



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

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E
MUTAGÊNICA DE MICROEMULSÃO TÓPICA CONTENDO
ÓLEO DE COPAÍBA**

CAMPINA GRANDE- PB

2014

DAYANNE TOMAZ CASIMIRO DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E
MUTAGÊNICA DE MICROEMULSÃO TÓPICA CONTENDO
ÓLEO DE COPAÍBA**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação
em Farmácia pela Universidade
Estadual da Paraíba, em cumprimento
á exigência para obtenção do grau de
Bacharel em Farmácia.

Orientador: José Alexandro da
Silva

CAMPINA GRANDE- PB

2014

É expressamente proibida 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 da dissertação.

S586a Silva, Dayanne Tomaz Casimiro da.
Avaliação da atividade anti-inflamatória e mutagênica de microemulsão tópica contendo óleo de copaíba [manuscrito] / Dayanne Tomaz Casimiro da Silva. - 2014.
30 p. : il. color.

Digitado.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2014.
"Orientação: Prof. Dr. José Aleksandro da Silva, Departamento de Farmácia".

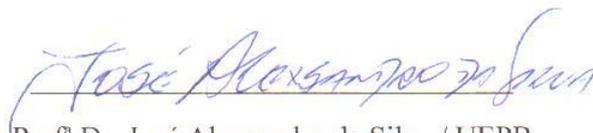
1. Óleos naturais. 2. Óleo de copaíba. 3. Ação anti-inflamatória. 4. Antiedematogênica. 5. Micronúcleo. I. Título.
21. ed. CDD 633.85

DAYANNE TOMAZ CASIMIRO DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E
MUTAGÊNICA DE MICROEMULSÃO TÓPICA CONTENDO
ÓLEO DE COPAÍBA**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação
em Farmácia pela Universidade
Estadual da Paraíba, em cumprimento
à exigência para obtenção do grau de
Bacharel em Farmácia.

Aprovada em 18/07/2014



Prof^o Dr. José Alexandre da Silva / UEPB

Orientador



Prof.^o Me. Geovani Pereira Guimarães / UEPB

Examinador



Prof^o Dr^a Rosemary Sousa Cunha Lima / UEPB

Examinadora

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E MUTAGÊNICA DE MICROEMULSÃO TÓPICA CONTENDO ÓLEO DE COPAÍBA

SILVA, Dayanne Tomaz Casimiro

RESUMO

O presente estudo tem como objetivo avaliar a atividade tópica anti-inflamatória do óleo de copaíba incorporado a uma microemulsão, assim como a sua atividade mutagênica pelo teste de micronúcleos em eritrócitos de camundongo. Os Diagramas de Fases Pseudoternário (DFPT), desta pesquisa, foram obtidos por inspeção visual das misturas dos componentes Labrasol[®] (T)/Plurol Oleique[®] (CO), óleo de copaíba e água para o teste da avaliação da atividade antiedematogênica. Foram utilizados ratos Wistar, *Rattus norvegicus* var. albinus, machos. Foi determinada pela técnica da indução do edema de pata por carragenina 1%. O ensaio de mutagenicidade foi realizado pela técnica de micronúcleo e foi utilizados camundongos da espécie *Mus musculus* (Swiss albino). Foi realizada incisão na região dorsal com o auxílio de um *Punch* e durante 30 dias acrescentados 5µl das microemulsões. A ferramenta do diagrama de fases pseudoternários mostrou-se simples e reprodutível para o preparo de ME contendo o óleo de copaíba. A formulação ME-F6 apresentou atividade aguda superior ao controle positivo (emulgel DDA). Já formulação ME-F2 apresentou efeito mais tardio (a partir da terceira hora), porém menos intenso que o controle positivo e comparável ao óleo puro. Na atividade mutagênica, verificou-se que as amostras ME-F2 e ME-F6 não apresentaram potencial mutagênico, considerada, seguro, quanto ao uso tópico.

PALAVRAS-CHAVE: Óleos naturais. Antiedematogênica. Micronúcleo.

1. INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais para tratamento cura e prevenção de doenças tem sido descrito por muitos povos desde os tempos mais remotos. Devido a esse uso, surgiram interesses comerciais e científicos e, por isso, tornou-se necessária a avaliação da eficácia e segurança dessas plantas (LOURENÇO, et. al., 2009).

Os óleos vegetais naturais apresentam inúmeras vantagens para uso terapêutico, como baixa toxicidade, elevada biodegradabilidade que é a capacidade que algumas substâncias químicas têm de poderem ser usadas como substratos por micro-organismos e são renováveis quanto à disponibilidade em relação aos derivados de petróleo que são finitos (XAVIER JÚNIOR, 2011).

Plantas do Gênero *Copaifera*, conhecido popularmente como copaíba, são árvores da família das Leguminosae-Caesalpinoideae (NOGUEIRA, 2012). O material exsudado destas árvores, tradicionalmente obtidos pela perfuração do tronco é chamado de óleo de copaíba ou oleoresina, um líquido transparente, cuja cor varia do amarelo ao marrom claro (MASSON, et. al., 2013). Com o tempo, observou-se um aumento no interesse por este óleo, principalmente no campo farmacêutico, devido ao seu uso na medicina popular para a cura de várias doenças: amigdalite, úlceras, no trato urinário, feridas, bem como pode ser anti-inflamatório, antisséptico, sedativo e expectorante (SILVA, et. al., 2010). Quimicamente, o óleo-resina de copaíba é uma solução de ácidos diterpênicos, responsável por 55 a 60% do óleo, em um óleo essencial constituído por sesquiterpenos (YAMAGUCHI, 2012). Segundo Pieri et. al. (2009), estes últimos podem ser divididos em sesquiterpenos oxigenados e hidrocarbonetos sesquiterpênicos, onde o principal sesquiterpeno encontrado no óleo-resina da copaíba é o β - cariofileno, que tem comprovada ação anti-inflamatória, antibacteriana, antifúngica e antiedêmica.

É válido ressaltar que substâncias que em princípio podem ser consideradas como terapêuticas também podem causar efeitos indesejados ou tóxicos (PINHO, et. al., 2010). Compostos com atividades biológicas continuam sendo reconhecidos, entretanto, muitos deles ainda não podem ser utilizados na terapêutica devido às suas propriedades tóxicas, carcinogênicas e mutagênicas. Devido a isso, na produção de uma nova forma farmacêutica, os resultados dos testes de genotoxicidade são de grande importância, pois, a maioria das indústrias farmacêuticas delibera o processamento de um novo agente terapêutico com base nos resultados de testes de genotoxicidade *in vitro* e *in vivo* (VARANDA, 2006).

A via de administração transdérmica tem sido reconhecida como uma via altamente potencial para a administração de fármacos (ELSHAFEEY, et al. 2012). Dentre os diversos sistemas utilizados como novos meios de veiculação e liberação de substâncias ativas podem-se destacar as microemulsões. Esses sistemas são dispersões/misturas termodinamicamente estáveis e isotropicamente translúcidos de dois líquidos imiscíveis, usualmente água e óleo, estabilizados por um filme interfacial de tensoativos localizados na interface óleo/água (DAMASCENO et. al., 2011). Além disso, esses sistemas de liberação têm se destacado pelo baixo custo e pela facilidade na preparação das formulações, bem como pela sua estabilidade termodinâmica (GOMES, 2010).

Considerando que os sistemas microemulsionados vêm sendo objeto de vários estudos e fazendo referencia a uma formulação com óleo vegetal, o presente estudo tem como objetivo avaliar a atividade tópica anti-inflamatória do óleo de copaíba incorporada a microemulsão, assim como a sua atividade mutagênica pelo teste de micronúcleos em eritrócitos de camundongo.

2. REFERENCIAL TEORICO

2.1. Óleo de copaíba

A árvore de copaíba pertence à família Leguminosae, subfamília Caesalpinoideae e ao gênero *Copaífera*, sendo comumente encontrada na América Latina e África Ocidental (YAMAGUCHI, 2012). Gênero que apresenta 16 espécies ocorrentes no Brasil das quais apenas quatro ocorrem na região Norte, onde o óleo de copaíba é amplamente comercializado e utilizado na medicina popular (DEUS, et. al. 2011). Vulgarmente são chamadas de copaíba, pau-d'óleo, copaíba-roxa e copaíba-mari-mari. Árvore mede até 36 metros de altura possui copa densa, casca lisa e fruste reto; produz de 2 a 3 kg de sementes. A floração ocorre em janeiro a março e os frutos são coletados em março a agosto. Há mudança foliar em dezembro, com perda parcial das folhas no mês anterior à floração (MENDONÇA, et. al., 2009). Da árvore da copaíba é extraído um óleosina, de cor que varia de amarelo ouro a marrom, dependendo da espécie (PIERI, et. al., 2009).

O óleo de copaíba é constituído de dois grupos de substâncias distintas, solúveis entre si, sendo um constituído de substâncias voláteis, correspondendo a cerca de 90% de massa do óleo resina e outro grupo constituído de substâncias não voláteis, resinosa de cor caramelo que começa a ser decomposta à temperatura próxima de 300°C, e que

corresponde a 10% da massa total do óleo resina (DEUS, et. al. 2011). Através da análise cromatográfica do óleo de copaíba foi verificado que ele é composto por sesquiterpenos e diterpenos (MONTES, et. al., 2009). O principal sesquiterpeno é o beta-cariofileno. Esse é responsável pelo aroma e também pela atividade anti-inflamatória (SILVA, et. al., 2012), testadas tanto *in vitro* quanto *in vivo* (ZIECH, et. al., 2013) assim como ações antibacteriana, antifúngica e antiedêmica, e o beta-bisaboleno, analgésico (YAMAGUCHI, 2012).

Outras indicações etnofarmacológicas mais comuns para o óleo de copaíba são: para as vias urinárias, atuando como antiblenorrágico, no tratamento de cistite, incontinência urinária e sífilis; para as vias respiratórias, como antiasmático, expectorante, no tratamento de bronquite, faringite, hemoptise, pneumonia e sinusite; para as infecções da derme e mucosa, em dermatites, eczemas, psoríases e ferimentos; para úlceras e feridas no útero. Ainda é empregado como analgésico, antidiarréico, cicatrizante, afrodisíaco, antioxidante, antitetânico, anti-herpético, bactericida, anticancerígeno, antitumoral, no tratamento de leishmaniose, reumatismo, hemorragias, paralisia, dores de cabeça e picadas de cobra (PEDREIRA, 2007; PIERI, 2009; MENDONÇA; ONOFRE, 2009).

Os óleos das espécies de *C. multijuga* Hayne, *C. cearenses* Huber ex Ducke e *C. reticulata* Ducke foram comparados quanto à atividade anti-inflamatória através da avaliação da reação sob a cavidade pleural induzida por Zimosan. As três espécies apresentaram diminuição do número de leucócitos e neutrófilos, além de inibirem a produção de óxido nítrico. A *C. multijuga* Hayne foi a mais potente, comprovando atividade anti-inflamatória parecida com a do diclofenaco (VEIGA JUNIOR et al., 2007; GARCIA, 2012).

A extração de óleo-resina de diversas espécies de copaíba é uma prática comum nas comunidades do interior da Amazônia. No entanto, a disponibilidade deste produto é limitada, principalmente quanto aos aspectos de qualidade, regularidade de oferta e quantidade (SILVA, et. al., 2012). Não há um período certo para haver extração do óleo, normalmente, o coletor extrai em qualquer época não levando em consideração fatores climáticos como a precipitação pluviométrica, que na região amazônica está diretamente relacionada com a produção de várias culturas (OLIVEIRA, 2006). Acredita-se que o óleo não seja um produto do metabolismo primário e sim secundário, mais especificamente, um produto de excreção ou desintoxicação que funciona como defesa

da árvore contra animais, fungos e bactérias. Este óleo é encontrado em canais secretores localizados em todas as partes da árvore, tendo no tronco seu compartimento mais saliente (RAMOS, 2006). A obtenção do óleo é realizada através da perfuração, por meio de um trado ou perfurador, da parte superior do tronco da copaibeira até o lenho, onde se encontram os reservatórios do óleo-resina (Figura 1) (MASSON, 2011).

Figura 1. Extração através da perfuração do tronco da Copaibeira



(FONTE: Adaptado de <http://viversaudavel.blogs.sapo.pt/1328.html>)

2.2. Microemulsões

Microemulsão (ME) é definida como um sistema termodinamicamente estável e isotropicamente translúcido de dois líquidos imiscíveis, usualmente água e óleo, estabilizados por um filme interfacial de tensoativos localizados na interface óleo/água. A formulação de MEs geralmente envolve a combinação de três a cinco componentes: óleo, água, tensoativo, cotensoativo e eletrólito (DAMASCENO, et. al. 2011). Apresentam baixa viscosidade, possuem grande capacidade para o transporte de fármacos, demonstram comprovada propriedade promotora de absorção para os fármacos veiculados e são facilmente obtidas (ZHANG et al., 2011; CUNHA JÚNIOR et al., 2003).

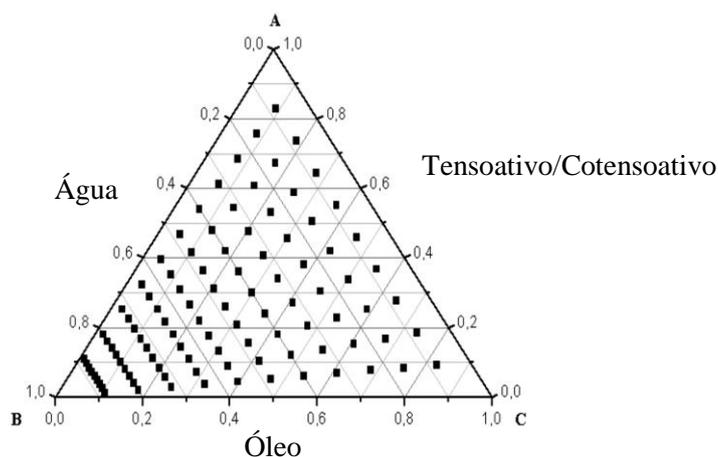
O surfactante ou tensoativo em sistema de água / óleo formam uma variedade de estruturas de auto-associação (CHÁVEZ, et. al., 2013). O tamanho médio das gotículas de microemulsões é de 5-100 nm, em comparação com centenas de micrometros das emulsões. A formação espontânea de microemulsões reduz a dificuldade e o consumo de energia associado com a preparação (L., et. al., 2013).

As características das ME têm atraído considerável atenção, principalmente por serem sistemas reservatórios, nos quais a fase interna constitui um microambiente restrito, com propriedades particulares (FANUN, 2010; OLIVEIRA et al., 2004), devido

a sua capacidade de solubilizar grande quantidade de fármacos lipófilo ou hidrófilos (FASOLIN, 2012; CAMPO, et al., 2004). Pode modificar profundamente a velocidade de liberação dos fármacos, controlando a sua biodisponibilidade. Como sistemas reservatórios podem alterar os parâmetros farmacocinéticos, diminuindo a toxicidade e aumentando a eficácia clínica de fármacos (FANUN, 2011; FANUN, 2010; FORMARIZ et. al., 2005).

Através da variação da composição química e porcentagem da fase aquosa e oleosa, por escolha do agente tensoativo adequado e fazendo variar a temperatura, podem ser formados diferentes sistemas microemulsionados (VEMIĆ, A. M., et. al., 2012).

Figura 2. Representação esquemática de um triângulo equilátero em que cada lado é representado por um dos componentes da mistura (fase aquosa, fase oleosa e mistura de tensoativos)



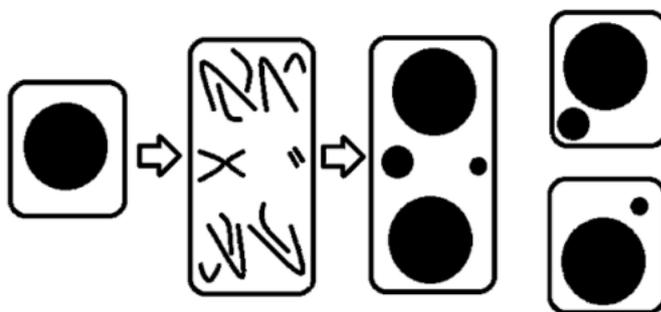
(FONTE: Dados de pesquisa)

O diagrama de fases (Figura 2) corresponde a uma área em forma de triângulo equilátero, delimitando em que proporção os componentes formam os variados tipos de sistemas emulsionados e/ou separação de fases. Estes diagramas apresentam em cada um de seus vértices a proporção de 100% em massa de fase oleosa, aquosa e da mistura de tensoativos (SILVA, A. L., 2013).

2.3. Mutagenicidade

Os efeitos mutagênicos podem ser observados por meio da formação de micronúcleos, que são pequenos corpos contendo ácidos desoxirribonucleicos (DNA), localizados no citoplasma, resultantes de quebras cromossômicas, formando fragmentos acêntricos, ou com sequências de cromossomos inteiros que não se prendem ao fuso mitótico e dessa forma, não chegam aos polos das células durante a mitose ou a meiose (Figura 3) (FÃO, et. al., 2012).

Figura 3. Formação de micronúcleo em células eucarióticas



(FONTE: FÃO, et. al., 2012)

O teste de micronúcleo está dentre os testes de avaliação toxicológicos recomendados pelas agências internacionais e instituições governamentais. É amplamente utilizado para avaliação e registro de novos produtos químicos e farmacêuticos que entram no mercado mundial, como um estudo toxicológico preliminar, visto que os resultados obtidos são considerados fortemente relevantes no contexto humano (LUZ, et. al., 2012).

Consiste em uma importante técnica citogenética não invasiva que permite detectar alterações ou danos ao aparelho mitótico onde micronúcleos indicam a perda irreversível de DNA genômico. O teste pode ser usado em ecogenotoxicidade, investigação de danos ao DNA, quebras cromossômicas ou interferência no fuso mitótico e modificações equitativas da distribuição cromossômica durante a divisão celular (ARALDI, et. al., 2013).

As alterações cromossômicas são conhecidas por serem mutações somáticas importantes e estão claramente envolvidos na origem, evolução e diversificação de certos tipos de câncer (ANDRADE, et. al., 2008).

3. MATERIAS E METODOS

Fase oleosa: O óleo de copaíba (*C. multijuga*) foi coletado na Reserva Florestal Ducke, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), identificada no âmbito do projeto Flora da Reserva Ducke, em cujo herbário um voucher está depositado.

Fase aquosa: Água deionizada.

Tensoativos: PEG-8 cáprico/caprílico Glicerídeo (Lote: 125494), Labrasol[®] - Brasquim; poligliceril 6-dioleato (Lote: 127425), Plurol Oleique[®] - Gattefossé.

3.1. Obtenção do óleo de copaíba

O método utilizado para a obtenção do óleo da copaíba consistiu na perfuração do tronco da copaibeira com um trado em dois furos. O primeiro foi feito 1 metro acima da base da planta e o segundo a 1,5 metros acima do primeiro. Inseriu-se então um cano de PVC de 3/4 de polegada nos orifícios, por onde o óleo foi escoado. Após a finalização da extração, o orifício foi fechado com o uso de argila.

O óleo foi armazenado em frasco de vidro âmbar devidamente fechado. De acordo com Mendonça e Onofre (2009), o óleo de copaíba pode ser armazenado por até 2 anos sem modificar suas propriedades, podendo transformar-se em resina se exposto ao ar e a luz.

3.2. Construção dos diagramas de fases pseudoternários (DFPT) e seleção de formulações

Os DFPT, desta pesquisa, foram obtidos por inspeção visual das misturas dos componentes Labrasol[®] (T) com Plurol Oleique[®] (CO) nas proporções 4:1 e 2:1 e, a esta mistura de T/CO, foi adicionado o óleo de copaíba nas proporções de 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2 e 9:1. As titulações foram feitas com volumes pré-definidos de água deionizada, adicionando gota a gota, em temperatura ambiente. Durante a titulação a mistura foi homogeneizada em um Desruptor de célula ultra-sonico/sonda de ultrassom (Modelo DES500, Unique, Brasil), por 1 minuto, potência de 250W. Após cada sonicação, a mistura foi levada ao banho de ultrassom (Modelo USC-1800, Unique, Brasil) por 1 minuto, para uma melhor homogeneização e retirada das bolhas quando presentes, facilitando assim a visualização dos sistemas formados contra um fundo preto. Para cada titulação foram feitos 3 ciclos (sonicador/banho de ultrassom). Considerando-se as proporções dos componentes (T/CO; fase oleosa e fase aquosa)

após as titulações aquosas plotou-se os pontos em que se deu a transição de sistema opticamente transparente ou translúcido líquido ou de ME para sistema opaco líquido ou semi-sólido (emulsão); líquido leitoso ou ainda separação de fases em cada diagrama (FORMARIZ et al., 2005, 2006, 2007; KE et al., 2005; CHEN; CHANG, 2004; DJORDJEVIC et al., 2004; SINTOV; SHAPIRO, 2004; CONSTANTINIDES,1994).

Para plotagem dos pontos foi utilizado o programa OriginPro8.0. Os diagramas foram feitos em duplicatas.

Devido ao grande numero de formulações preparadas e devido ao trabalho intenso do teste, a partir das regiões de microemulsões formadas nos dois diagramas, foram selecionados formulações de pontos distintos de cada diagrama. Para garantia da estabilização termodinâmica dos sistemas, as ME foram preparadas 48 horas antes dos testes. A preparação preliminar das formulações de ME foram realizadas no Laboratório de Desenvolvimento e Caracterização de Produtos Farmacêuticos (LDCPF) da Universidade Estadual da Paraíba

3.3.Determinação *in vivo* da atividade antiedematogênica por edema de pata e induzido por carragenina em modelo animal

Obtenção dos animais

Foram utilizados ratos Wistar, *Rattus norvegicus* var. albinus, machos, com 45 dias pesando de 158-198 gramas, provenientes do Biotério da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Os animais receberam água e dieta (Labina®) *ad libitum* e foram mantidos sob condições controles de iluminação (ciclo 12h claro/escuro) e temperatura ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$). O referido estudo foi realizado após a aprovação prévia, por escrito, do Comitê de Ética no uso de animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Médicas de Campina Grande/PB (FCM/CESED) de número (01.001.2012) (Anexo I).

Avaliação da atividade antiedematogênica

A avaliação da atividade antiedematogênica foi determinada pela técnica da indução do edema de pata por carragenina 1%. Os animais, ratos Wistar (*Rattus norvegicus* var. albinus) machos, foram divididos em cinco grupos experimentais de 6 animais, sendo dois grupos controles (grupo 1 e 2), onde o grupo 1 correspondeu ao controle negativo (vaselina sólida) e o grupo 2 ao controle positivo (diclofenaco

dietilamônio/emugel). Os outros grupos (3,4 e 5) corresponderam aos grupos testes. O grupo 3 e 4 testaram as formulações selecionadas dos dois diagramas e o grupo 5 o óleo de copaíba *in natura*. Foi administrada uma alíquota de 0,1mL de solução de carragenina 1% em salina (via subplantar) na pata esquerda de cada animal e na pata contralateral foi administrado o mesmo volume de solução salina 0,9 %. Após o tempo de 30 minutos os animais foram tratados com 100 μ L de cada substância (vaselina sólida, emugel, óleo de copaíba, ME-F2 e ME-F6). Nos tempos, pré-determinados (1,5; 3 e 5 horas) após a administração do agente flogístico (carragenina), foi realizada a leitura do volume das patas dos animais com o auxílio de um paquímetro digital (Messen, Brasil) (Figura 4). O valor do edema foi calculado pela diferença entre o volume (mm) da pata injetada com o agente flogístico e o volume da pata injetada com solução salina 0,9%. A análise dos resultados foi realizada utilizando o software prisma 5.0 utilizando o ANOVA de uma via, seguida do pós-teste de Dunnet e Tukey. Os valores foram significativos quando $p < 0,05$. O referido ensaio foi realizado no Laboratório de Farmacologia da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB).

Figura 4. Determinação do volume do edema induzido por carragenina em ratos Wistar



(FONTE: Dados da pesquisa)

3.4. Ensaio de Mutagenicidade

Para o ensaio de mutagênicidade foram utilizados camundongos da espécie *Mus musculus* (Swiss albino) com aproximadamente 30g de peso corpóreo. Os animais foram mantidos em caixas individuais de polipropileno, com tampa-grade, durante o período de tratamento, com água e alimento *ad libitum*, ciclo claro/escuro de 12 horas e temperatura de 23 ± 2 °C.

Os animais foram divididos em grupos de 6; 3 machos e 3 fêmeas. Sendo um grupo controle negativo, um grupo controle positivo, e dois grupos com as duas concentrações diferentes da microemulsão de Copafba (*Copaifera multijuga*).

Foi realizada incisão na região dorsal do camundongo com o auxílio de um *Punch*. Para o grupo controle positivo na incisão foi acrescentado uma injeção de 0,3ml de Ciclofosfamida (CAS 50-18-0) numa dosagem de 50mg/kg. Para o grupo controle negativo foi acrescentado água. E para os dois outros grupos, os camundongos receberam 5µl da formulação na incisão, por um período de 30 dias, diariamente.

Coleta do Sangue Periférico e Preparação das Lâminas

Após tratamento foi feito a coleta de sangue dos camundongos onde foi coletado com seringa heparinizada, após os períodos de 30 horas e 30 dias após o início do tratamento, através de uma punção na veia caudal, em seguida foi colocada uma gota do sangue coletado em uma das extremidades de uma lâmina de vidro limpa e seca, e com auxílio de outra lâmina em ângulo de 45°, o sangue foi espalhado uniformemente, formando uma camada delgada que foi posta para secar a temperatura ambiente fixado com metanol absoluto após 24 horas por 10 minutos. Após a fixação a lâmina foi corada com Giemsa 10% diluído em tampão fosfato pH 6,8 por 25 minutos, depois foram lavadas em água destilada e novamente foram posta para secar em temperatura ambiente. Para cada animal, duas lâminas foram confeccionadas. A análise citológica foi realizada em microscopia óptica com aumento de 1000x. Foram analisados 2000 eritrócitos por lâmina, anotando-se as frequências de micronúcleos para posterior análise estatística.

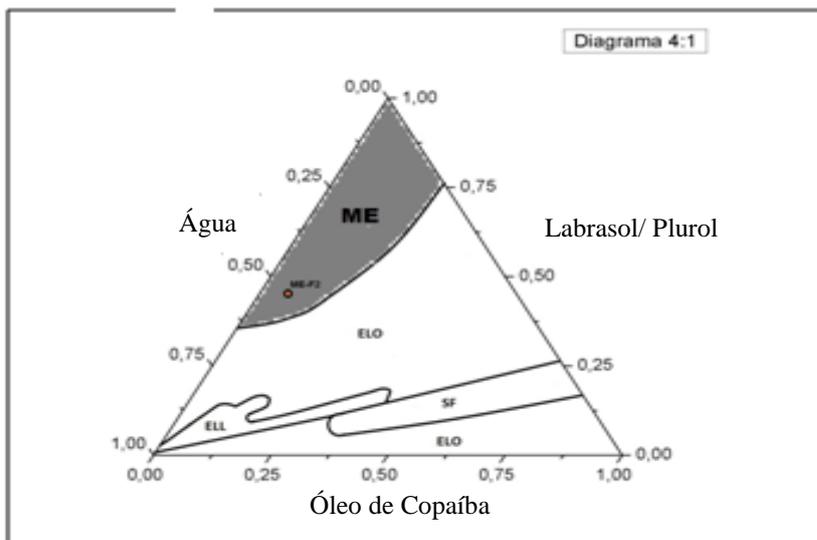
Após a análise das lâminas contendo amostras do sangue periférico dos camundongos, foram calculadas as frequências médias de células micronucleadas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Diagramas de fases pseudoternários (DFPT) e seleção das formulações

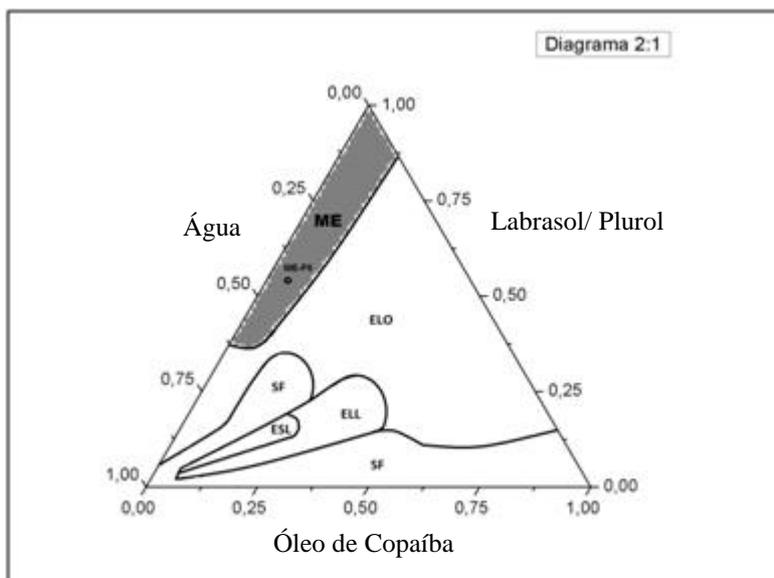
A técnica empregada para a obtenção dos DFPT destes sistemas mostrou-se bastante simples e reproduzível. Após as titulações, foi possível definir as várias regiões do diagrama, como separação de fases (SF), emulsão líquida branca leitosa (ELBL), emulsão líquida opaca (ELO), emulsão semi-sólida leitosa (ESL) e regiões opticamente transparentes que foram classificadas visualmente como microemulsões (ME), como representada nas Figuras 5 e 6. Observou-se uma faixa do lado esquerdo de cada diagrama (4:1 e 2:1 T/CO) de uma região de ME. Como esta região existe um predomínio de fase aquosa e uma concentração relativa de tensoativos, esta faixa pode ser representativa de ME do tipo O/A, com volume de fase interna pequeno (OLIVEIRA et al., 2004).

Figura 5. Diagrama de fases pseudoternário na proporção 4:1 (Mistura de tensoativo/cotensoativo).



LEGENDA: ME- microemulsão; ELL- emulsão líquida leitosa; ELO- emulsão líquida opaca; ESL- emulsão semi-sólida leitosa; SF- separação de fases. FONTE: Dados da pesquisa

Figura 6. Diagrama de fases pseudoternário na proporção 2:1 (Mistura de tensoativo/cotensoativo).



LEGENDA: ME- microemulsão; ELL- emulsão líquida leitosa; ELO- emulsão líquida opaca; ESL- emulsão semi-sólida leitosa; SF- separação de fases.
 FONTE: Dados da pesquisa

Das regiões de ME dos dois diagramas desenvolvidos, foi selecionada uma formulação de cada diagrama para os estudos, do total de 7 obtidas. Selecionou-se duas formulações levando em consideração os critérios de melhores proporções de componentes, priorizando as formulações que continham menor concentração de tensoativos e que apresentaram melhor estabilidade no período de 3 meses. No caso do diagrama 4:1 foi selecionada a ME-F2 que apresentou menor proporção de tensoativos e tornou-se levemente turva após este período mantendo suas características. No diagrama 2:1 situação semelhante foi observada, selecionando-se a ME-F6 para os testes. As duas formulações selecionadas continham 10,6% e 6,1% de óleo de copaíba, respectivamente (Tabela 1)

Tabela 1. Composição centesimal das formulações utilizadas para os estudos de avaliação anti-inflamatória e antimutagênicos

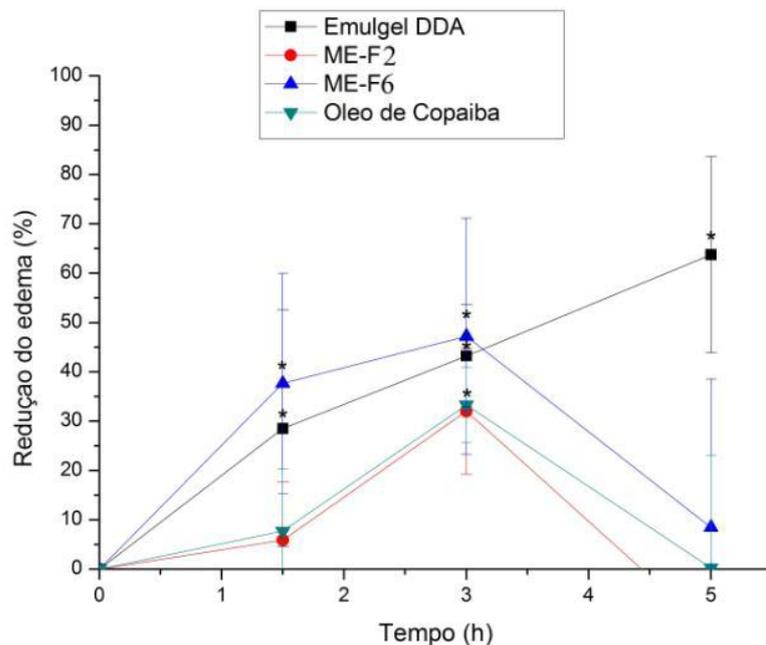
Componente	Diagrama 4:1 (%)	Diagrama 2:1 (%)
	ME-F2	ME-F6
Plurol Oleique®	8,46%	18,30%
Labrasol®	33,84%	36,60%
Óleo de Copaíba	10,60%	6,10%
Água	47,10%	39,0%

FONTE: Dados da pesquisa

4.2. Avaliação da atividade anti-inflamatória

A carragenina induz inflamação pela liberação de prostaglandinas, ocasionando a formação de edema e a migração leucocitária. Na inflamação aguda duas fases são identificadas: a primeira, detectada em torno de uma hora, chamada de fase rápida, marcada pela liberação de histamina, serotonina e bradicinina; e a segunda, chamada de tardia (1-6 h), em que mediadores como as cininas e prostaglandinas são liberados após duas e três horas, respectivamente, as últimas resultando da ativação da ciclo-oxigenase-2 (COX-2) (LIMA, L. R., et. al., 2013). Sendo assim, o volume do edema da pata dos animais foi verificado nos tempos de 1,5; 3 e 5 horas após a injeção da carragenina para avaliação dessas três fases. Foram testadas as ME-F2 e ME-F6 como também o óleo de copaíba *in natura*, utilizando como controle positivo o Emulgel de Diclofenaco Dietilamônio (DDA). Os resultados da redução do edema em função do tempo estão demonstrados na Figura 7.

Figura 7. Avaliação da redução do edema induzido por carragenina em modelo animal em função do tempo (1,5; 3 e 5 horas).



*Estatisticamente significativo ($p \leq 0,05$).
(FONTE: Dados da pesquisa)

Nos primeiros 90 minutos após injeção observou-se um efeito maior na redução do edema para ME-F6 com redução de 38% comparada ao controle negativo. Esta redução foi ainda superior à redução do controle positivo (29%). Com 3 horas de análise a ME-F2 e o óleo apresentaram efeito, porém inferiores às demais formulações, com 32 e 33%, respectivamente. A ME-F6 continuou apresentando o efeito máximo comparado às demais formulações, e comparável com o controle positivo neste tempo. Porém com 5 horas, apenas o Emulgel DDA continuou apresentando um aumento gradual da redução do edema, sendo que para as demais formulações, incluindo o óleo puro, foi observado o cessar deste efeito. A literatura descreve um aumento da ação anti-inflamatória para o DDA em função do tempo de contato com a pele, apresentando um aumento de cerca de 3 vezes após 10 horas de contato. Por este motivo, este emulgel é geralmente utilizado tanto para inflamações agudas como crônicas (KOROKOLVAS, 2006).

As duas ME testadas apresentaram diferentes concentrações de óleo de copaíba, onde a ME-F2 continha (10,6%) e a ME-F6 (6,1%) de óleo, correspondente a uma

concentração de β -cariofileno de $12,9\text{mg.mL}^{-1}$ e $8,38\text{mg.mL}^{-1}$, respectivamente. O óleo de copaíba *in natura* apresentou uma concentração de $114,33\text{mg.mL}^{-1}$ de β -cariofileno. Pode-se observar que para a redução do edema não é necessária uma concentração alta de β -cariofileno, visto que ambas ME apresentaram efeito, bem como o óleo puro, o que se pode sugerir que a redução do edema foi dose independente de ordem zero, onde a concentração do marcador não foi determinante para a intensidade do efeito farmacológico.

Comparando-se as duas formulações, foram verificados diferentes perfis de atividade. A ME-F6 já apresentou atividade desde a primeira hora e com efeito superior ao DDA. No entanto, a ME-F2 só apresentou atividade na redução do edema a partir da terceira hora e com efeito inferior ao DDA. Neste caso, possivelmente a quantidade de tensoativos tenha influenciado no efeito farmacológico, visto que a ME-F6 com menor concentração de óleo, porém maior de tensoativos (54,9%) comparada a ME-F2 que possui 42,3% de tensoativos apresentou efeito superior e de ação mais rápida. Sendo assim, o alto conteúdo de tensoativos da ME-F6 possa ter promovido uma desorganização maior dos lipídeos presentes no estrato córneo (EC) (OLIVEIRA et al., 2004), facilitando a permeação do β -cariofileno na pele e potencializando o efeito farmacológico.

No caso do óleo de copaíba puro, mesmo apresentando concentração superior de β -cariofileno, verificou-se atividade comparável a ME-F2. Neste caso, possivelmente tenha ocorrido uma relativa permeação do óleo, visto a presença de terpenos no próprio óleo que atuam como promotores de permeação (GONÇALVES, 2014).

Desta forma, as ME de óleo de copaíba atuaram de forma mais aguda, nas 3 primeiras horas, principalmente sobre os primeiros mediadores químicos. Gomes e colaboradores (GOMES, et al., 2010) sugeriram em seus estudos que a atividade anti-inflamatória do óleo de *C. Multijuga Hayne* está relacionada a inibição das vias da histamina e serotonina.

4.3 Ensaio de mutagenicidade

As análises do possível potencial mutagênico da microemulsão do óleo de Copaíba (*Copaifera Multijuga*) foram realizadas através do teste de micronúcleo em sangue periférico de camundongos. Os resultados obtidos, para as amostras ME-F2 e ME-F6 estão apresentados nas Tabelas 2 e 3. Foi realizada a contagem de 2000 Eritrócitos Policromáticos (PCE), sendo identificados e contados os Eritrócitos Policromáticos Micronucleados entre os 2000.

Quando comparando o grupo controle negativo com os grupos tratamento, as diferenças observadas não foram estatisticamente significativas, $P \leq 0,05$. Da mesma maneira compararam-se também as médias observadas de células micronucleadas entre os sexos, verificando-se que não há diferenças estatisticamente significantes entre os resultados obtidos em ambos os sexos. Esta ausência de diferença estatística entre os resultados obtidos demonstram que as duas concentrações da microemulsão de Copaíba testadas reagem de forma similar para ambos os sexos não apresentando diferenças metabólicas que promovam alterações estruturais no DNA de camundongos

Avaliando-se os resultados obtidos entre as duas concentrações testadas verificou-se um pequeno aumento nas médias sendo os resultados de ME-F6 maior, entretanto quando aplicado o teste estatístico (*teste-t* de Student) realizando-se comparações entre os valores obtidos para os grupos tratados com as amostras e com os obtidos a partir do grupo controle este aumento no número de PCEMNs (Eritrócitos Policromáticos Micronucleados) não representa diferenças estatísticas significantes.

Nas condições experimentais utilizadas as concentrações da microemulsão do óleo de Copaíba não apresentaram potencial mutagênico no teste de micronúcleo em sangue periférico de camundongos.

Tabela 2. Avaliação do potencial da atividade mutagênica pela frequência de micronúcleos da microemulsão ME-F2

Tratamento	Número de PCEs analisados	Sexo PCEMNs						Média ± SD
		M1	M2	M3	F1	F2	F3	
Controle positivo	2000	17	13	14	14	20	16	15,6±2,58
Controle negativo	2000	3	2	3	3	5	3	3,16 ± 0,89
Microemulsão óleo de copaíba ME- F2 (30 h)	2000	4	5	4	3	4	5	4,16 ± 0,75
Microemulsão óleo de copaíba ME-F2 (30 dias)	2000	6	6	5	3	4	3	4,5 ± 1,25

Controle negativo: água; Controle positivo: Ciclofosfamida 50 mg/ kg p. c.; M= machos; F=Fêmeas; PCEs= Eritrócito Policromático; PCEMN= Eritrócito Policromático Micronucleado; SD = Desvio Padrão; $P \leq 0,05$.

Tabela 3. Avaliação do potencial da atividade mutagênica pela frequência de micronúcleos da microemulsão ME-F6

Tratamento	Número de PCEs analisados	Sexo PCEMNs						Média ± SD
		M1	M2	M3	F1	F2	F3	
Controle positivo	2000	17	13	14	14	20	16	15,6±2,58
Controle negativo	2000	3	2	3	3	5	3	3,16 ±0,89
Microemulsão óleo de copaíba ME- F6 (30 h)	2000	6	4	5	6	7	5	5,5 ± 0,95
Microemulsão óleo de copaíba ME-F6 (30 dias)	2000	4	6	5	4	5	5	4,83 ±0,68

Controle negativo: água; Controle positivo: Ciclofosfamida 50 mg/ kg p. c.; M= machos; F=Fêmeas; PCEs= Eritrócito Policromático; PCEMN= Eritrócito Policromático Micronucleado; SD = Desvio Padrão; $P \leq 0,05$

5. CONCLUSÃO

Diante dos resultados apresentados podemos concluir que a ferramenta do diagrama de fases pseudoternários mostrou-se simples e reproduzível para o preparo de ME contendo o óleo de copaíba.

No tocante à atividade anti-inflamatória a ME-F6 apresentou atividade aguda superior ao controle positivo (emulgel DDA). Já a ME-F2 apresentou efeito mais tardio (a partir da terceira hora), porém menos intenso que o controle positivo e comparável ao óleo puro. Estes resultados confirmam a atividade anti-inflamatória descrita na literatura para esta espécie, bem como torna estes sistemas microemulsionados uma possível alternativa terapêutica para inflamações agudas. Assim como, esses sistemas permitem a utilização de uma pequena concentração de óleo, suficiente para promoção do efeito, desta forma, ocorreu uma racionalização do seu uso.

Em relação à atividade mutagênica as amostras de ME-F2 e ME-F6 não apresentaram nenhum potencial mutagênico, sendo desse modo, considerado seguro, quanto ao uso tópico.

Porém, é importante ressaltar a relevância deste trabalho para a área da nanotecnologia farmacêutica pelo ineditismo de uma formulação microemulsionada contendo o óleo de copaíba (*C. multijuga*) com excelente atividade anti-inflamatória e nenhuma atividade mutagênica, valorizando o uso desta espécie para estes fins terapêuticos. Destacando também a questão econômica e ambiental, pois se trata de um produto farmacêutico que utiliza um óleo vegetal proveniente da Copaibeira, árvore comum em nosso país, valorizando assim o mercado deste produto, e por consequência garantindo um maior valor agregado aos produtos naturais provenientes da biodiversidade brasileira, contribuindo, dessa forma, para o desenvolvimento sustentável dos produtores rurais e inclusão social devido o interesse farmacêutico, químico, agrícola e industrial.

6. REFERÊNCIAS

- ANDRADE, L. S.; SANTOS, D. B.; CASTRO, D. B.; GUILLO, L. A.; CHEN-CHEN, L. Absence of antimutagenicity of *Cochlospermum regium* (Mart. And Schr.) Pilger 1924 by micronucleus test in mice. *Braz. J. Biol.*, v. 1, n. 68, p. 155-159, 2008.
- ARALDI, R. P.; OLIVEIRA, D. G.; SILVA, D. F.; MENDES, T. B.; SOUZA, E. B. S. Análise do potencial mutagênico dos esteroides anabólicos androgênicos (EAA) e da L-carnitina mediante o teste do micronúcleo em eritrócitos policromáticos. *Rev. Bras. Med. Esporte*, v.19, n.6, nov/dez, 2013.
- CAMPO, L., YAGHMUR, A., GARTI, N., LESER, M.E., FOLMER, B., GLATTER, O. Five component food-grade microemulsions: structural characterization by SANS. *J. Colloid Interface Science*, v. 274, p. 251–267, 2004.
- CHAVEZ, G.; PARRA, I.; LUZARDO, M.; BRAVO, B.; MÁRQUEZ, N. Caracterización de cristales líquidos por microscopía óptica en sistemas surfactante polietoxilado-alcano-agua. *Quím. Nova*, São Paulo, v. 36, n. 9, p. 1343-1347, 2013.
- CHEN, H.; CHANG, X. A study of microemulsion systems for transdermal delivery of triptolide. *Journal of Controlled release*, v. 98, p. 427-436, 2004.
- CONSTANTINIDES, P.P. SCARLAT, J.P.; LANCASTER, C.; MARCELLO, J.; MARKS, G.; ELLENS, H.; SMITH, P.L. Formulation and intestinal absorption enhancement evaluation of water in oil microemulsions incorporating medium-chain glycerides. *Pharm Res*, v. 11, n. 10, p. 1385-1390, 1994.
- CUNHA-JÚNIOR, A.; FIALHO, S.L.; CARNEIRO, L.B.; ORÉFICE F. Microemulsões como veículo de drogas para administração ocular tópica. **Arq. Bras. Oftal.**, v.63, p.285-391, 2003.
- DAMASCENO, B.P.G.L.; SILVA, J.A.; OLIVEIRA, E.E.; SILVEIRA, W.L.L.; ARAÚJO, I.B.; OLIVEIRA, A.G.; EGITO, E.S.T. Microemulsão: um promissor carreador para moléculas insolúveis. *Rev Ciênc Farm Básica Apl.*, v. 32, n.1, p. 9-18, 2011.

DEUS, R. J. A.; ALVES, C. N.; ARRUDA, M. S. P. Avaliação do efeito antifúngico de óleo resina e do óleo essencial de copaíba (*Copaifera multijuga Hayne*). *Rev. Bras. Pl. Med.*, Botocatu, v. 13. n. 1, p. 1-7, 2011.

DJORDJEVIC, L.; PRIMORAC, M.; STUPAR, M.; KRAJISNIK, D. Characterization of caprylocaproyl macroglycerides based microemulsion drug delivery vehicles for an amphiphilic drug. *International Journal of Pharmaceutics*. v. 271, n. 1-2, p. 11-19, 2004.

ELSHAFEEY, A. H.; HAMZA, Y. E.; AMIN, S. Y.; ZIA, H. In vitro transdermal permeation of fenoterol hydrobromide. *Journal of Advanced Research*, v. 3, p. 125-132, 2012.

FANUN, M, PAPANIMITRIOU, V, XENAKIS, A. Characterization of cephalixin loaded nonionic microemulsions. *J Colloid Interface Sci*, v.361, p.115-121, 2011.

FANUN, M. *Colloids in drug delivery*. New York: Taylor and Francis; 2010.

FÃO, F.; ZAN, R. A.; BRONDANI, F. M. M.; RAMOS, L. J.; MENEGUETTI, D. U. O. Análise do potencial mutagênico da seiva da casca de *Croton lechleri* (Mull. Arg), no estado de Rondônia, Amazônia Ocidental. *Rev. Saúde e Biol.*, v.7, n.1, p. 91-98, jan/abr., 2012.

FASOLIN, L.H., SANTANA, R.C., CUNHA, R.L. Microemulsions and liquid crystalline formulated with triacylglycerols: Effect of ethanol and oil unsaturation. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, v.415 , p.31– 40, 2012.

FORMARIZ, T. P.; SARMENTO, V. H. V.; SILVA-JUNIOR, A. A.; SCARPA, M. V.; SANTILLI, C. V.; OLIVEIRA, A. G. Doxorubicin biocompatible O/W microemulsion stabilized by mixed surfactant containing soya phosphatidylcholine. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. v. 51, p. 54-61, 2006.

FORMARIZ, T. P.; URBAN, M. C. C.; SILVA-JUNIOR, A. A.; GREMIÃO, M. P. D.; OLIVEIRA, A. G. Microemulsão e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 41, n. 03, p.301-313, 2005.

FORMARIZ, T.P.; CHIAVACCI, L.A.; SARMENTO, V.H.S.; SANTILLI, C. V.; EGITO, E.S.T; OLIVEIRA, A. G. Relationship between structural features and in vitro release of doxorubicin from biocompatible anionic microemulsion. *Coll. Surf. B-Biointerf.*, v.60, p.28-35, 2007.

GARCIA, Rosângela Fernandes; YAMAGUCHI, Miriam Harumi. Óleo de copaíba e suas propriedades medicinais: revisão bibliográfica. **Saúde e Pesquisa**, v. 5, n. 1, 2012.

GOMES, F. E. S. Obtenção de sistemas microemulsionados e estudo de simulação por dinâmica molecular de sistemas micelares objetivando a veiculação de produtos naturais bioativos. 2010. 172 f. Tese (Doutorado em Química)- Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Ciências Exatas e da Terra. Programa de Pós-Graduação em Química.

GOMES, N. M.; 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. *J. Ethnopharmacol.*,v.128, p.177–183, 2010.

GONÇALVES, J. C. Nanotecnologia Aplicada à Pele. 2014. 73f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias. Mestrado Integrado de Ciências Farmacêuticas.

KE, W. T.; LIN, S. Y.; HO, H. O.; SHEU, M. T. Physical characterizations of microemulsion systems using tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate (TPGS) as a surfactant for the oral delivery of protein drugs. *Journal Controlled Release*, v. 102, n. 2, p. 489-507, 2005.

KOROKOLVAS, A., FRANÇA, F.F.A.C. *Dicionário Terapêutico Guanabara*. 13. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

LI, L.; LU, X.; QIU, J.; LIU, D. Effect of microemulsified collector on froth flotation of coal. *Journal of the Southern African Institute of Mining and Metallurgy*, v. 113, n. 11, p. 877-880, 2013.

LIMA, L. R., CAVALCANTE, R. R. L., MARTINS, M. C. C., PARENTE, D. M., & CAVALCANTE, A. A. M. C. Avaliação da atividade antiedematogênica,

antimicrobiana e mutagênica das sementes de *Amburana cearensis* (AC Smith)(Imburana-de-cheiro). *Rev. bras. plantas med*, v. 15, n. 3, p. 415-422, 2013.

LOURENÇO, A. C. S.; MIGUEL, L. K.; GUARIDO, K. L.; SENSIATE, L. A.; SALLES, M. J. S. Óleo de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.) em padrões reprodutivos de camundongos e no desenvolvimento embriofetal. *Rev. Bras. Pl. Med.*, Botocatu, v. 11, p. 407-413, 2009.

LUZ, A. C.; PRETTI, I. R.; DUTRA, J. C. V.; BATITUCCI, M. C. P. Avaliação do potencial citotóxico e genotóxico de *Plantago major* L. em sistemas teste *in vivo*. *Rev. Bras. Pl. Med.*, Botocatu, v. 14, n.4, p. 635-642, 2012.

MASSON, D. S. Atividades cicatrizante e antimicrobiana do óleo-resina de copaíba (*Copaifera langsdorffii*) em úlceras cutâneas. 2011. 215p. Tese (Doutorado em Clínica Médica- Investigação Biomédica)- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

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. *Rev. Bras. Pla. Med.*, Campinas, v. 15, n. 4, p. 664-669, 2013.

MENDONCA, D. E.; ONOFRE, S. B. Atividade antimicrobiana do óleo-resina produzido pela copaíba – *Copaifera multijuga* Hayne (*Leguminosae*). *Rev. Bras. Farmacogn.*, João Pessoa, v. 19, n. 2b, p. 577-581, jun. 2009.

MONTES, L. V.; BROSEGHINI, L. P.; ANDREATTA, F. S.; SANT'ANNA, M. E. S.; NEVES, V. M.; SILVA, A. G. Evidências para o uso da óleo-resina de copaíba na cicatrização de ferida- uma revisão sistemática. *Natureza on line*. v. 2. n. 7, p. 61-67, 2009.

NOGUEIRA, E. O.; NOVAES, A. S. M.; SANCHEZ, C. M. S.; ANDRADE, C. M.; SILVA, M. F. A. Avaliação do efeito do óleo-resina de copaíba (*Copaifera sp.*) na proliferação celular *in vitro*. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, São Paulo, v. 49, n. 4, p. 293-300, 2012.

OLIVEIRA, A. G.; SCARPA, M. V.; CORREA, M. A.; CERA, L. F. R.; FORMARIZ, T. P. Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. *Quim. Nova*, v. 27, n. 1., p. 131-138, 2004.

OLIVEIRA, E. C. P.; LAMEIRA, O. A.; ZOGHBI, M. G. B. Identificação da época de coleta do óleo-resina de copaíba (*Copaifera spp.*) no município de Moju, PA. *Rev. Bras. Pl. Med.*, Botocatu, v.8, n.3, p. 14-23, 2006.

PEDREIRA, N. E. Avaliação do efeito inibidor tumoral do óleo resina de copaíba in natura (*Copaifera reticulata*) e manipulado artesanalmente no modelo de carcinogênese bucal experimental DMBA induzida. 2007. 133f. Tese (Doutorado em Patologia Bucal) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Unidade Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

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

PINHO, D. S.; STURBELLE, R. T.; MARTINO-ROTH, M. G.; GARCIAS, G. L. Avaliação da atividade mutagênica da infusão de *Baccharis Trimeria* (Less.) DC. Em teste de *Allium cepa* e teste de aberrações Cromossômicas em linfócitos humanos. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 20, n. 2, p. 165-170, 2010.

RAMOS, M. F. S. Desenvolvimento de microcápsulas contendo a fração volátil de copaíba por spray-drying: estudo de estabilidade e avaliação farmacológica. 2006. 132p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

SILVA, A. L. Produção e avaliação de nanoemulsão catiônica como possível vetor não viral para pIERS2-EGFP. 2013. 93p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

SILVA, E. S.; MATHIAS, C. S.; LIMA, M. C. F. JUNIOR, V. F. V.; RODRIGUES, D. P.; CLEMENT, C. R. Análise físico-química do óleo-resina e variabilidade genética de copaíba na Floresta Nacional do Tapajós. *Pesq. Agropec. Brás.*, Brasília, v. 47, n. 11, p. 1621-1628, nov. 2012.

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, 2010.

SINTOV, A.C., SHAPIRO, L., New microemulsion vehicle facilitates percutaneous penetration in vitro and cutaneous drug bioavailability *in vivo*. *J. Control. Release*, v.95, p.173–183, 2004.

VARANDA, E. A. Atividade mutagênica de plantas medicinais. *Rev. Ciênc. Básica Apl.*, v. 27, n. 1, p. 1-7, 2006.

VEIGA JÚNIOR, V. F.; ROSAS, E. C.; CARVALHO, M. V.; HENRIQUES, M. G. M. O.; PINTO, A. C. Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from 103 *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne-A comparative study. *J. Ethnopharmacol.*, v.112, p.248–254, 2007.

VEMIC, A. M.; MALENOVIC, A. M.; RAKIC, T. M.; KOSTIC, N. M.; JANCIC-STOJANOVIC, B. S.; IVANOVIC, D. P.; MEDENICA, M. B. Physicochemical factors Governing the Partition of Pramipexole and its Five impurities in microemulsion liquid chromatographic systems. *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 23, n. 11, p. 2084-2092, 2012.

XAVIER JUNIOR, F. H. Emulsões de óleo de Copaíba: Determinação do equilíbrio hidrófilo-lipófilo crítico (EHLc), propriedades e estabilidade físico-químicas. 2011. 67f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

YAMAGUCHI, M. H.; GARCIA, R. F. Óleo de copaíba e suas propriedades medicinais: revisão bibliográfica. *Revista Saúde e Pesquisa*, v. 5, n. 1, p. 137-146, 2012.

ZHANG, J., MICHNIAK-KOHN, B. Investigation of microemulsion microstructures and their relationship to transdermal permeation of model drugs: Ketoprofen, lidocaine, and caffeine. *International Journal of Pharmaceutics*, v.421, p.34–44, 2011.

ZIECH, R. E.; FARIAS, L. D.; BALZAN, C.; ZIECH, M. F.; HEINZAMANN, B. M.; LAMEIRA, O. A.; VARGAS, A. C. Atividade antimicrobiana de oleorresina de copaíba (*Copaifera reticulata*) frente a *Staphylococcus* coagulase positiva isolados de casos de otite em cães. *Pesq. Vet. Bras.* v. 7, n. 33, p. 909-913, julho 2013.

ANEXO 1

**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: 0030/12/03/2013
CIAEP/CONCEA Nº: 01.001.2012
APROVADO EM 26/03/2013

- 1. Pesquisador Responsável:**
José Aleksandro da Silva

- 2. Título do Projeto:**
DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DE PERMEÇÃO CUTÂNEA DE MICROEMULSÃO TRANSDÉRMICA CONTENDO ÓLEO DE COPAÍBA,

- 3. Objetivo:**
Desenvolver e caracterizar um sistema microemulsionado transdérmico contendo óleo de copaiba e por fim realizar ensaios in vivo para testar sua atividade antiinflamatória.

- 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. Todas as considerações solicitadas pelo colegiado foram devidamente atendidas.

- 5. Parecer Final:**
APROVADO

Tharcia Kiara B. de Oliveira
Coordenadora do CEUA-CESED
Médica Veterinária CRMV - 0830

Ru. Conselheiro Arnanino da Encarnação, 1001 - Itararé