mice. The systems presented satisfactory organoleptic characteristics, with the form of a gel clear, bright, transparent, without phase separation or turbidity. The oil pure acid character presented however when incorporated into the ME presented a neutral pH neutro (ME 1% $7,34 \pm 0,05$ e ME 5% $7,34 \pm 0,4$). in the pharmacological test was obtained that the oil has antiinflammatory activity, after being incorporated into the ME effect becomes faster and more effective, significantly equal to the positive controls. The use of my carrier system for copaiba oil is an important alternative for the viability of the topical use of this oil in the treatment of inflammatory processes.

Keywords: Antidematogenic. Medicinal plants. Copaiba.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Principais sesquiterpenos encontrados no óleo-resina	21
Figura 2 – Ácido copálico	21
Figura 3 – Diferentes tipos de microemulsões de acordo com sua estrutura interna.....	25
Figura 4 – Sistemas formados de acordo com a classificação de Winsor.....	26
Figura 5 – Diagrama de fases pseudoternário.....	27
Figura 6 – As camadas de pele.....	28
Figura 7 – Sistemas obtidos no diagrama de fases pseudoternário.....	36
Figura 8 – Aspecto macroscópico das formulações após 48 horas.....	37
Figura 9 – Efeito anti-inflamatório do óleo resina <i>in natura</i> ou incorporado a sistemas microemulsionados após uma hora da indução do edema de pata por carragenina.....	39
Figura 10 – Efeito anti-inflamatório do óleo resina <i>in natura</i> ou incorporado a sistemas microemulsionados após duas horas da indução do edema de pata por carragenina.....	40
Figura 11 – Efeito anti-inflamatório do óleo resina <i>in natura</i> ou incorporado a sistemas microemulsionados após três horas da indução do edema de pata por carragenina.....	42
Figura 12 – Efeito anti-inflamatório do óleo resina <i>in natura</i> ou incorporado a sistemas microemulsionados após quatro horas da indução do edema de pata por carragenina.....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características dos processos inflamatórios agudo e crônico	23
Tabela 2 - Composição da formulação selecionada 1% e 5%, respectivamente	37
Tabela 3 - Características físico-químicas do óleo <i>in natura</i> e das microemulsões ..	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μ l	Microlitro
μ m	Micrómetro
AINE	Anti-inflamatório não esteroide
CAR	Carragenina
DEXA	Dexametasona
DFPT	Diagrama de fases pseudoternário
DICLOF	Diclofenato
DICLOF	Diclofenaco
ELL	Emulsão Líquido leitosa
ELO	Emulsão líquida opaca
M1	Microemulsão com 1% de óleo-resina incorporado
M5	Microemulsão com 5% de óleo-resina incorporado
MB	Microemulsão branca
ME	Microemulsão
MEB	Microemulsão bicontínua
mm	Milímetro
NE	Nanoemulsão
OC	Óleo de copaíba
OR	Óleo-resina
SAL	Salina
SSO	Sistema semi-sólido opaco
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
μ S/cm	Microsiemens por centímetro

LISTA DE SÍMBOLOS

% Porcentagem

α Alfa

β Beta

δ Delta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	O gênero <i>Copaifera</i>	18
2.2	Inflamação	22
2.3	Microemulsão	24
2.3.1	<i>Conceito e classificação</i>	24
2.3.2	Microemulsão para uso tópico	27
3	OBJETIVOS	29
3.1	Objetivo geral	29
3.2	Objetivos específicos	29
4	METODOLOGIA	30
4.1	Material	30
4.2	Seleção dos componentes das formulações.....	30
4.3	Diagrama de fases pseudoternário (DFPT)	31
4.4	Seleção da formulação e incorporação do óleo de copaiba	31
4.5	Caracterização físico-química	31
4.5.1	<i>Aspecto macroscópico</i>	31
4.5.2	<i>pH</i>	32
4.5.3	<i>Condutividade elétrica</i>	32
4.5	Ensaio farmacológico	32
4.5.1	Animais	32
4.5.2	<i>Indução do edema de pata</i>	32
4.5.3	<i>Grupos e tratamentos</i>	33
4.5.4	<i>Espessura da pata</i>	34
4.6	Análise estatística	34
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1	Seleção dos componentes das formulações	35
5.2	Diagrama de fases pseudoternário	35
5.3	Seleção da formulação	36
5.4	Aspecto macroscópico.....	37
5.5	pH e condutividade elétrica	38

5.6	Ensaio farmacológico	39
6	CONCLUSÃO	44
	REFERÊNCIAS	45
	ANEXO A – PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS -CEUA/CESEDPB	51

1 INTRODUÇÃO

Em muitas regiões, as espécies vegetais são o principal recurso para o tratamento de doenças. Estima-se que em países em desenvolvimento as plantas medicinais representem 80% do tratamento utilizado pela população (RIBEIRO et al., 2017; MOREIRA et al., 2010). Contudo, avaliar o potencial farmacológico das espécies vegetais representa um importante campo de pesquisa no Brasil, por causa da necessidade de inovação terapêutica para diversas doenças (DANTAS; AMAZONAS, 2016; VIEGAS; BOLZANI, 2006), refletindo assim, no grande número de artigos publicados a cada ano em periódicos de diferentes áreas, como química e farmacologia (DUTRA et al., 2016; BARREIRO; BOLZANI, 2009; COSTA; MARTINS 2017).

Entre as plantas utilizadas na medicina popular brasileira, pode-se citar as espécies do gênero *Copaifera*. As árvores do gênero são de grande porte e podem viver até 400 anos. Possuem interesse comercial devido à madeira e ao óleo-resina (OR) conhecido popularmente como óleo de copaíba (OC), que é extraído do tronco. É atribuído ao OC uma vasta lista de propriedades medicinais na medicina popular, tais como, agente anti-inflamatório, analgésico, antidiarreico, cicatrizante, afrodisíaco, antioxidante, antitetânico, anti-herpético, bactericida, anticancerígeno, entre muitas outras. Além disso, o óleo é utilizado em diversas outras aplicações, como: secativo na indústria de vernizes, solventes em pinturas de porcelanas, aditivo na confecção de borracha, aditivos de alimentos, na indústria de perfumes como fixador de odores, na fabricação de cremes e sabonetes (PIERE et al., 2009; BARBOSA et al., 2012).

O OR das diferentes espécies de copaíba é composto por uma mistura de sesquiterpenos e diterpenos e sua etnofarmacologia demonstra grande uso no tratamento de diferentes doenças, por isso, diversos estudos têm sido realizados com o objetivo de comprovar o potencial farmacológico do óleo puro e suas frações. E mais recentemente este óleo tem sido incorporado a diferentes sistemas, como nanoemulsões, hidrogéis e microemulsões (LUCCA et al., 2017; VEIGA et al., 2006; NEVES et al., 2018).

A etnofarmacologia indica o uso do OC no tratamento de diferentes doenças inflamatórias pela população, sendo o potencial anti-inflamatório uma das principais

atividades descritas e comprovadas na literatura (JUNIOR; PINTO 2002). Esta atividade presente no OC é interessante, devido a uma elevada porcentagem da população sofrer com quadros clínicos inflamatórios. Como a psoríase, que afeta de 2 a 3 % da população mundial, que tem grande impacto na qualidade de vida do indivíduo e é uma doença inflamatória crônica da pele (SILVEIRA; NETO; FERREIRA, 2017).

A inflamação, que é uma resposta da imunidade inata a um agente infeccioso ou a uma lesão tecidual, possui como função a remoção de qualquer corpo estranho e a recuperação do tecido, restabelecendo sua homeostasia. No entanto, a permanência do estímulo lesivo, ou a falha na regulação da inflamação pelo próprio organismo pode tornar o processo crônico. A cronicidade do processo inflamatório é prejudicial ao organismo, estando associada a diferentes doenças (GOMES et al., 2010; WAGENER; LUNDTVIG, 2013).

Um dos principais recursos para o tratamento de tais desordens são os anti-inflamatórios não esteroides (AINE), no entanto, o uso dessa classe de medicamentos resulta em diversos efeitos colaterais, como gastrite, úlceras gástricas, perfuração gastrointestinal, disfunção plaquetária, hemorragia e comprometimento renal e quando utilizados pela via tópica, secura cutânea e prurido (MOREIRA; AFONSO; ARAUJO, 2014; FIGUEREIDO; ALVES, 2015). Dessa forma, torna-se necessário não apenas a descoberta de novos fármacos com atividade anti-inflamatória, mas também, o desenvolvimento de sistemas carreadores eficientes que potencializem a atividade terapêutica e diminuam os efeitos adversos do medicamento, como as microemulsões.

Microemulsionados são caracterizadas por serem termodinamicamente estáveis, isotrópicos e translúcidos. Constituídos pela mistura de dois líquidos imiscíveis, água e óleo, estabilizados por um filme interfacial de tensoativos (DAMASCENO et al., 2011). São sistemas carreadores, capazes de aumentar a absorção do princípio ativo, devido à grande concentração de tensoativos, aumentar a solubilização e dissolução de fármacos lipofílicos, e ainda possuem alta estabilidade, proteção dos compostos ativos contra a degradação, além de promover liberação controlada e sustentada (FIGUEIREDO et al., 2013; FORMARIZ et al., 2005)

Portanto, a necessidade de inovação terapêutica para desordens inflamatórias, associada a crescente pesquisa com sistemas estruturados em

escalas manométricas, e ao baixo custo do OR que apresenta atividade anti-inflamatória comprovada, torna-se interessante o desenvolvimento de microemulsões contendo OR de copaíba. Por isso, o presente estudo avaliou o potencial anti-inflamatório de microemulsões contendo OR como possível medicamento para promover a melhora de quadros clínicos associados a distúrbios inflamatórios.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O gênero *Copaifera*

As árvores popularmente conhecidas como copaíba, copaibeiras ou pau d'óleo são classificadas como pertencentes à família Fabaceae Lindl, subfamília Caesalpinoideae Kunth e ao gênero *Copaifera* Linneu. O gênero possui aproximadamente 72 espécies, sendo mais de 20 encontradas no Brasil, destas, 17 são endêmicas (YAMAGUCHI; GARCIA, 2012). As mais encontradas são a *Copaifera officinalis* L., *Copaifera reticulata* Ducke, *Copaifera multijuga* Hayne, *Copaifera langsdorffi* Desf, *Copaifera cearensis* Huber, *Copaifera guianensis* Desf, *Copaifera confertiflora* Bth, e *Copaifera coriacea* Mart. Tais espécies, consideradas morfologicamente semelhantes são nativas da África ocidental e América do Sul, crescendo de forma abundante nas florestas da região norte do Brasil, principalmente nos estados do Pará e Amazonas e em algumas regiões da Venezuela, Guiana e Colômbia. (BASILE et al., 1988; PIERE et al., 2009; LEANDRO et al., 2012).

Copaibeiras são árvores de crescimento lento, que alcançam até 40 metros de altura, seu tronco é áspero, de cor escura, medindo até 4 metros de diâmetro. Suas folhas são alternadas, pecioladas e penuladas. Seus frutos contêm sementes ovoides. As flores são pequenas, apétalas, hermafroditas, organizadas em panículos axilares. As espécies do gênero possuem grande longevidade, podendo viver até 400 anos. Uma das principais características desse grupo de espécies é a produção de um óleo resinoso, conhecido popularmente como óleo de copaíba (OC), que é extraído diretamente do tronco das árvores (JUNIOR; PINTO, 2002; PIERE et al., 2009; MASSON et al., 2013).

O OC é também conhecido como bálsamo de copaíba, copahyba, copaibarana, copaúba, copaibo, copal, maram, marimari e bálsamo dos jesuítas, porém, a designação mais adequada é óleo-resina (OR) (JUNIOR; PINTO 2002). É um produto da excreção e desintoxicação vegetal, que tem a função de proteção contra animais, fungos e bactérias. Os OR das diferentes espécies, são vendidos em comércios populares em todo o país, como feiras livres, ervanários e lojas de produtos naturais. As espécies do gênero são amplamente difundidas na medicina

popular brasileira, sendo encontrados registros da utilização do óleo desde os tempos coloniais (YAMAGUCHI; GARCIA, 2012).

A origem do nome copaíba vem do tupi *cupa-yba*, que significa árvore de depósito. Existem relatos do uso medicinal do óleo por índios, feito pelos exploradores europeus desde o século XVI. Os povos indígenas da América Latina o aplicavam sobre ferimentos de batalhas e no coto umbilical dos recém-nascidos (PIERE et al., 2009). A primeira citação encontrada referente ao óleo foi feita por Petrus Martius ao Papa Leão X em 1534. Além disso, desde os primeiros anos do descobrimento, os exploradores perceberam que animais machucados tinham o hábito de se esfregar nas árvores de copaíba. A descoberta de suas propriedades terapêuticas ajudou os primeiros médicos brasileiros a contornar a falta de medicamentos que normalmente teriam acesso na Europa, pois o seu suprimento para a colônia era intermitente. Logo, a planta foi indicada para diversos usos medicinais desde os primeiros anos do descobrimento (JUNIOR; PINTO, 2002)

As copaíbas são um dos grupos de plantas mais conhecidas e utilizadas na medicina popular brasileira. A maioria dos trabalhos publicados sobre o gênero, estão relacionados ao OR, por possuir propriedades de grande interesse farmacológico. O potencial farmacológico do OR para diversas atividades farmacológicas já foi comprovado, o que justifica sua utilização pela população por todo o país, em geral administrado pela via oral ou tópica. (NOGUEIRA et al., 2012). É o fitoterápico mais utilizado e conhecido pelas populações mais pobres da região Norte (MEDONÇA; ONOFRE, 2009). Por isso, na medicina popular o OR é indicado por exemplo como: agente anti-inflamatório, analgésico, antidiarreico, cicatrizante, afrodisíaco, antioxidante, antitetânico, anti-herpético, bactericida, anticancerígeno, antitumoral, leishmanicida, no tratamento de hemorragias, paralisia, dores de cabeça e picadas de cobra, entre muitos outros (LEANDRO et al., 2012; YAMAGUCHI; GARCIA, 2012).

O OR é um líquido transparente, que apresenta um aspecto que varia de amarelo claro para marrom avermelhado, viscoso e fluído, possui forte odor de cumarina e sabor amargo. Pode ser estocado por dois anos sem sofrer alterações de suas propriedades, podendo se transformar em resina se exposto ao ar e a luz. É composto por uma parte resinosa não volátil, constituída de diversos diterpenos, e de um óleo volátil, constituído por sesquiterpenos (SILVA; CORTESI; FUSARI, 2010a; MEDONÇA; ONOFRE, 2009).

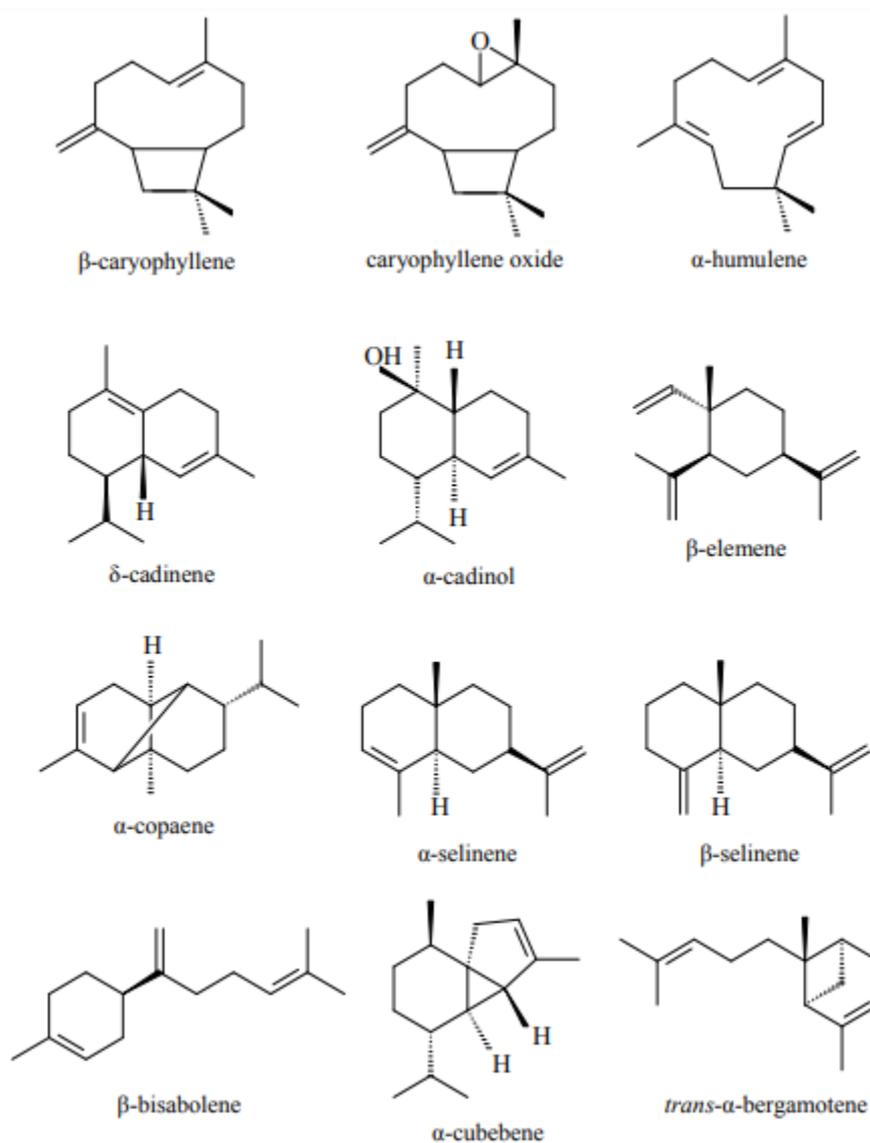
Muitos estudos têm demonstrado que os sesquiterpenos são os constituintes majoritários do OR, com a concentração variando entre 50 e 90% do total do óleo. Por isso, algumas vezes as atividades farmacológicas do OR são atribuídas a um ou mais sesquiterpenos nele presentes, entretanto, estes efeitos não devem ser relacionados apenas a alguns poucos sesquiterpenos, pois, os diferentes constituintes do óleo podem interagir de maneira sinérgica para a promoção da atividade observada. Os principais sesquiterpenos encontrados no OR são: β -cariofileno, óxido de cariofileno, α -humuleno, δ -cadineno, α -cadinol, α e β -selineno, β -elemeno, α -copaeno, trans- α -bergamotene e β -bisaboleno (Figura 1) (SILVA; CORTESI; FUSARI, 2010a; LEANDRO et al., 2012). Destes, o β -cariofileno é o sesquiterpeno majoritário, tendo algumas atividades farmacológicas comprovadas, como por exemplo, ação antibacteriana, antifúngica, antiemética e anti-inflamatória (PIERE et al., 2009).

Os principais diterpenos que compõem o óleo essencial são os ácidos hardwíckico, colavenol, copaífero, copálico, entre outros. O ácido copálico (Figura 2) é o único encontrado nos OR das diferentes espécies de copaíba, por isso, pode ser utilizado como biomarcador no controle da qualidade do óleo, já que é comum este sofrer adulterações sendo misturado a outros tipos de óleos, como o óleo de soja (LEANDRO et al., 2012; MEDONÇA; ONOFRE, 2009). O OR também pode sofrer variação na sua composição mesmo tendo origem na mesma espécie. Junior e Pinto (2002) relatam a ocorrência de variações nos princípios ativos presentes no gênero copaíba, os autores afirmam ainda que tais variações podem ocorrer devido a diferentes fatores, como: alterações diurnas, sazonais, de intensidade de luz e variação na concentração de nutrientes do solo.

São várias as atividades farmacológicas presentes no óleo, por exemplo a atividade anti-inflamatória, cicatrizante, antisséptica, antitumoral, antibacteriana, expectorante, gastroprotetora, diurética e analgésica. O OR apresenta atividade antimicrobiana para uma gama de cepas bacterianas e fúngicas (LEANDRO et al., 2012; MEDONÇA; ONOFRE, 2009). Entretanto, em altas concentrações o óleo pode provocar irritações gastrointestinais, depressão do sistema nervoso central, náuseas, sialorreia e vômito (YAMAGUCHI; GARCIA, 2012). Sachetti (2017) determinou que a dose letal aguda do OR como maior que 2000mg/kg sem sinais clínicos de toxicidade e neurotoxicidade, nas doses de 1000 e 1250 mg/kg o óleo foi

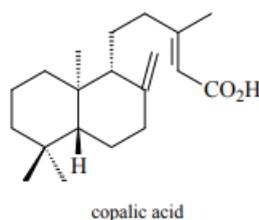
tóxico com redução do consumo de ração e aumento de peso e em doses maiores o óleo afetou o desenvolvimento embriofetal. Dessa forma, foi estimado que a ingestão segura para mulheres gestantes foi de 5 mg/kg por dia.

Figura 1 - Principais sesquiterpenos encontrados no óleo-resina.



Fonte: Leandro et al., 2012.

Figura 2 - Ácido copálico



Fonte: Leandro et al., 2012.

A anti-inflamatória é amplamente descrita na literatura, justificando sua larga utilização na medicina popular para o tratamento de doenças inflamatórias. Foi observado que o OR e algumas de suas frações inibem a formação do edema de pata induzido por bradicinina e carragenina (VEIGA et al., 2006). Também foi demonstrado seu efeito anti-inflamatório pela inibição de edema induzido por ácido araquidônico, indicando que o OR pode estar envolvido na inibição das vias COX e LOX, atuando como anti-inflamatório não esteroide (AINE) (LUCCA et al., 2017). O trabalho realizado por GOMES e colaboradores (2008), demonstrou que o tratamento com o OR reduziu significativamente a expressão dos mediadores inflamatórios óxido nítrico, prostaglandina E2 e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α).

2.2 Inflamação

A resposta inflamatória pode ser dividida em dois tipos, imunidade inata e adquirida. A imunidade inata apresenta uma resposta rápida, porém limitada a um grande número de estímulos, sendo um de seus principais mecanismos de defesa o processo inflamatório. A inflamação é uma resposta a uma infecção ao organismo ou a uma lesão tecidual. Seu objetivo é restaurar a homeostase do tecido danificado, por meio da remoção do agente invasor e do reparo tecidual. É um processo biológico complexo, altamente regulado por mediadores químicos endógenos e envolve componentes vasculares, celulares e uma diversidade de substâncias solúveis. Tem como característica cinco sinais clínicos: dor, rubor, calor, edema e perda de função (ALESSANDRI et al., 2013; CRUVINEL et al., 2010; JÄNIC; GREEN, 2014).

A inflamação pode ser classificada em aguda ou crônica, suas principais diferenças estão demonstradas na Tabela 1. Na inflamação aguda, predominam

elementos da imunidade inata, sendo os neutrófilos e macrófagos as principais células envolvidas, tem início imediato após o estímulo e duração de poucos dias. A remoção do estímulo desencadeador da resposta inflamatória leva ao seu término e ao reparo completo do tecido. No entanto, a permanência do estímulo lesivo, ou a falha na regulação da inflamação pelo próprio organismo torna o processo crônico. (CRUVINEL et al., 2010).

Na inflamação crônica, destruição e reparo tecidual acontecem ao mesmo tempo. Nesta condição o processo inflamatório é mantido, e ocorre mudança progressiva dos tipos celulares e substâncias solúveis presentes no tecido, que apresentam um infiltrado de células mononucleares (monócitos, macrófagos e linfócitos), além de sinais de angiogênese e fibrose, pode durar meses ou anos (CRUVINEL et al., 2010), também apresenta citocinas pró-inflamatórias e outros mediadores inflamatórios como o TNF- α , interleucina 6, inibidor do ativador do plasminogênio angiotensinogênio, resistina, proteína C-reativa e eicosanóides com níveis séricos elevados (GOMES et al., 2010). Por isso, a resposta inflamatória mesmo sendo um processo essencial para o organismo, quando se torna crônica está envolvida em diferentes doenças, como artrite reumatoide, obesidade, aterosclerose, Alzheimer e psoríase (SILVEIRA; NETO; FERREIRA, 2017; LIMA et al., 2007).

Tabela 1: Características dos processos inflamatórios agudo e crônico.

	Inflamação aguda	Inflamação crônica
Agente causal	Patógenos orgânicos, radiação ionizante, agentes químicos, trauma mecânico	Persistência do estímulo inflamatório inicial, autoimunidade
Células envolvidas	Neutrófilos, monócitos, macrófagos, mastócitos	Macrófagos, linfócitos, fibroblastos
Mediadores primários	Aminas vasoativas, eicosanóides, quimiocinas, espécies reativas de oxigênio	IFN- γ , citocinas. Fatores de crescimento, enzimas hidrolíticas
Início	Imediato	Tardio
Duração	Poucos dias	Meses ou anos
Evolução	Cicatrização com restituição <i>ad integrum</i> , formação de abscesso ou cronificação	Destruição tecidual e fibrose

Devido a diversas doenças que apresentam desordens inflamatórias, a busca por novos compostos anti-inflamatórios se torna essencial. Terapias anti-inflamatórias tem como objetivo inibir um ou mais eventos que medeiam o processo inflamatório, como diminuir ou neutralizar o nível de mediadores pró-inflamatórios (histamina, bradicinina, serotonina, entre outros), ou inibir o recrutamento e a ativação de leucócitos. As terapias incluem anti-inflamatórios AINE, anticorpos ou inibidores que bloqueiam citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α , e a interleucina 1 (ALESSANDRI et al., 2013). Por isso, se torna interessante a busca não apenas por novos princípios ativos com atividade anti-inflamatória, mas também, o desenvolvimento de sistemas eficientes que transportem tais princípios à biofase.

2.3 Microemulsão

2.3.1 Conceito e classificação

Ao se realizar testes com determinado agente terapêutico, todos os resultados esperados dificilmente são alcançados. Isso ocorre devido a diferentes fatores inerentes ao organismo, a forma farmacêutica e ao fármaco. Entre o local de administração e o tecido alvo existe uma série de barreiras biológicas que impedem o transporte pelo corpo, degradam e eliminam o fármaco do organismo diminuindo assim sua biodisponibilidade. Além disso, o corpo está sujeito aos efeitos adversos produzidos pelo fármaco. Por estes problemas, torna-se interessante a busca por formulações que visem aumentar a segurança no uso de fármacos, minimizando seus efeitos colaterais e aumentando sua eficácia. Os novos sistemas de liberação de fármacos, como as nanopartículas, nanoemulsões e microemulsões (ME) representam um campo promissor na busca desses veículos (CAVALCANTE, 2015; FIGUEIREDO et al., 2013; SILVA et al., 2010).

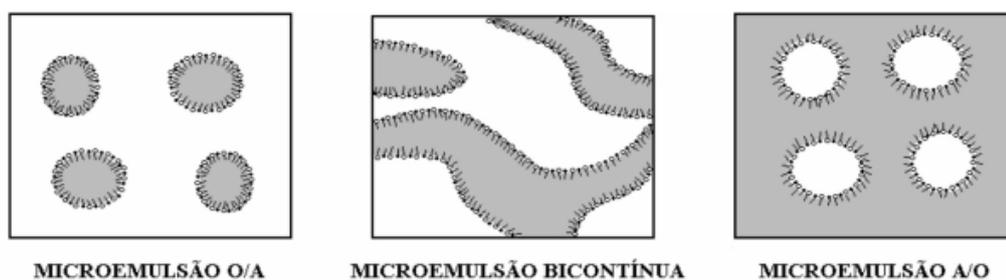
Microemulsão pode ser definida como um sistema termodinamicamente estável e isotropicamente translúcido, formado pela mistura de dois líquidos imiscíveis, normalmente água e óleo, estabilizados por um filme interfacial de tensoativos, localizados na interface óleo/água. Geralmente são formadas pela combinação de três a cinco componentes: água, óleo, tensoativo, cotensoativo e eletrólito (DAMASCENO et al., 2011). As proporções de cada componente

influenciam o sistema de diferentes formas. Por exemplo, o tensoativo diminui a tensão interfacial entre água/óleo, logo, quanto maior a concentração de tensoativos adicionada ao sistema, menor será o tamanho de gotícula (PESTANA et al., 2008).

Existem diversas diferenças entre as ME e as emulsões. As ME são sistemas termodinamicamente estáveis, com uma tensão interfacial muito baixa devido à alta concentração de tensoativos, possuem tamanho de gotículas entre 10 e 300 nm e por isso são transparentes e translúcidas (DAMASCENO et al., 2011). As emulsões são sistemas termodinamicamente instáveis, com alta tensão superficial e baixa quantidade de tensoativos, o tamanho de suas gotículas varia entre 1 e 10 μm , possuem aparência turva ou leitosa (OLIVEIRA et al., 2004).

De acordo com a estrutura interna formada pela mistura dos seus componentes, as ME podem ser classificadas em três tipos (Figura 3). Sistemas em que a fase aquosa está no interior de reduzidas gotículas de água envoltas por moléculas de tensoativos imersas por um meio externo contínuo de óleo, são classificadas como do tipo água em óleo (A/O). Se ocorrer o contrário, e a fase interna do sistema for o óleo, e a externa a água, o sistema será classificado como óleo em água (O/A). Se o sistema desenvolvido não formar gotículas, mas canais em que as proporções de água e óleo são próximas, a estrutura será classificada como do tipo bicontínua, tais sistemas geralmente se apresentam mais viscosos, que é uma característica interessante para sistemas desenvolvidos para aplicação tópica (DAMASCENO et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2004).

Figura 3- Diferentes tipos de microemulsões de acordo com sua estrutura interna.



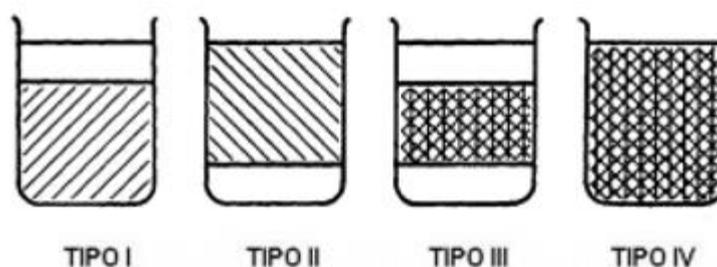
Fonte: DAMASCENO et al., 2011.

Winsor (1948) criou um método de classificar as ME a partir da natureza e número de fases líquidas nela presentes, formadas pelo excesso de óleo e/ou água. Os sistemas podem ser classificados em quatro tipos: Winsor I, II, III e IV (Figura 4). Os sistemas tipo Winsor I e II se apresentam bifásicos, no entanto, o sistema I

ocorre quando uma porção da fase oleosa se encontra na parte superior do sistema homogêneo, o sistema tipo II ocorre quando existe excesso de água na porção inferior do sistema. No tipo III, o sistema apresenta-se trifásico, com excesso de água na porção inferior e de óleo na porção superior. O tipo IV ocorre quando o sistema se apresenta completamente homogêneo e monofásico.

As MEs apresentam diversas vantagens como sistema carreador: aumentam o potencial de absorção devido à grande concentração de tensoativo, aumento da solubilização e dissolução de fármacos lipofílicos, possuem alta estabilidade, proteção dos compostos ativos contra a degradação, promovem liberação controlada e sustentada e por possuir elevada superfície de contato, facilitam o transporte transdérmico. Utilizadas para a incorporação de diferentes classes de fármacos, como AINEs, antineoplásicos, imunossupressores, antimicrobianos, anestésicos, entre outros. As MEs podem ser aplicadas por via oral, ocular, tópica, dérmica, transdérmica, parenteral, pulmonar, vaginal, retal e nasal (DAMASCENO et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2004). Por essa versatilidade, são encontradas diferentes patentes de microemulsões em diferentes regiões do planeta, sendo os maiores depositários de pedidos de patentes os países asiáticos (FIGUEIREDO et al., 2013).

Figura 4 – Sistemas formados de acordo com a classificação de Winsor.



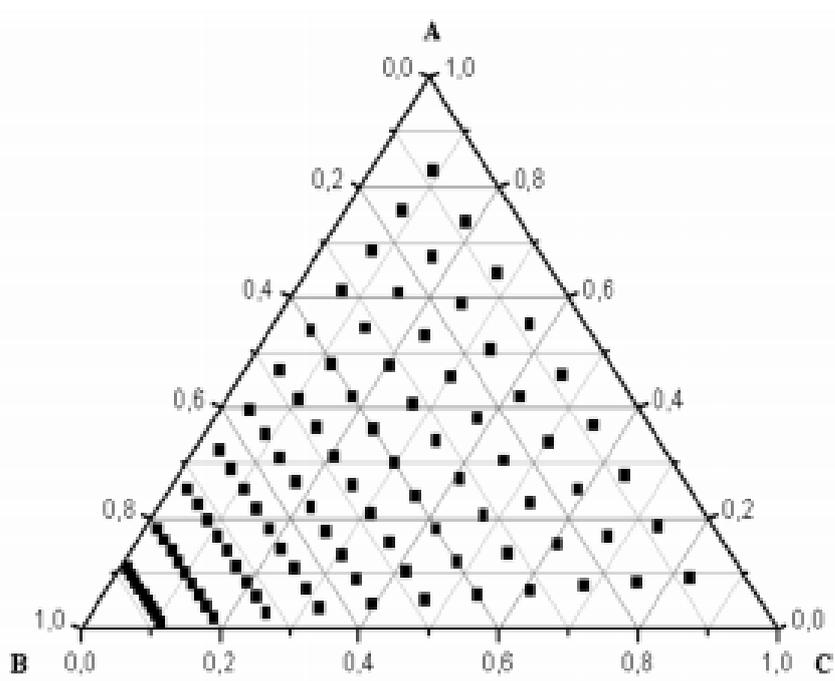
Fonte: Winsor, 1948.

A forma mais comum de desenvolver os sistemas microemulsionados, ocorre através do diagrama de fases pseudoternário (DFPT). Com esta ferramenta, é possível descrever em quais condições experimentais será possível obter sistemas como: emulsões líquidas opacas ou géis opacos, sistema com separação de fases e sistemas microemulsionados, caracterizados por serem translúcidos ou opticamente transparentes. Também é possível observar as regiões limites de transição entre esses sistemas. Os DFPT são obtidos pelos métodos de titulação ou preparação de

um grande número de amostras de diferentes composições. São geralmente construídos em duas dimensões (SCHMIDTTHS et al., 2009).

Como representado na Figura 5, o DFPT possui três vértices, um representa a fase aquosa do sistema, outro a fase oleosa e o último a mistura do tensoativo mais o cotensoativo. As graduações laterais representam a porcentagem de cada componente, e qualquer ponto dentro do diagrama a mistura dos componentes dos três vértices em suas proporções precisas. Além disso, o DFPT permite que o pesquisador escolha a região com viscosidade adequada para a incorporação do composto de interesse (fármacos, extratos e óleos vegetais, entre outros) (; PESTANA et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2004). Por exemplo, uma região com maior viscosidade para aplicação pela via tópica.

Figura 5 - Diagrama de fases pseudoternário.



Fonte: DAMASCENO et al., 2011

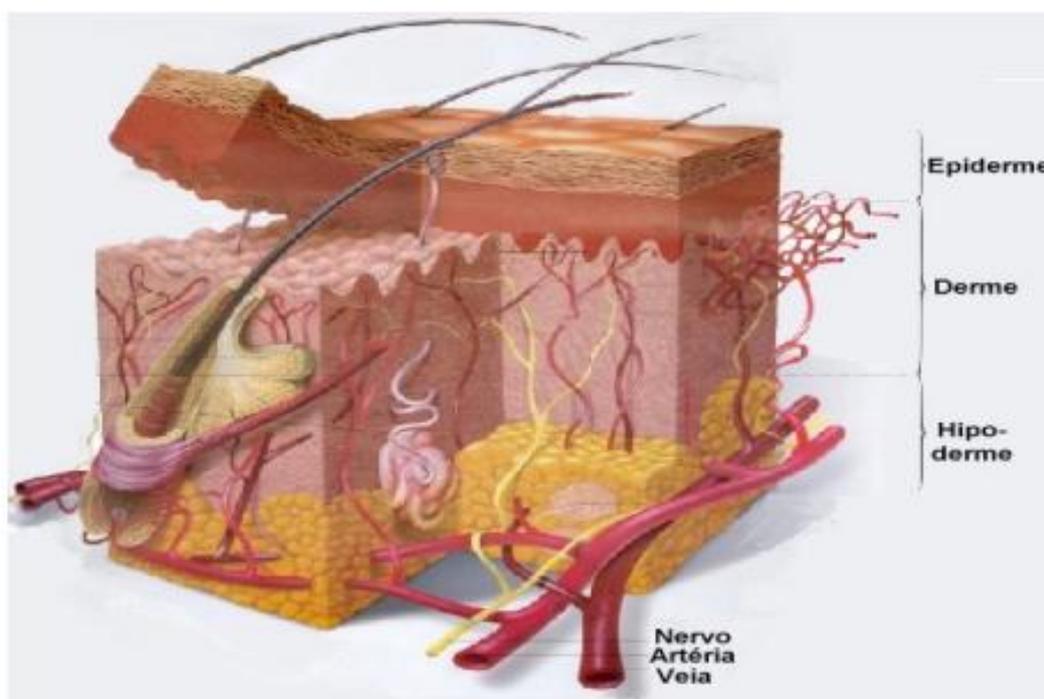
2.3.2 Microemulsão para uso tópico

A via tópica apresenta algumas vantagens para administração de medicamentos, como não sofrer metabolismo de primeira passagem, que ocorre com os medicamentos administrados por via oral, não tendo sua biodisponibilidade reduzida, também não expõe o trato gastrointestinal do indivíduo aos efeitos

potencialmente tóxicos dos compostos ativos, diminuindo seus efeitos adversos (MARTINS; VEIGA 2002).

A pele é composta por três camadas, a epiderme, derme e a hipoderme (Figura 6). A camada mais superficial da epiderme, denominada extrato córneo, é a principal barreira para a permeação de compostos por esta via. Por isso, se torna importante o desenvolvimento de formulações que contenham características físico-químicas que permitam a permeação no extrato córneo de forma eficiente. Comparada à formulações convencionais, MEs apresentam boa permeação no extrato córneo, considerada um veículo eficiente para uso por via tópica, agindo como promotor da permeação e direcionamento eficiente de fármacos através da pele (SILVA et al., 2010b).

Figura 6 – As camadas da pele.



Fonte- Silva et al., 2010

Por tanto, o estudo e desenvolvimento de MEs para uso tópico tonou-se um campo promissor na pesquisa de novos sistemas de liberação de fármacos, pois, pode ser utilizada em diferentes aplicações terapêuticas, como veículo para agentes com atividade antimicrobiana, antineoplásica, cicatrizante, anti-inflamatória, entre outros (CAVALCANTI., 2015)

. 3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade anti-inflamatória de sistemas microemulsionados contendo OR de *Copaifera multijuga* administrados pela via tópica.

3.2 Objetivos específicos

- Desenvolver um diagrama de fases pseudoternário para a obtenção da região de formação de sistemas microemulsionados bicontínuos para uso tópico;
- Selecionar a região do diagrama em que se formaram sistemas microemulsionados bicontínuos para a incorporação do OR;
- Caracterizar físico-quimicamente as formulações obtidas, avaliando o aspecto macroscópico, pH e a condutividade elétrica dos sistemas;
- Avaliar o potencial anti-inflamatório dos sistemas microemulsionados com o OR incorporado através do teste de edema de pata induzido por carragenina em camundongos *Swiss*.

4 METODOLOGIA

4.1 Material

- Óleo de copaíba: O óleo de copaíba foi extraído diretamente do tronco de árvore da espécie *Copaifera multijuga* Hayne na Reserva Ducke do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA).
- Polietilenoglicol (15) - hidroxiestearato (Kolliphor[®] HS15 Sigma- aldrich[®], Alemanha);
- Monoestearato de Sorbitano 80 (Span 80[®], Sigma-aldrich, Alemanha);
- Miristato de isopropila (All Chemistry[®], Brasil);
- Água deionizada ultrapura Milli-Q (Millipore[®], Alemanha);
- Água deionizada (GEHAKA[®], Brasil).

4.2 Seleção dos componentes das formulações

Os componentes utilizados para o desenvolvimento das formulações foram escolhidos com base na literatura, em que se optou por componentes com boa estabilidade oxidativa, que não irritassem a pele e possuíssem utilização conhecida em sistemas para uso tópico. Em seguida foi determinado o Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo (EHL) do sistema.

Para o desenvolvimento de sistemas nanaoestruturados é importante a determinação do EHL, que é um parâmetro para a formulação de sistemas nanodispersos (REIS, 2017). O valor do EHL foi determinado a partir da mistura de tensoativos empregados para o desenvolvimento da formulação, utilizando a Equação:

$$\text{EHL mistura} = \frac{(\text{EHLA} \times \% \text{ A}) + (\text{EHLB} \times \% \text{ B})}{100}$$

Sendo:

EHLA = EHL do tensoativo A;

EHLB= EHL do tensoativos B;

% A = Porcentagem do tensoativo A;

% B=Porcentagem do tenso ativo B;

Considerando o valor do EHL para Kolliphor[®] HS15 como sendo 13.03 e do Span[®] 80 o valor de 4,3.

4.3 Diagrama de fases pseudoternário (DFPT)

O DFPT foi obtido a partir da mistura dos tensoativos (Kolliphor[®] HS 15 e Span[®] 80) na proporção 9:1. A mistura de tensoativos foi adicionada a fase oleosa (miristato de isopropila (MIP) nas proporções de 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2 e 9:1. Em seguida, foram feitas titulações de água deionizada em proporções previamente estabelecidas ao sistema. Após cada adição de água a mistura era homogeneizada com 3 ciclos de agitação no sonicador ultrassônico (Modelo USC-1800, Unique[®], Brasil) durante um minuto, seguido de um minuto na lavadora ultrassônica (Modelo USC -5000, Unique[®], Brasil) para a retirada de possíveis bolhas do sistema. Os ensaios foram realizados à temperatura ambiente ($25 \pm 0,5$ °C).

As modificações que ocorreram ao sistema após a adição de cada alíquota de água eram observadas visualmente e classificadas em: Emulsão líquida opaca (ELO), emulsão líquida leitosa (ELL), sistema semí-sólido opaco (SSO), microemulsão (ME), nanoemulsão (NE) e microemulsão bicontínua (MEB). Mediante as proporções dos componentes da formulação e as alterações observadas o DFPT foi desenvolvido através do software Origin[®] 8.

4.4 Seleção da formulação e incorporação do óleo de copaíba

Após a construção do DFPT a região para a incorporação do OR de *C. multijuga* e realização dos testes de caracterização foi aquela que não apresentou separação de fases, sem turbidez, do tipo bicontínua e opticamente transparente. O OR foi incorporado ao sistema nas proporções de 2,89% e 14,49% da fase oleosa o que corresponde a 1% e 5% da formulação, respectivamente.

4.5 Caracterização físico-química

4.5.1 Aspecto macroscópico

Para a análise macroscópica as formulações sem o OR e com o OR incorporada a 1 e 5% foram analisadas através da observação visual. Diferentes aspectos como: coloração, homogeneidade, ocorrência de separação de fases e a presença de precipitados foram avaliados após um período de 48 horas. As

amostras foram armazenadas em frascos de vidro a temperatura ambiente ($25 \pm 0,5$ °C).

4.5.2 pH

O pH das formulações foi avaliado através de pHmetro digital (Modelo mPA 210, Tecnopon[®], Brasil) com eletrodo de vidro e sensor de temperatura, que foi calibrado previamente com soluções tampão pH 4,0 e 7,0 a uma temperatura de $25 \pm 0,5$ °C. As determinações dos valores de pH foram realizadas em triplicata com introdução do eletrodo diretamente no interior da formulação.

4.5.3 Condutividade elétrica

A condutividade das microemulsões contendo 1 e 5% do OR, bem como o próprio óleo foram avaliadas através de condutivímetro digital (Modelo mCA 150, Ms Tecnopon[®], Brasil), calibrado com uma solução de calibração apresentando condutância específica de $1413 \mu\text{S cm}^{-1}$, à temperatura de $25 \pm 0,5$ °C.

4.6 Ensaio farmacológico

4.6.1 Animais

Foram utilizados camundongos *Swiss* machos (25-35g) provenientes do Biotério da Faculdade de Ciências Médicas de Campina Grande/PB (Acordo de Mútua Cooperação - Edital de Chamamento Público 001/2013 UEPB/PROAD-CONV). Estes animais foram mantidos com temperatura (22 ± 1 °C) e umidade (60-80%) controladas, ciclo claro/escuro de 12 horas e com água e ração *ad libitum*.

Os experimentos foram conduzidos de acordo com as orientações para os cuidados com animais de laboratório e normas e considerações éticas aprovadas pelo Comitê de Ética no uso de animais da Faculdade de Ciências Médicas de Campina Grande/PB (NÚMERO DO PROJETO: 0039/18122013; CIAEP/CONCEA N°: 01.001.2012) (Anexo A).

4.6.2 Indução do edema de pata

O edema de pata em camundongos (WINTER; RISLEY; NUSS, 1962; LEVY, 1969) foi induzido pela injeção subcutânea de 20 μL de carragenina (Sigma-Aldrich[®], St. Louis, MO, USA, 1% p/v em salina estéril 0,9 %) na região plantar da pata

posterior direita (NI et al., 2003; KIM et al., 2014). Os tratamentos foram aplicados topicamente 30 minutos antes indução do edema (KHULLAR et al., 2012), massageando-se o local com 50 movimentos.

4.6.3 Grupos e tratamentos

Sete grupos, contendo 6 animais cada foram utilizados neste estudo, conforme descrição abaixo:

Grupo 1: Microemulsão sem OR e salina (MB + SAL): controle negativo: animais que receberam a aplicação tópica de 300 mg de microemulsão sem OR (Microemulsão branca MB) seguida pela injeção intraplantar de 20 µL de salina na pata posterior direita;

Grupo 2: Microemulsão sem OR e carragenina (MB + CAR): animais que receberam a aplicação tópica de 300 mg de microemulsão sem OR (MB) seguida pela injeção intraplantar de 20 µL de carragenina 1% na pata posterior direita;

Grupo 3: Dexametasona e carragenina (DEXA + CAR): controle positivo: animais que receberam a aplicação tópica de 300 mg de creme de acetato de dexametasona 10mg/g seguida pela injeção intraplantar de 20 µL de carragenina 1% na pata posterior direita;

Grupo 4: Diclofenaco e carragenina (DICLOF + CAR): controle positivo: animais que receberam a aplicação tópica de 300 mg de gel creme de diclofenaco dietilamônio 10mg/g seguida pela injeção intraplantar de 20 µL de carragenina 1% na pata posterior direita;

Grupo 5: Microemulsão 1% e carragenina (M1 + CAR): animais que receberam a aplicação tópica de 300 mg de microemulsão 1% de OR seguida pela injeção intraplantar de 20 µL de carragenina 1% na pata posterior direita;

Grupo 6: Microemulsão 5% e carragenina (M5 + CAR): animais que receberam a aplicação tópica de 300 mg de microemulsão 5% de OR seguida pela injeção intraplantar de 20 µL de carragenina 1% na pata posterior direita;

Grupo 7: Óleo de copaíba e carragenina (COPAIBA + CAR): animais que receberam a aplicação tópica de 300 mg de óleo de copaíba *in natura* seguida pela injeção intraplantar de 20 µL de carragenina 1% na pata posterior direita.

Ao final do experimento (depois da última aferição da espessura da pata, 4h após a injeção intraplantar de carragenina), todos os animais foram eutanasiados

através de anestesia inalatória profunda (halotano 3%) seguida de deslocamento cervical (CFMV, 2012).

4.6.4 Espessura da pata

A espessura dorso-plantar da pata posterior direita foi mensurada através de um paquímetro (digital caliber, 0-150 mm, Messen[®]). Previamente à administração de carragenina ou salina foi feita a leitura inicial da espessura da pata direita em todos os animais (medida basal). As medidas da espessura foram novamente aferidas, pelo mesmo experimentador, 1, 2, 3 e 4 horas após a injeção intraplantar.

O tamanho do edema (Δ edema) foi calculado subtraindo-se a medida da espessura dorso-plantar da pata direita nos diversos tempos após a injeção da carragenina ou salina (1, 2, 3 ou 4h) da medida basal (KIM et al., 2013; LIAO et al., 2013; MAIOLI et al., 2015; MIZOKAMI et al., 2016). A habilidade dos tratamentos em inibir a reação inflamatória foi expressa como a percentagem de inibição da inflamação obtida através da fórmula abaixo (OJHA et al., 2014; CHEN et al., 2016).

$$\text{Inibição da inflamação (\%)} = \frac{1 - \text{Média do tamanho do edema no grupo tratado}}{\text{Média do tamanho do edema no grupo controle negativo}} \times 100$$

4.6.5 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm EPM. As diferenças entre os grupos foram avaliadas através da ANOVA de uma via seguida pelo teste de *Newman Keuls* e consideradas significativas quando $p < 0,05$. As análises estáticas e gráficos foram feitos utilizando-se o software GraphPad Prism[®] 6.1.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Seleção dos componentes das formulações

Para a formação de sistemas microemulsionados um importante fator é a escolha dos componentes utilizados no seu desenvolvimento. Para MEs de uso tópico, a escolha de tensoativos e da fase oleosa que não provoquem irritação na pele e auxiliem na permeação é uma etapa fundamental (CAVALCANTI, 2015).

Na escolha da fase oleosa algumas características do componente devem ser levadas em consideração, como: ausência de toxicidade, de irritabilidade e alta estabilidade físico-química. A fase oleosa do sistema, MIP, tem sido utilizado em diferentes estudos com MEs, podendo ser empregado para a formulação de sistemas com diferentes estruturas internas (A/O, O/A e bicontínuas) (MONTEIRO, 2011).

Para MEs destinadas ao uso tópico, os tensoativos não iônicos são os mais utilizados, por possuírem menor toxicidade comparados ao tensoativos iônicos, capacidade de manter seu desempenho numa ampla faixa de pH e possuir boa compatibilidade cutânea (BORGES, 2011). Devido a isso, os tensoativos selecionados foram o Kolliphor[®] HS15 e o Span[®] 80.

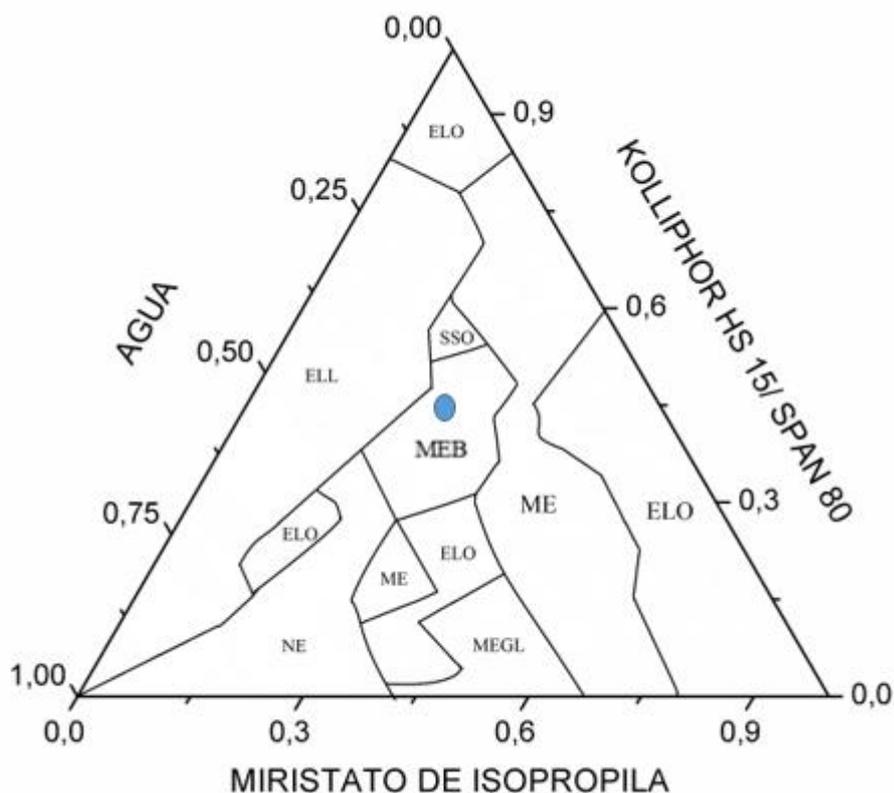
Após a seleção dos componentes o EHL, que representa a fração relativa entre a porção hidrofílica em relação à porção hidrofóbica de cada componente foi calculada. (GUIMARÃES, 2013). O Miristato de Isopropila possui EHL de 11,5, deste modo, para a construção do diagrama os tensoativos teriam que possuir a soma dos seus EHL's o mais próximo do EHL do óleo, favorecendo a formação de sistemas micromulsionados mais estáveis. Considerando o valor do EHL do tensoativo Kolliphor HS15 como sendo 13,03 e o do Span 80 como sendo 4,3, a proporção de 9:1 foi escolhida para obtenção do diagrama, pois nesta proporção é possível obter formulações com valor de EHL igual a 12,02.

5.2 Diagrama de fases pseudoternário

A DFPT demonstrou-se uma ferramenta útil para identificação das proporções dos componentes para a formação de sistemas microemulsionados. A partir da sua construção os componentes podem ser escolhidos de forma previa, sendo favoravelmente econômico (BERA et al., 2014). A Figura 7 representa o DFPT obtido

a partir da mistura dos componentes: MIP (fase oleosa), água destilada (fase aquosa) e Kolliphor® HS 15 e Span® 80 (tensoativos). É possível observar os diferentes tipos de sistemas formados a partir da mistura em diferentes proporções desses componentes. A região escolhida para incorporação do OR (destacado no diagrama) foi a que se apresentou transparente, translucido e com aspecto de um sistema bicontínuo.

Figura 7 - Sistemas obtidos no diagrama de fases pseudoternário.



Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: Diagrama de fases pseudoternário obtido a partir da mistura de Kolliphor® HS15 e Span® 80, miristato de isopropila e água destilada. Emulsão líquida opaca (ELO), emulsão líquida leitosa (ELL), sistema semi-sólido opaco (SSO), microemulsão (ME), nanoemulsão (NE) e microemulsão bicontínua (MEB).

5.3 Seleção da formulação

A Tabela 2 demonstra a proporção dos componentes utilizados para a formação das ME. O OR foi incorporado ao sistema na proporção de 2,89% e 14,49% na fase oleosa, que corresponde respectivamente a 1% e 5% da formulação.

Tabela 2 – Composição da formulação selecionada 1% e 5%, respectivamente

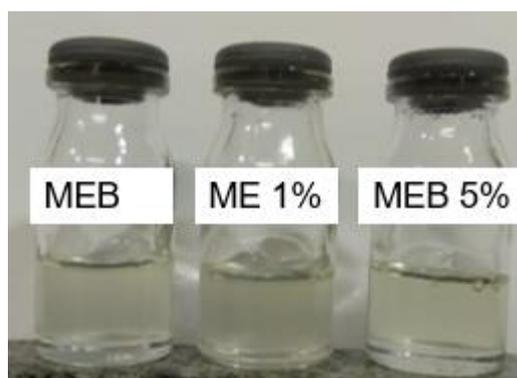
Componentes	Função	Porcentagem
FORMULAÇÃO A 1%		
Miristato de isopropila	Fase oleosa	33,5
Kolliphor [®] HS 15 + Span [®] 80	Tensoativos	34,5%
Água destilada	Fase aquosa	31,0%
Óleo de copaíba	Princípio ativo	1%
FORMULAÇÃO A 5%		
Miristato de isopropila	Fase oleosa	29,5%
Kolliphor [®] HS 15 + Span [®] 80	Tensoativos	34,5%
Água destilada	Fase aquosa	31,0%
Óleo de copaíba	Princípio ativo	5%

Fonte: Dados da pesquisa

5.4 Aspecto macroscópico

A análise macroscópica foi realizada após 48 horas do preparo das MEs (FIGURA 8). Esta análise permite verificar se os sistemas possuem características correspondentes a uma ME verdadeira, como: limpidez, ausência de material precipitado, separação de fases, homogeneidade, transparência e estabilidade termodinâmica (SILVEIRA, 2009).

Figura 8 - Aspecto macroscópico das formulações após 48 horas



Fonte: dados da pesquisa

Os sistemas apresentaram características organolépticas satisfatórias, com a forma de um gel límpido, brilhante, homogêneo, transparente, sem separação de fases ou turbidez. As características organolépticas encontradas nos sistemas após o armazenamento são semelhantes aos sistemas quando recém formulados, indicando uma boa estabilidade.

5.5 pH e condutividade elétrica

A Tabela 3 mostra os resultados obtidos para a condutividade elétrica e pH das formulações e do óleo *in natura*. Segundo Silva e colaboradores (2009) o pH de formulações para aplicações cutâneas deve ser entre 5,5 e 8,0. Como demonstrado o pH do óleo é de $4,32 \pm 0,07$ e dessa forma sua aplicação diretamente na pele torna-se incompatível. No entanto, ao ser incorporado aos sistemas microemulsionados torna-se viável sua aplicação por via tópica, já que tanto a ME a 5% ($7,34 \pm 0,4$) quanto a ME de 1% ($7,34 \pm 0,05$) possuem pH em torno da neutralidade e, dessa forma, tornam-se apropriadas para administração por via tópica. Portanto, as MEs são sistemas interessantes que podem carrear compostos ácidos pela via tópica diminuindo as chances de irritação.

Tabela 3 - características físico-químicas do óleo *in natura* e das microemulsões

Sistemas	pH	Condutividade elétrica ($\mu\text{S}/\text{cm}$)
Óleo	$4,32 \pm 0,07$	$410,8 \pm 0,80$
ME 1%	$7,34 \pm 0,05$	$92,68 \pm 0,55$
ME 5%	$7,32 \pm 0,4$	$124,3 \pm 0,72$

Fonte: Dados da pesquisa

O valor da condutividade elétrica do óleo de $410,8 \pm 0,80 \mu\text{S}/\text{cm}$ é um valor alto quando comparado aos sistemas microemulsionados bicontínuos. A ME a 1% possuiu o valor de condutividade elétrica de $92,68 \pm 0,55$, enquanto a ME de 5% o valor de $124,3 \pm 0,72$. Essa diferença nos valores de condutividade entre as ME pode ser explicada pela diferença de concentração do óleo em cada uma. Como o óleo possui alto valor de condutividade a ME de 5% por possuir maior concentração

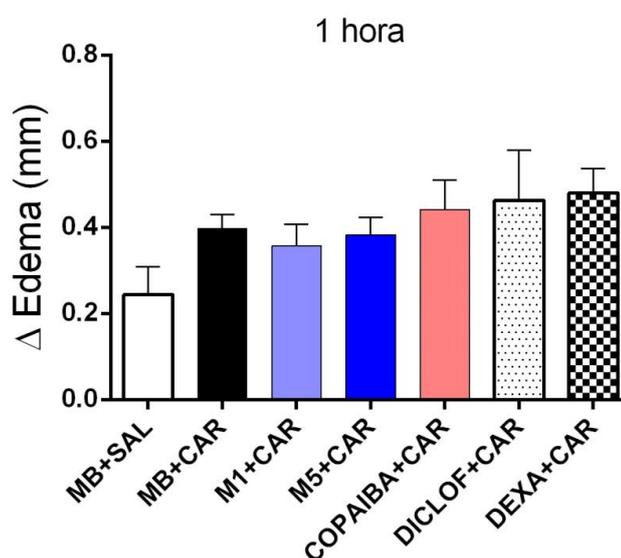
deste, teve um valor maior de condutividade quando comparado a ME de 1%, já que esta possui menor quantidade do óleo.

5.6 Ensaio farmacológico

Com o objetivo de avaliar o potencial anti-inflamatório das MEs desenvolvidas foi realizado o ensaio farmacológico de edema de pata induzido por carragenina em camundongos *Swiss*. A injeção intraplantar de carragenina provoca um processo inflamatório local, que ocorre através do surgimento de inchaço e eritema, que são características do processo inflamatório. O tamanho do edema apresenta um aumento considerado tempo-dependente, onde o máximo do aumento é alcançado após 4 horas da injeção de carragenina (CAVALCANTI, 2015). A formação do edema pode ser dividida em duas fases. A primeira ocorre até duas horas após sua indução devido a liberação de histamina, serotonina e bradicinina. A segunda ocorre entre a segunda e quarta hora, por meio da liberação de prostaglandinas (DI ROSA., 1972).

Após uma hora da indução do edema, a espessura dorso-plantar da pata direita dos animais foram medidas e os resultados estão demonstrados na Figura 8. Observa-se que não houve diferença estatística no tamanho do edema em nenhum grupo. O grupo tratado com microemulsão sem OR (MB) apresentando crescimento do edema de 0,4 mm.

Figura 9 - Efeito anti-inflamatório do OR *in natura* ou incorporado a sistemas microemulsionados após uma hora da indução do edema de pata por carragenina.

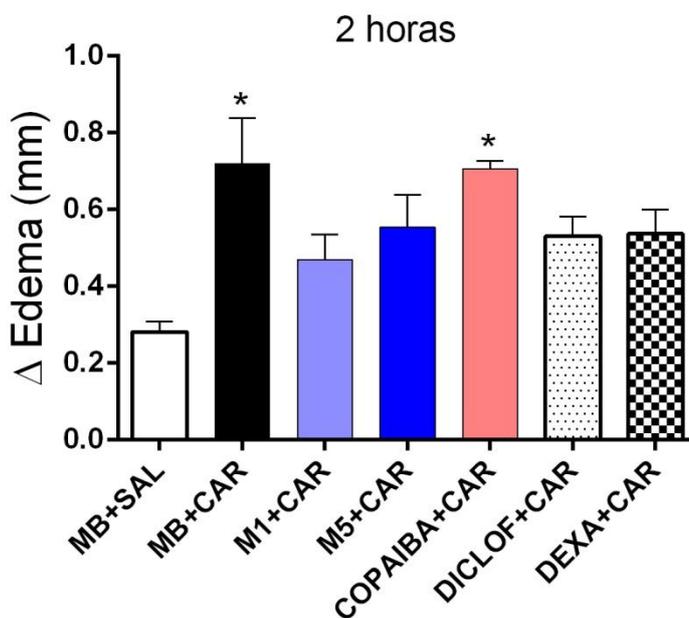


Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: Efeitos da administração tópica prévia de Microemulsão contendo 1% ou 5% de óleo de copaíba ou do óleo de copaíba *in natura* sobre o tamanho do edema de pata avaliado 1 hora após a injeção de 20 μ L carragenina ou salina na pata direita. MB: Microemulsão sem OR; Sal: Solução salina 0,9%; CAR: solução de carragenina 1%; M1: Microemulsão contendo 1% de óleo de copaíba; M5: Microemulsão contendo 5% de óleo de copaíba; COPAÍBA: óleo de copaíba *in natura*; DICLOF: Gel creme de diclofenaco dietilamônio 10 mg/g; DEXA: Creme de acetato de dexametasona 10mg/g.

A Figura 9 demonstra os efeitos dos tratamentos na segunda hora após a indução do edema por carragenina. O tratamento com a MB, 30 minutos antes da injeção de carragenina na pata causou um aumento de 0,7 mm em sua espessura dorso-plantar, comparado com o grupo controle MB+SAL (0,23 mm). O tratamento com o óleo de copaíba *in natura* não causou diferença significativa na redução do edema. No entanto, todos os demais tratamentos (M1+CAR, M5+CAR, DICLOF+CAR e DEXA+CAR), que na primeira hora não apresentaram diferença sobre o tamanho do edema em relação aos controles, após duas horas da indução, apresentaram atividade antiedematogênica. A primeira fase da inflamação ocorre, devido liberação de histamina, serotonina e bradicinina. Os efeitos anti-inflamatórios demonstrados pelos tratamentos podem estar relacionados a uma redução destes mediadores ou ao bloqueio direto dos receptores de cada mediador (GOMES et al., 2010).

Figura 10 - Efeito anti-inflamatório do OR *in natura* ou incorporado a sistemas microemulsionados após duas horas da indução do edema de pata por carragenina.



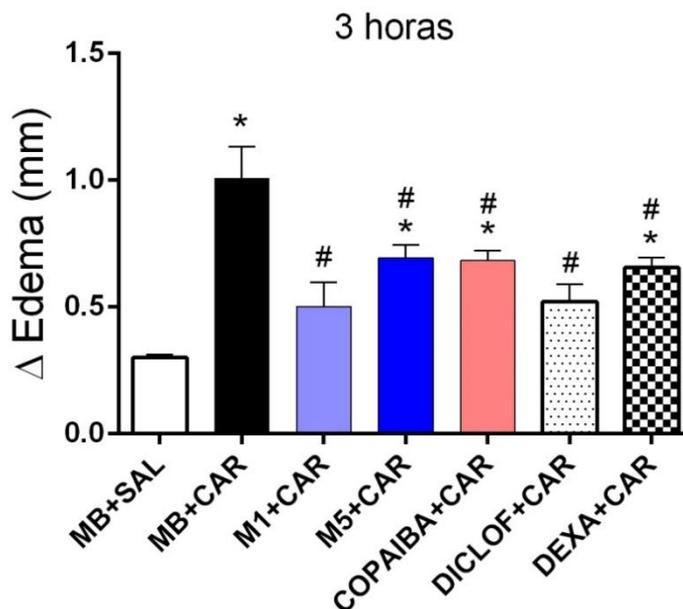
Fonte: Dados da pesquisa

Legenda: Efeitos da administração tópica prévia de Microemulsão contendo 1% ou 5% de óleo de copaíba ou do óleo de copaíba *in natura* sobre o tamanho do edema de pata avaliado 2 horas após a injeção de 20 µL de carragenina ou salina na pata direita. *Diferente do grupo MB+SAL ($p < 0,05$). MB: Microemulsão sem OR; Sal: Solução salina 0,9%; CAR: solução de carragenina 1%; M1: Microemulsão contendo 1% de óleo de copaíba; M5: Microemulsão contendo 5% de óleo de copaíba; COPAÍBA: óleo de copaíba *in natura*; DICLOF: Gel creme de diclofenaco dietilamônio 10 mg/g; DEXA: Creme de acetato de dexametasona 10mg/g.

Os grupos tratados com os controles positivos diclofenato (DICLOF+CAR) e dexametasona (DEXA+CAR) apresentaram um edema de 0,54 e 0,55 mm, o que correspondente a uma inibição do edema de 21 e 22% respectivamente. O tratamento com a M5 (Microemulsão contendo 5% do OR incorporado) causou uma inibição de 20% no edema (0,56mm), e de 34% quando a M1 (microemulsão contendo 1% do OR incorporado) foi usada (0,46 mm), sendo esta a maior inibição observada entre os tratamentos. Esses resultados diferem dos descritos por Veiga e colaboradores (2006), que avaliaram a atividade anti-inflamatória do OR de copaíba através da sua administração por via intraperitoneal, como resultado, se obteve uma pequena inibição do edema após quatro horas da sua indução. As respostas mais rápidas observadas nos grupos tratados com M1 e M5, podem ser justificadas, pela incorporação do óleo em sistemas microemulsionados. Esses sistemas promovem o transporte e liberação de compostos de forma eficiente, que mesmo em concentrações baixas (1 e 5% respectivamente), apresentaram melhor resposta que o óleo *in natura*, indicando o potencial farmacológico dos sistemas microemulsionados comparados as formas farmacêuticas convencionais (DAMASCENO et al., 2011).

A Figura 10 demonstra os resultados obtidos para os diferentes tratamentos após três horas da indução do edema de pata por carragenina. É possível observar que todos os tratamentos inibiram significativamente o aumento do edema. O grupo tratado com MB apresentou um edema de 1 mm. Já o grupo tratado com o óleo de copaíba *in natura*, que ainda não tinha apresentado uma resposta anti-inflamatória, apresentou uma significativa inibição do edema (35%, com um edema de 0,65mm), semelhante aos grupos M5 e DEXA. A alta concentração de terpenos no óleo pode criar poros na pele que proporcionam melhor permeação de moléculas polares, e, dessa forma, o óleo além de apresentar atividade anti-inflamatória, também atua como promotor da permeação (FÖRSTER et al., 2009).

Figura 11 - Efeito anti-inflamatório do OR *in natura* ou incorporado a sistemas microemulsionados após três horas da indução do edema de pata por carragenina.



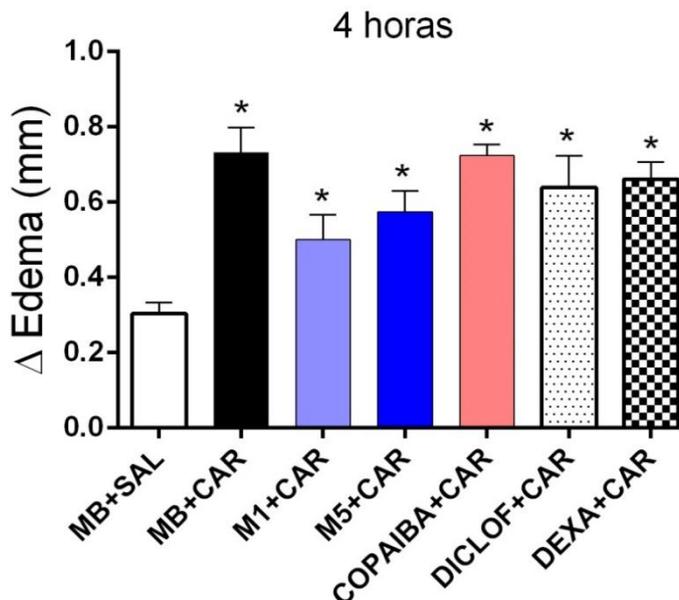
Fonte: Dados da pesquisa

Legenda: Efeitos da administração tópica prévia de Microemulsão contendo 1% ou 5% de óleo de copaíba ou do óleo de copaíba *in natura* sobre o tamanho do edema de pata avaliado 3 horas após a injeção de 20 μ L carragenina ou salina na pata direita. *Diferente do grupo MB+SAL, #Diferente do grupo MB+CAR, ($p < 0,05$). MB: Microemulsão sem OR; Sal: Solução salina 0,9%; CAR: solução de carragenina 1%; M1: Microemulsão contendo 1% de óleo de copaíba; M5: Microemulsão contendo 5% de óleo de copaíba; COPAÍBA: óleo de copaíba *in natura*; DICLOF: Gel creme de diclofenaco dietilamônio 10 mg/g; DEXA: Creme de acetato de dexametasona 10mg/g.

Os grupos M5 e DEXA apresentaram um edema de 0,66 e 0,60 mm (correspondentes a uma inibição do edema de 34 e 40% respectivamente). Os grupos tratados com DICLOF e o M1 apresentaram as melhores taxas de inibição do edema na terceira hora após sua indução. O grupo DICLOF apresentou o tamanho do edema de 0,51 mm (correspondente a uma inibição de 49%), e o grupo M1 continuou a apresentar os melhores resultados com um edema de 0,50 mm (correspondente a uma inibição de 50%).

Após quatro horas da indução do edema, nenhum dos tratamentos apresentou atividade antiedematogênica significativa (Figura 11). Esses resultados corroboram com os encontrados por Neves e colaboradores (2017), onde foram desenvolvidos sistemas microemulsionados contendo OR de copaíba do tipo O/A para aplicação tópica, observou-se que as MEs apresentaram atividade edematogênica até a terceira hora após a indução do edema por carragenina. Dessa forma, MEs contendo OR tornam-se promissores agentes na terapêutica para desordens inflamatórias, especialmente para inflamações agudas.

Figura 12 - Efeito anti-inflamatório do OR *in natura* ou incorporado a sistemas microemulsionados após quatro horas da indução do edema de pata por carragenina.



Fonte: Dados da pesquisa

Legenda: Efeitos da administração tópica prévia de Microemulsão contendo 1% ou 5% de óleo de copaíba ou do óleo de copaíba *in natura* sobre o tamanho do edema de pata avaliado 4 horas após a injeção de 20 μ L carragenina ou salina na pata direita. *Diferente do grupo MB+SAL ($p < 0,05$). MB: Microemulsão sem OR; Sal: Solução salina 0,9%; CAR: solução de carragenina 1%; M1: Microemulsão contendo 1% de óleo de copaíba; M5: Microemulsão contendo 5% de óleo de copaíba; COPAÍBA: óleo de copaíba *in natura*; DICLOF: Gel creme de diclofenaco dietilamônio 10 mg/g; DEXA: Creme de acetato de dexametasona 10mg/g.

Os resultados obtidos demonstram a efetividade das ME como sistema carreador. Em que os grupos tratados com as ME contendo o OR demonstraram possuir atividade de inibição do edema iguais e até mesmo superior aos controles positivos. A M5 apresentou atividade antidematogênica significativamente igual ao dexametasona, e a M1 mostrou atividade superior a dexametasona e igual a o diclofenato. O óleo *in natura* apresentou atividade tardia comparada aos sistemas com o óleo incorporado, e inferior a M1.

6 CONCLUSÃO

- O DFPT demonstrou ser uma ferramenta útil e reprodutível no estudo de sistemas microemulsionados;
- O OR apresentou atividade anti-inflamatória;
- A incorporação do OR em sistema microemulsionado do tipo bicontínuo otimizou os efeitos anti-inflamatórios do óleo. A M5 apresentou resultados estatisticamente iguais ao acetato de dexametasona e a M1 iguais ao diclofenato dietilamônio;
- A utilização de ME como sistema carreador para o OR é uma importante alternativa para viabilização do uso tópico racional deste óleo na terapêutica de processos inflamatórios;
- Contudo, diferentes testes ainda devem ser realizados para avaliar o potencial terapêutico das MEs contendo OR de copaíba para doenças com diferentes quadros clínicos.

REFERÊNCIAS

- ÄNIG. W.; GREEN. P. G. Acute inflammation in the joint: its control by the sympathetic nervous system and by neuroendocrine systems. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 182, p. 42-54, 2014.
- BARREIRO. E. J.; BOLZANI. V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química nova**, p. 679-688, 2009.
- BASILE. A. C.; SERTIÉ. J. A. A.; FREITAS. P. C. D.; ZANINI, A. C. Anti-inflammatory activity of oleoresin from Brazilian Copaifera. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 22, n. 1, p. 101-109, 1988.
- BERA. A.; KUMAR. T.; OJHA. K.; MANDAL. A. Screening of microemulsion properties for application in enhanced oil recovery. **Fuel**, v. 121, p. 198-207, 2014.
- BORGES, V. R. A. B. **Desenvolvimento de novas microemulsões de dapsona para o tratamento tópico da hanseníase**. 2011. 137f. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.
- CAVALCANTI. A. L. M. Sistema microemulsionado contendo pentoxifilina para tratamento de afecções dermatológicas. 2015. Dissertação (Mestre em ciências farmacêuticas) – Universidade Estadual da Paraíba, Campina grande.
- CAVALCANTI. A. L.; REIS. M. Y.; SILVA. G. C.; RAMALHO. Í. M.; GUIMARÃES. G. P.; SILVA. J. A.; SARAIVA. K. L. A.; DAMASCENO, B. P. Microemulsion for topical application of pentoxifylline: in vitro release and in vivo evaluation. **International journal of pharmaceutics**, v. 506, n. 1-2, p. 351-360, 2016.
- CFMV. **Resolução N° 1000/2012: Dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais e dá outras providências**: secondary title. Brasília-DF: Conselho Federal de Medicina Veterinária, 2012.
- CHEN, H.; PU, J.; LIU, D.; YU, W.; SHAO, Y.; YANG, G.; XIANG, Z.; HE, N. Anti-Inflammatory and Antinociceptive Properties of Flavonoids from the Fruits of Black Mulberry (*Morus nigra* L.). **PLoS One**, v. 11, n. 4, p. e0153080, 2016.
- COSTA. R. S. T.; MARTINS. D. Uma revisão bibliográfica das atividades farmacológicas e substâncias isoladas da Carapa procera. **Scientia Amazonia**, v. 6, n. 1, p. 54-60, 2017.
- CRUVINEL. W. D. M.; JÚNIOR. D. M.; ARAÚJO. J. A. P.; CATELAN. T. T. T.; SOUZA. A. W. S. D.; SILVA. N. P. D.; ANDRADE. L. E. C. Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, 2010

DAMASCENO. B. P. G. L.; SILVA. J. A.; OLIVEIRA. E. E.; SILVEIRA. W.; ARAÚJO. I. B.; OLIVEIRA. A. G. D.; Egito. E. Microemulsão: um promissor carreador para moléculas insolúveis. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 32, n. 1, p. 9-18, 2011.

DANTAS. M. M. F.; DE ALMEIDA AMAZONAS. M. C. L. A Experiência do Adoecer: Os Cuidados Paliativos diante da Impossibilidade da Cura. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 50, n. spe, p. 47-53, 2016.

DI ROSA. M. Biological properties of carrageenan. **Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 24, n. 2, p. 89-102, 1972.

DUTRA. R. C.; CAMPOS. M. M.; SANTOS. A. R.; CALIXTO. J. B. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological research**, v. 112, p. 4-29, 2016.

FIGUEIREDO. L. M. F.; ALVES, T. C. A. Uso dos anti-inflamatórios não esteróides no controle da dor aguda: revisão sistemática. **Revista Neurociências**, v. 23, p. 463-67, 2015.

FIGUEIREDO. K. A.; MENDES. R. M. B.; CARVALHO. A. L. M.; FREITAS. R. M. Microemulsões como sistemas de liberação de fármacos para a via transdérmica: uma prospecção tecnológica. **Revista GEINTEC-Gestão, Inovação e Tecnologias**, v. 3, n. 4, p. 036-046, 2013.

FORMARIZ. T. P.; CHIAVACCI. L. A.; SCARPA. M. V.; SILVA-JÚNIOR. A. A.; EGITO. E. S. T.; TERRUGI. C. H.; FRANZINI. C. M.; SARMENTO. V.H.M.; OLIVEIRA. A. G. D. Structure and viscoelastic behavior of pharmaceutical biocompatible anionic microemulsions containing the antitumoral drug compound doxorubicin. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 77, n. 1, p. 47-53, 2010.

FORMARIZ. T. P.; URBAN. M. C. C.; JÚNIOR. A. A. D. S.; GREMIÃO. M. P. D.; OLIVEIRA. A. G. D. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, p. 301-313, 2005.

FÖRSTER. M.; BOLZINGER. M. A.; FESSI. H.; BRIANÇON. S. Topical delivery of cosmetics and drugs. Molecular aspects of percutaneous absorption and delivery. **European Journal of Dermatology**, v. 19, n. 4, p. 309-323, 2009.

GARCIA, R. F.; YAMAGUCHI. M. H.. Óleo de copaíba e suas propriedades medicinais: revisão bibliográfica. **Saúde e Pesquisa**, v. 5, n. 1, 2012.

GOMES, N. M.; DE REZENDE. C. M.; FONTES. S. P.; MATHEUS. M. E.; PINTO. A. C.; FERNANDES. P. D. Characterization of the antinociceptive and anti-inflammatory activities of fractions obtained from *Copaifera multijuga* Hayne. **Journal of ethnopharmacology**, v. 128, n. 1, p. 177-183, 2010.

GOMES. M. N. M.; REZENDE, C. M, FONTES. S. P.; HOVELL. A. M. C.; LANDGRAF. R. G.; MATHEUS. M. E.; PINTO. A. C.; FERNANDES. P. D. Antineoplastic activity of Copaifera multijuga oil and fractions against ascitic and solid Ehrlich tumor. **Journal of ethnopharmacology**, v. 119, n. 1, p. 179-184, 2008.

GUIMARÃES. G. P. **DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROEMULSÃO ANTIFÚNGICA CONTENDO DERIVADO DO TIOFENO**. 2013. 146 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Farmácia, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2013.

JUNIOR. V. F.; PINTO. A. C. O GÊNERO *Copaifera* L. **Química Nova**, v. 25, n. 2, p. 273-286, 2002.

JUNIOR. V. F.; ROSAS. E. C.; CARVALHO. M. V. D.; HENRIQUES. M. D. G. M. D. O.; PINTO. A. C. Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne—A comparative study. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, n. 2, p. 248-254, 2007.

KHULLAR. R.; KUMAR. D.; SETH, N.; SAINI, S. Formulation and evaluation of mefenamic acid emulgel for topical delivery. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 20, n. 1, p. 63-67, 2012.

KIM. H. S.; PARK. J. W.; KWON. O. K.; KIM. J. H.; OH. S. R.; LEE. H. K.; BACH. T. T.; QUANG. B. H.; AHN. K. S. Anti-inflammatory activity of a methanol extract from *Ardisia tinctoria* on mouse macrophages and paw edema. **Molecular Medicine Reports**, v. 9, n. 4, p. 1388-1394, 2014.

LEANDRO. L. M.; VARGAS, F. S.; BARBOSA. P. C. S.; NEVES. J. K. O.; DA SILVA. J. A.; JUNIOR, V. F.V. Chemistry and biological activities of terpenoids from copaiba (*Copaifera* spp.) oleoresins. **Molecules**, v. 17, n. 4, p. 3866-3889, 2012.
LEVY, L. Carrageenan paw edema in the mouse. **Life Sci**, v. 8, n. 11, p. 601-606, 1969.

LIAO, J. C.; TSAI, J. C.; PENG, W. H.; CHIU, Y. J.; SUNG, P. J.; TSUZOKI, M.; KUO, Y. H. Anti-inflammatory activity of N-(3-florophenyl)ethylcaffeamide in mice. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 8, p. 15199-15211, 2013.

LIMA. R. R.; COSTA. A. M. R.; SOUZA. R. D. D.; GOMES-LEAL. W. Inflamação em doenças neurodegenerativas. **Revista Paraense de Medicina**, v. 21, n. 2, p. 29-34, 2007.

LUCCA. L. G.; DE MATOS. S. P.; KREUTZ. T.; TEIXEIRA. H. F.; VEIGA. V. F.; DE ARAÚJO. B. V.; LIMBERGER. R. P.; KOESTER. L. S. Anti-inflammatory Effect from a Hydrogel Containing Nanoemulsified Copaiba oil (*Copaifera multijuga* Hayne). **AAPS PharmSciTech**, p. 1-9, 2017.

MAIOLI, N. A.; ZARPELON, A. C.; MIZOKAMI, S. S.; CALIXTO-CAMPOS, C.; GUAZELLI, C. F. S.; HOHMANN, M. S. N.; PINHO-RIBEIRO, F. A.; CARVALHO, T. T.; MANCHOPE, M. F.; FERRAZ, C. R.; CASAGRANDE, R.; VERRI JR, W. A. The superoxide anion donor, potassium superoxide, induces pain and inflammation in

mice through production of reactive oxygen species and cyclooxygenase-2. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 48, n., p. 321-331, 2015.

MARTINS. M. R. F. M.; VEIGA. F. Promotores de permeação para a liberação transdérmica de fármacos: uma nova aplicação para as ciclodextrinas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 1, p. 33-54, 2002.

MASSON. D. S.; SALVADOR. S. L.; POLIZELLO. A. C. M.; FRADE. M. A. C. Atividade antimicrobiana do óleo-resina de copaíba (*Copaifera langsdorffii*) em bactérias de significância clínica em úlceras cutâneas. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 4 supl I, p. 664-669, 2013.

MENDONÇA. D. E.; ONOFRE. S. B. Antimicrobial activity of the oil-resin produced by copaiba *Copaifera multijuga* Hayne (Leguminosae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2B, p. 577-581, 2009.

MIZOKAMI, S. S.; HOHMANN, M. S.; STAURENGO-FERRARI, L.; CARVALHO, T. T.; ZARPELON, A. C.; POSSEBON, M. I.; DE SOUZA, A. R.; VENEZIANI, R. C.; ARAKAWA, N. S.; CASAGRANDE, R.; VERRI, W. A., JR. Pimaradienoic Acid Inhibits Carrageenan-Induced Inflammatory Leukocyte Recruitment and Edema in Mice: Inhibition of Oxidative Stress, Nitric Oxide and Cytokine Production. **PLoS One**, v. 11, n. 2, p. e0149656, 2016.

MONTEIRO, L. M. **Preparo e Avaliação de Sistemas Microemulsionados biologicamente Ativos de Dapsona**. 2011. 125f. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

MOREIRA. M.; AFONSO. M.; ARAÚJO. P. Anti-inflamatórios não esteróides tópicos no tratamento da dor por osteoartrose do joelho: Uma revisão baseada na evidência. **Revista Portuguesa de Medicina Geral e Familiar**, v. 30, n. 2, p. 102-108, 2014.

NEVES. J. K. O.; APOLINÁRIO. A. C.; SARAIVA. K. L. A.; SILVA. D. T. C.; REIS. M. Y. D. F. A.; DAMASCENO. B. P. G. L.; SILVA. J. A. P. A.; GALVÃO. M.A.M.; SOARES. L.A.L.; JÚNIOR. V. F. V.; CONVERTI. A. Microemulsions containing *Copaifera multijuga* Hayne oil-resin: Challenges to achieve an efficient system for β -caryophyllene delivery. **Industrial Crops and Products**, v. 111, p. 185-192, 2018.

NI. A.; YIN. H.; AGATA. J.; YANG. Z.; CHAO. L.; CHAO. J. Overexpression of kinin B1 receptors induces hypertensive response to des-Arg9-bradykinin and susceptibility to inflammation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 1, p. 219-225, 2003.

NOGUEIRA. E. O.; NOVAES. A. S. M.; SANCHEZ. C. M. S.; ANDRADE, C., DA SILVA, M. F. A. Avaliação do efeito do óleo-resina de copaíba (*Copaifera* sp.) na proliferação celular in vitro. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 49, n. 4, p. 293-300, 2012.

OJHA, D.; MUKHERJEE, H.; MONDAL, S.; JENA, A.; DWIVEDI, V. P.; MONDAL, K. C.; MALHOTRA, B.; SAMANTA, A.; CHATTOPADHYAY, D. Anti-inflammatory activity of *Ocimum sanctum* Roxb, an Indian folk remedy, through inhibition of toll-like receptor 4 signaling pathway. **PLoS One**, v. 9, n. 8, p. e104939, 2014.

OLIVEIRA. A. G. D.; SCARPA. M. V.; CORREA. M. A.; RODRIGUES CERA. L. F.; FORMARIZ. T. P. Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. **Química nova**, p. 131-138, 2004.

PESTANA. K. C.; FORMARIZ. T. P.; FRANZINI. C. M.; SARMENTO. V. H. V.; CHIAVACCI. L. A.; SCARPA. M. V.; EGITO. E. S.T.; OLIVEIRA. A. G. D. Oil-in-water lecithin-based microemulsions as a potential delivery system for amphotericin B. **Colloids and surfaces B: Biointerfaces**, v. 66, n. 2, p. 253-259, 2008.

PIERI. F. A.; MUSSI. M. C.; MOREIRA. M. A. S. Óleo de copaíba (*Copaifera* sp.): histórico, extração, aplicações industriais e propriedades medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 4, p. 465-472, 2009.

PINHEIRO. J. G. D. O.; TAVARES. E. D. A.; SILVA. S. S. D.; SILVA, J. F.; CARVALHO. Y. M. B. G. D.; FERREIRA, M. R. A.; AZEVEDO. E. P. D.; ARAÚJO. A. A. S.; BARSOSA. E. G.; PEDROSA. M. F. F.; SOARES. L. A. L.; JUNIOR. V. F. V.; LIMA. Á. A. N.; Inclusion Complexes of Copaiba (*Copaifera multijuga* Hayne) Oleoresin and Cyclodextrins: Physicochemical Characterization and Anti-Inflammatory Activity. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 11, p. 2388, 2017.

RIBEIRO. R. V.; BIESKI. I. G. C.; BALOGUN. S. O.; MARTINS, D. T. O. Ethnobotanical study of medicinal plants used by Ribeirinhos in the North Araguaia microregion, Mato Grosso, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 205, p. 69-102, 2017.

SACHETTI, Camile Giaretta. **Avaliação toxicológica do óleo-resina de copaíba em ratos: estudos de toxicidade aguda, neurotoxicidade e embriofetotoxicidade**. 2010. 91 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências de Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2010.

SANTIAGO. K. B.; CONTI. B. J.; ANDRADE. B. F. M. T.; SILVA, J. J. M., ROGEZ. H. L. G.; CREVELIN. E. J.; MORAES. L. A. B.; VENEZIANI. R.; AMBRÓSIO. S. R.; BASTOS. J. K.; SFORCIN. J. M Immunomodulatory action of *Copaifera* spp oleoresins on cytokine production by human monocytes. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 70, p. 12-18, 2015.

SCHMIDTS. T.; NOCKER. P.; LAVI. G.; KUHLMANN. J.; CZERMAK. P.; RUNKEL. F. Development of an alternative, time and cost saving method of creating pseudoternary diagrams using the example of a microemulsion. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 340, n. 1-3, p. 187.

SILVA. J. A.; APOLINÁRIO. A. C.; SOUZA. M. S. R.; DAMASCENO. B. P. G. L.; MEDEIROS. A. C. D. Administração cutânea de fármacos: desafios e estratégias para o desenvolvimento de formulações transdérmicas. **Revista de Ciências Farmacêuticas básica e aplicada**, v. 31, n. 3, p. 125-131, 2010b.

SILVA. J. A.; BEDOR. D. C.; DAMASCENO. B. P. L.; OLIVEIRA. A. G.; EGITO. E. S. T.; SANTANA. D. P. Physicochemical characterization and development of a microemulsion system for transdermal use. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 31, n. 1, p. 1-8, 2009.

SILVA. J. D. F.; DA SILVA. Y. P.; PIATNICKIC. C. M.; BÖCKELD. W. J.; MENDONÇA. C. R. MICROEMULSÕES: COMPONENTES, CARACTERÍSTICAS, POTENCIALIDADES EM QUÍMICA DE ALIMENTOS E OUTRAS APLICAÇÕES. **Química Nova**, v. 38, n. 9, p. 1196-1206, 2015.

SILVA. W. G.; CORTESI. N.; FUSARI. P. Copaiba oleoresin: evaluation of the presence of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, n. 3, p. 597-602, 2010a.

SILVEIRA. M. E. B.; NETO. G. P.; FERREIRA. F. R. Perfil epidemiológico e qualidade de vida na psoríase. **Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica**, v. 15, n. 4, p. 246-51, 2017.

SILVEIRA. W. L. L. **Desenvolvimento e caracterização de um sistema microemulsionado contendo anfotericina B para uso oftalmológico**. 2009. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

SOUZA-MOREIRA, T. M.; SALGADO. H. R. N.; PIETRO. R. C. O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, p. 435-440, 2010.

VEIGA. V. F.; ZUNINO. L.; PATITUCCI. M. L.; PINTO. A. C.; CALIXTO. J. B. The inhibition of paw oedema formation caused by the oil of *Copaifera multijuga* Hayne and its fractions. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 58, n. 10, p. 1405-1410, 2006.

VIEGAS JR. C.; BOLZANI. V. D. S.; BARREIRO. E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, p. 326-337, 2006

WAGENER, F. A.; CARELS, C. E.; LUNDEVIG. D. Targeting the redox balance in inflammatory skin conditions. **International journal of molecular sciences**, v. 14, n. 5, p. 9126-9167, 2013.

WINSOR. P. A. Hydrotropy, solubilisation and related emulsification processes. **Transactions of the Faraday Society**, v. 44, p. 376-398, 1948.

WINTER, C. A.; RISLEY, E. A.; NUSS, G. W. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 111, n., p. 544-547, 1962.

**ANEXO A – PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS -
CEUA/CESED – PB**



**CENTRO DE ENSINO SUPERIOR E DESENVOLVIMENTO
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DE CAMPINA GRANDE
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA/CESED**

PARECER

CEUA: n °11
NÚMERO DO PROJETO: 0039/18122013
CIAEP/CONCEA Nº: 01.001.2012
APROVADO EM: 18.12.2013

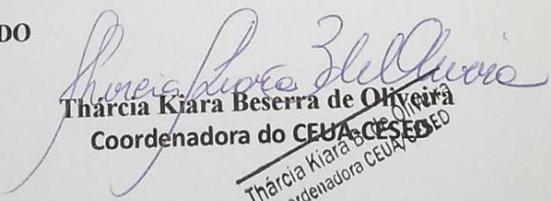
1. Pesquisador Responsável:
Karina Lidiane Alcântara Saraiva

Título do Projeto:
Óleos Vegetais da Flora Brasileira Aplicados a Nanomedicina

3. Objetivo:
Desenvolver microemulsões de óleos vegetais como novos medicamentos fitoterápicos.

4. Considerações:
O projeto apresentado esta bem discriminado e coerente com as normas de utilização de animais. Cumprindo os requisitos da Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, e as demais normas aplicáveis à utilização de animais para o ensino e pesquisa, especialmente as resoluções do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA. O protocolo de pesquisa está devidamente preenchido, com todos os itens solicitados entregue a CEUA/CESED, porém o colegiado sugere que seja feito um grupo controle com animais que recebessem apenas a medicação estudada.

5. Parecer Final:
APROVADO


Thárcia Kiara Beserra de Oliveira
Coordenadora do CEUA/CESED

Av. Senador Argemiro de Figueiredo
CEP 58411-020 | Campina Grande - PB
www.cesed.br | facisa@cesed.br | fcm@cesed.br

