



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

DÔRIAN CORDEIRO LIMA JÚNIOR

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DO ÓLEO DE COPAÍBA E
DE MICROEMULSÃO CONTENDO ÓLEO DE COPAÍBA APLICADOS
TOPICAMENTE**

**CAMPINA GRANDE
2018**

DÔRIAN CORDEIRO LIMA JÚNIOR

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DO ÓLEO DE COPAÍBA E
DE MICROEMULSÃO CONTENDO ÓLEO DE COPAÍBA APLICADOS
TOPICAMENTE**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Farmácia do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Área de concentração: Ciências da Saúde

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.

- L732a Lima Junior, Dorian Cordeiro.
Avaliação da atividade de anti-inflamatória do óleo de copaíba e de microemulsão contendo óleo de copaíba aplicados topicamente [manuscrito] / Dorian Cordeiro Lima Junior. - 2018.
39 p. : il. colorido.
Digitado.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - 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, UFPB - Universidade Federal da Paraíba"
1. Dermatite . 2. Óleo vegetal . 3. Doença inflamatória. 4. Fitoterapia . I. Título
21. ed. CDD 615.321

DÔRIAN CORDEIRO LIMA JÚNIOR

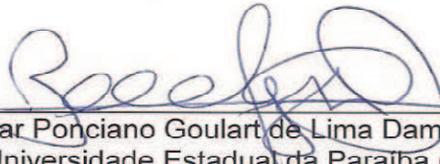
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DO ÓLEO DE COPAÍBA E DE
MICROEMULSÃO CONTENDO ÓLEO DE COPAÍBA APLICADOS TOPICAMENTE

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Farmácia do
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
da Universidade Estadual da Paraíba,
como requisito parcial à obtenção do título
de Bacharel em Farmácia.

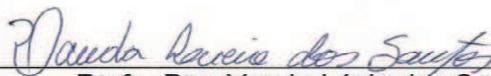
Área de concentração: Ciências da
Saúde.

Aprovada em: 19/11/2018.

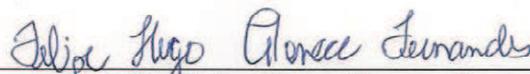
BANCA EXAMINADORA



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



Profa. Dra. Vanda Lúcia dos Santos
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Prof. Dr. Felipe Hugo Alencar Fernandes
Faculdade de Ciências Médicas (FCM/Unifacisa)

Aos meus pais, por todo apoio e base.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Josicleide e Dôrian, por terem abertos os caminhos e mais ainda por terem me ensinando e incentivado a sempre continuar a caminhar. Ao meu irmão, Vicente Neto, por sempre ter servido como exemplo. A Tia Ilma, Tia Edna e demais familiares por terem me acolhido quando precisei. A Alessandra e Tainá, por todos os momentos de descontração.

Ao Professor João Walter pelos ensinamentos dentro e fora do meio acadêmico. Ao Professor Bolívar pela brilhante orientação. A Malu Reis, pela ajuda nas formulações.

A todos os docentes do curso de Farmácia da UEPB pela formação e desenvolvimento do meu intelecto como profissional.

Aos funcionários da instituição pela ajuda e atenção sempre que necessitei.

A melhor patotinha de todos os tempos, Dayana, Isabel, Poliana, Salete e Vandilma, por nunca deixar faltar sorrisos nos meus dias, ao longo de todos esses dias, e por dividir esse peso comigo, deixando a caminhada mais leve.

A Márcio, por ter estado comigo em todos os momentos dessa caminhada que dura anos, me salvando dos afogamentos.

A Elayne, por todas as conversas das madrugadas, por todas as músicas cantadas em dueto, por todos os almoços e jantares, e por quase ter se casado comigo.

A Thiago, Dayvison e Daniel, por terem me ensinado a sobreviver nessa selva de pedra.

Aos colegas de classe pelos momentos de amizade e apoio.

Aos amores, cores, cheiros, sabores e dessabores, pelo aprendizado.

Ao Insone, por ter segurado as pontas.

Com voz sagrada, letra vadia
Fiz o meu junho, faço os meus dias
Rumei meus punhos, cacei fé com fé
Estive com medo, estive comigo, pro que der e vier

Andei na história sentindo o vento, sangue correu secou e tal
Engatilhei meus vinte dedos, me espera sentada uma moral
Estou num marasmo, não sinto os meus pés

Flores em fogo, tédio na brisa
Tudo traz ânsia, nada sacia
Houve um surto de bege euforia, e por fazer nada estive golpista

Fora de forma, deito em agosto
Tudo tem gosto de paralisia, ninguém se cansa de tanta notícia
Mas não precisava ter tanto artista

É só espuma, o caos, a lama
É pouca poeira debaixo da cama
Um pouco mais de assalto e insônia
Com mais liberdades e poucas vergonhas

A terra ainda é boa, dá plantas que curam
Dá hinos e fugas, de tudo dá.
(Carne Doce)

RESUMO

Copaifera langsdorffii, popularmente conhecida como copaíba, copaíva ou pau-de-óleo é uma árvore encontrada nas regiões brasileiras Sudeste, Centro-Oeste e Amazônica. Da árvore da copaíba é extraído um óleo-resina com amplo uso na medicina popular. Vários estudos têm relatado atividade antiparasitária contra *Leishmania amazonenses*, antinociceptiva, anti-inflamatória, analgésica, diurética, antiulcerogênico e antioxidante. A dermatite de contato alérgica é uma doença inflamatória crônica da pele acompanhada por muitos sintomas comuns incluindo prurido, eritema, eczema e lesões na pele. Todos estes sintomas são consequência de uma resposta imune desbalanceada à vários alérgenos. As microemulsões são emulsões translúcidas, na qual um óleo ou um fármaco lipofílico é disperso num meio aquoso, contendo um tensoativo, associado ou não a um co-tensoativo para gerar um sistema termodinamicamente estável. Estudos já têm mostrado o grande potencial das microemulsões como veículos de liberação de fármacos lipofílicos para administração tópica. O objetivo deste trabalho foi desenvolver, caracterizar e avaliar a atividade anti-inflamatória pela via tópica de microemulsões contendo óleo de copaíba. Inicialmente foi realizado um diagrama pseudo-ternário contendo água destilada (fase aquosa), miristato de isopropila (fase oleosa) e cremophor[®] EL (tensoativo). Escolhida a formulação, adicionou-se o óleo de copaíba (1 e 5%_(v/v)), e nestas formulações foram realizadas medições de pH, condutividade e espalhabilidade, além de estudo de estabilidade preliminar: centrifugação (1000, 2500, 3500, 5000 e 7000 rpm), estresse térmico (40 °C a 80 °C) e ciclo gelo-degelo (6 ciclos de 24 h a 4 °C + 24 h a 45 °C) e a avaliação da atividade anti-inflamatória *in vivo*. As microemulsões apresentaram valores de pH de aproximadamente 6,3, sendo biocompatíveis com a pele para aplicação tópica. Também apresentaram boa espalhabilidade, onde, quanto maior a força exercida sobre a formulação, maior a espalhabilidade. Nos testes de estabilidade preliminar as microemulsões se comportaram bem, com bons resultados, sem apresentar turvação ou separação de fases após os testes de estresse. Pudemos constatar que: as microemulsões contendo óleo de copaíba a 1% e 5% mostraram-se efetivas em amenizar os efeitos da dermatite de contato alérgica e serão alvo de estudos posteriores, o óleo de copaíba a 1% também foi capaz de amenizar os efeitos da dermatite, enquanto que o óleo de copaíba a 5% agrava os escores clínicos da dermatite.

PALAVRAS-CHAVE: Caracterização físico-química. Estabilidade preliminar. Novos Sistemas de Liberação de Fármacos.

ABSTRACT

Copaifera langsdorffii, popularly known as copaiba, copaiva or oil palm is a tree found in the Brazilian regions Southeast, Midwest and Amazon. From the copaiba tree is extracted an oil-resin with widespread use in folk medicine. Several studies have reported antiparasitic activity against *Leishmania amazonenses*, antinociceptive, anti-inflammatory, analgesic, diuretic, antiulcerogenic and antioxidant. Allergic contact dermatitis is a chronic inflammatory skin disease accompanied by many common symptoms including itching, erythema, eczema and skin lesions. All these symptoms are the consequence of an unbalanced immune response to various allergens. Microemulsions are translucent emulsions in which an oil or a lipophilic drug is dispersed in an aqueous medium containing a surfactant, associated or not to a cosurfactant to generate a thermodynamically stable system. Studies have already shown the great potential of microemulsions as lipophilic drug delivery vehicles for topical administration. The objective of this work was to develop, characterize and evaluate the anti-inflammatory activity by the topical route of copaiba oil containing microemulsions. Initially, a pseudo-ternary diagram containing distilled water (aqueous phase), isopropyl myristate (oily phase) and cremophor[®] EL (surfactant) was performed. When the formulation was chosen, copaiba oil (1 and 5% (v/v) was added, and pH, conductivity and spreadability measurements were performed in these formulations, in addition to preliminary stability study: centrifugation (1000, 2500, 3500, 5000 and 7000 rpm), thermal stress (40 ° C to 80 ° C) and ice-defrost cycle (6 cycles of 24 h at 4 ° C + 24 h at 45 ° C) and evaluation of anti-inflammatory activity in vivo. The microemulsions presented pH values of approximately 6.3, being biocompatible with the skin for topical application. They also presented good spreadability, where, the greater the force exerted on the formulation, the greater the spreadability. In the preliminary stability tests the microemulsions performed well, with good results, without presenting turbidity or phase separation after the stress tests. It was observed that: the microemulsions containing 1% and 5% copaiba oil were effective in alleviating the effects of allergic contact dermatitis and will be the subject of further studies, 1% copaiba oil was also able to mitigate the effects of dermatitis, while 5% copaiba oil aggravates the clinical scores of dermatitis.

KEY WORDS: Physical-chemical Characterization. Preliminary Stability. New Drug Release Systems.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	OBJETIVOS	12
2.1	Objetivo geral.....	12
2.2	Objetivos específicos.....	12
3	REVISÃO DE LITERATURA	13
3.1	<i>Copaífera L.</i>	13
3.2	Microemulsões.....	14
3.3	Dermatite de contato alérgica.....	16
4	METODOLOGIA	18
4.1	Desenvolvimento e caracterização de microemulsão <i>gel-like</i> contendo óleo de copaíba para uso tópico.....	18
4.1.1	Produção do diagrama de fase pseudo-ternário (DFPT).....	18
4.1.2	Seleção das formulações.....	19
4.1.3	Caracterização físico-química das formulações.....	19
4.1.3.1	Potencial hidrogeniônico (pH).....	19
4.1.3.2	Condutividade elétrica.....	19
4.1.3.3	Espalhabilidade.....	20
4.1.4	Estabilidade Preliminar.....	20
4.1.4.1	Centrifugação.....	20
4.1.4.2	Estresse térmico.....	21
4.1.4.3	Ciclo gelo/degelo.....	21
4.2	Avaliação <i>in vivo</i> da atividade anti-inflamatória do óleo de copaíba ou de microemulsão contendo óleo de copaíba.....	21
4.2.1	Animais.....	21
4.2.2	Indução da dermatite alérgica.....	22
4.2.3	Tratamentos.....	22
4.2.4	Avaliação dos efeitos dos tratamentos sobre a dermatite alérgica.....	22
4.2.4.1	Peso.....	23
4.2.4.2	Observação clínica da dermatite.....	23
4.2.4.3	Exame histológico.....	23
4.3	Análise estatística.....	24
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5.1	Desenvolvimento e caracterização de microemulsão <i>gel-like</i> contendo óleo de copaíba para uso tópico.....	25
5.1.1	Produção do diagrama de fase pseudo-ternário.....	24
5.1.2	Incorporação do óleo de copaíba na formulação.....	26
5.1.3	Caracterização físico-química das formulações incorporadas com o óleo de copaíba.....	26
5.1.3.1	Potencial hidrogeniônico.....	26
5.1.3.2	Condutividade elétrica.....	27
5.1.3.3	Espalhabilidade.....	27

5.1.4	Estabilidade Preliminar.....	28
5.2	Avaliação <i>in vivo</i> da atividade anti-inflamatória do óleo de copaíba ou de microemulsão contendo óleo de copaíba.....	29
5.2.1	Avaliação dos efeitos dos tratamentos sobre a dermatite alérgica.....	29
5.2.1.1	Peso.....	29
5.2.1.2	Observação clínica da dermatite.....	30
5.2.1.3	Exame histológico.....	31
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	34
	REFERÊNCIAS.....	35
	ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	39

1 INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial de Saúde entre 70-95% da população mundial, de algum modo, faz uso de plantas medicinais como medicamentos (ROBINSON; ZHANG, 2011). Apesar disso o número de estudos clínicos envolvendo produtos naturais ainda é pequeno (FERNANDES, 2013), onde importante contribuição para a terapêutica pode advir do estudo e definição das rotas metabólicas e mecanismos de produtos fitoterápicos (FERNANDES, 2013).

Metabólitos secundários são elaborados por sistemas vivos e frequentemente ter maior efeito biológico quando comparado a moléculas totalmente sintéticas, o que faz deles grandes candidatos para desenvolvimento de outros fármacos (CHIN et al., 2006).

Deste modo, o estudo da composição química de matérias-primas naturais visando à proposição de novos princípios ativos é condição essencial para o desenvolvimento de novos medicamentos.

O óleo de copaíba tem sido largamente comercializado no Brasil e exportado para a Europa e América do Norte para uso em preparações cosméticas e farmacêuticas (SOUZA, 2010). Ainda hoje, a copaíba é uma das plantas mais utilizadas pela população brasileira que não tem acesso a produtos farmacêuticos e serviços de saúde (CASCON; GILBERT, 2000).

Estudos científicos usando o óleo de copaíba têm descrito várias atividades biológicas como: antiparasitário contra *Leishmania amazonensis* (SANTOS et al., 2008), antinociceptiva (GOMES et al., 2007), anti-inflamatória (CARVALHO et al., 2005), analgésica (CARVALHO et al., 2005), diurética (SOMOVA et al., 2001), antiulcerogênico (PAIVA et al., 1998) e antioxidante (PAIVA et al., 2004).

Uma das limitações do uso de produtos contendo óleo de copaíba de ação sistêmica são os efeitos colaterais quando administrados via oral, que variam desde irritação gastrointestinal, diarreia, sialorreia e depressão do sistema nervoso central (BASILE et al., 1988).

A administração tópica é conhecida como via alternativa da administração oral de fármacos e oferece muitas vantagens como a ausência de efeito de primeira passagem, facilidade de aplicação (SILVA et al., 2009) e menor incidência de efeitos adversos favorecendo uma maior adesão do paciente a terapia.

Apesar do óleo de copaíba ter largo uso na medicina popular como anti-inflamatório aplicado topicamente, não há na literatura, avaliação das atividades deste óleo quando administrado por esta via.

Atualmente, há grande interesse no desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos como microemulsões. As microemulsões podem ser definidas como uma emulsão transparente, na qual um óleo ou um fármaco lipofílico é disperso num meio aquoso, contendo um tensoativo, associado ou não a um co-tensoativo apropriado, gerando um sistema termodinamicamente estável (OLIVEIRA et al., 2004) que possui propriedades únicas como tensão interfacial baixa, grande área interfacial, baixa viscosidade e alta capacidade de solubilização (FANUN, 2012).

Estudos demonstraram o grande potencial das microemulsões como veículos de liberação de fármacos lipofílicos para administração tópica, tais como anti-inflamatórios, antifúngicos e antioxidantes (GRAMPUROHIT, 2011).

A dermatite alérgica é uma doença inflamatória crônica da pele que afeta aproximadamente 10 milhões de pessoas no mundo e cuja incidência está continuamente aumentando nos países ocidentais (AKDIS et al., 2006). Esta patologia é acompanhada por muitos sintomas comuns incluindo prurido, eritema, eczema e lesões na pele (LEUNG, 2000). Na dermatite alérgica a pele tem muita coceira o que desencadeia severo comportamento de arranhar. Estes comportamentos são acompanhados por grande produção de citocinas proinflamatórias (LEUNG, 2000). A ativação de células do sistema imune inicia o ciclo inflamatório de dermatite alérgica que é acompanhada por eritema, queratose e escarificação (THESTRUP-PEDERSEN, 2000). Todos estes sintomas são consequência de uma resposta imune desbalanceada à vários alérgenos. Outra característica importante da resposta imune alérgica é a capacidade de gerar níveis elevados de anticorpos do tipo imunoglobulina E, (IgE) e as células T helper tipo 2 (Th2) são críticas para a síntese de IgE (SAEKI, 2015). As células Th2 produzem predominantemente mediadores das famílias das interleucinas (IL), e estas citocinas são associadas com funções específicas das células imunes na dermatite alérgica (PUGLIARELLO et al., 2011).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estudar os efeitos da administração tópica do óleo de copaíba ou de microemulsão contendo óleo de copaíba sobre a inflamação no modelo de dermatite alérgica em camundongos.

2.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver sistema de microemulsão contendo óleo de copaíba para aplicação tópica;
- Padronizar o modelo de dermatite alérgica em camundongos em nosso laboratório;
- Avaliar os efeitos do óleo de copaíba sobre a dermatite alérgica em camundongos;
- Avaliar os efeitos de microemulsão contendo óleo de copaíba sobre a dermatite alérgica em camundongos.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 *Copaifera L.*

As copaíbas são encontradas facilmente nas Regiões Amazônica e Centro-Oeste do Brasil, onde 16 das 72 espécies são encontradas, sendo popularmente conhecidas como copaibeiras ou pau d'óleo. As espécies mais frequentes são: *C. officinalis L.* (Norte do Amazonas, Roraima, Colômbia Venezuela e San Salvador), *C. guianensis Desf.* (Guianas), *C. reticulata Ducke*, *C. multijuga Hayne* (Amazônia), *C. confertiflora Bth* (Piauí), *C. langsdorffii Desf.* (Brasil, Argentina e Paraguai), *C. coriacea Mart.* (Bahia), *C. cearensis Huber ex Ducke* (Ceará) (VEIGA; PATITUCCI; PINTO, 1997).

São árvores de crescimento lento, chegando a alturas que variam de 25 a 40 metros, e vivem até 400 anos. O tronco é áspero, de coloração escura, medindo de 0,4 a 4 metros de diâmetro. As folhas são alternadas, pecioladas e penuladas. Os frutos contêm uma semente ovoide envolvida por um arilo abundante e colorido. As flores são pequenas, apétalas, hermafroditas e arranjadas em panículos axilares (VEIGA; PATITUCCI; PINTO, 1997).

A nomenclatura mais apropriada para o óleo da copaíba é a de óleo-resina, por ser constituído por compostos voláteis e ácidos resinosos. Também é chamado, de forma errônea, de bálsamo de copaíba, apesar de não ser um bálsamo verdadeiro, por não conter derivados do ácido benzoico ou cinâmico (VEIGA; PATITUCCI; PINTO, 1997).

O óleo era obtido, antigamente, através de cortes a machado no tronco, o que inutilizava a árvore. Era feita uma incisão em V, colocando-se abaixo vasos para coletar o óleo, técnica muito parecida com a da extração de borracha, e o chamado método do arrocho, que era feito selando o tronco, abaixo das incisões, com cipós e coletar o óleo da árvore até o seu esgotamento, provocando sua morte. Também foi descrita a retirada por meio de bomba de sucção, porém é uma técnica pouco difundida (VEIGA; PATITUCCI; PINTO, 1997).

A única prática de coleta não agressiva é aquela realizada através de uma incisão com trado a cerca de 1 metro de altura do tronco. Terminada a coleta, o orifício é vedado com argila para impedir a infestação da árvore por fungos ou cupins. A argila pode ser facilmente retirada, permitindo que se façam outras coletas

no mesmo tronco, obtendo-se quantidade de óleo igual ou mesmo superior à da primeira retirada. Nesta primeira extração a quantidade de óleo obtido varia bastante. Alguns cronistas descreveram que uma única árvore pode gerar até 40 ou 50 litros de óleo por ano, apesar de nem todas as espécies serem capazes de produzir essa quantidade (CORREIA, 1931).

A composição química dos óleos de copaíba encontra-se definida em vários trabalhos, onde foram utilizadas técnicas mais antigas, bem como metodologias modernas de isolamento e de identificação, tais como cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), cromatografia com fluido super-crítico com detector de infravermelho (SFC-FT-IR) e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas com colunas cromatográficas de fase estacionária quiral (ciclodextrina permetilada). Constatou-se serem os óleos constituídos por misturas de sesquiterpenos, predominantes na maioria deles, e de diterpenos (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002).

. Em estudo realizado com diversos óleos de copaíba provenientes de várias regiões do Brasil, o ácido copálico foi o único encontrado em todos os óleos analisados. Por esta razão, este diterpeno ácido pode ser usado como biomarcador de óleos de copaíba (VEIGA; PATITUCCI; PINTO, 1997).

Vários outros compostos isolados ou detectados nos óleos de copaíba tiveram propriedades farmacológicas, descritas na literatura. Entre os sesquiterpenos, algumas propriedades como anti-úlceras, antiviral e anti-rinovírus são descritas para o α -curcumeno e o β -bisaboleno, este último também descrito como abortivo. O bisabolol é conhecido por conferir as propriedades anti-inflamatória e analgésica à camomila (*Matricaria chamomilla*), o α -elemeno é descrito como anticâncer (cérvico) e cariofileno e cadineno como anti-cariogênicos, sendo este último também bactericida (CMI 800ug/ml) (ZEKOVIĆ et al., 1994).

3.2 Microemulsões

Microemulsões podem ser definidas, de forma geral, como sistemas termodinamicamente estáveis, isotrópicos e transparentes, de dois líquidos imiscíveis, estabilizados por compostos tensoativos, localizados na interface (OLIVEIRA et al., 2004).

Outras denominações, como "submicron emulsion" e "nanoemulsão" têm sido utilizadas para designar esse sistema visto que as gotículas precisam ser suficientemente pequenas para que o sistema seja transparente. Além dos agregados esféricos, outros tipos de estruturas internas, como as bicontínuas e bicontínuas tubulares foram observadas nas microemulsões (OLIVEIRA et al., 2004).

O sistema forma espontaneamente a fase interna por homogeneização suave dos componentes da fórmula. Oferece vantagens sobre as dispersões instáveis, pela estabilidade termodinâmica, tais como as suspensões e emulsões, podendo ser utilizada por tempo muito mais amplo (CONSTANTINIDES, 1995).

Para estabilizar uma emulsão, é necessário fornecer energia mecânica continuamente para manter a área interfacial aumentada, fator que por si só não é suficiente, visto que a barreira da tensão superficial é vencida apenas temporariamente, durante a agitação. Sendo assim, a forma mais indicada para manter a estabilização do sistema é a diminuição da tensão interfacial. Quanto menor a energia livre remanescente da expansão da área interfacial, maior a estabilidade da emulsão, formando um sistema termodinamicamente estável (OLIVEIRA et al., 2004).

Dessa maneira, os tensoativos desempenham um papel fundamental na estabilização de emulsões e microemulsões. No entanto, com poucas exceções, os tensoativos não conseguem diminuir a tensão interfacial a ponto de anular totalmente a energia livre de superfície, sendo assim, emulsões comuns são consideradas como termodinamicamente instáveis, onde, no desenvolvimento tecnológico, busca-se meios para retardar a separação das fases do sistema (OLIVEIRA et al., 2004).

Para burlar esse problema, as microemulsões são feitas utilizando, além do tensoativo, um co-tensoativo, que tem como função diminuir a tensão interfacial para valores abaixo dos limites proporcionados pelo tensoativo, quando utilizado sozinho (OLIVEIRA et al., 2004).

Utiliza-se como ferramenta fundamental o diagrama de fase para fazer a caracterização de em quais condições experimentais as microemulsões existem e em que proporções dos componentes outras estruturas podem estar presentes. Seleciona-se, então, a região do diagrama de fases que representa a condição mais apropriada para que o fármaco seja incorporado (FORMARIZ et al., 2005).

Os sistemas microemulsionados podem ser diferenciados visualmente dos outros sistemas, pelas suas características óticas visuais, visto que os outros sistemas se apresentam como emulsões líquidas opacas, emulsões géis opacas, representadas por sistemas de viscosidade elevada, ou com separação de fases. Já os sistemas microemulsionados líquidos são observados como sistemas translúcidos ou transparentes (FORMARIZ et al., 2005).

3.3 Dermatite de contato alérgica

A dermatite de contato alérgica acomete todas as idades e etnias, sendo considerada uma doença universal, responsável por cerca de 10% dos atendimentos dermatológicos (MARTINS; REIS, 2011).

A dermatite de contato afeta de forma negativa a qualidade de vida dos seus portadores pois provoca dor, prurido, exsudação e eventual infecção o que pode comprometer a vida profissional, social, e pessoal dos acometidos. A descoberta do agente responsável pela dermatite de contato modifica a evolução e o prognóstico, melhorando a qualidade de vida do portador (MARTINS; REIS, 2011).

A dermatite de contato alérgica é uma doença inflamatória desencadeada por substâncias não proteicas, de baixo peso molecular, que se ligam a proteínas ou peptídeos para assim produzir resposta imunológica, denominadas de haptenos, e mediada por células T. Em 1935, foi descrito por Karl Landsteiner e John Jacobs a existência de substâncias químicas reativas de baixo peso molecular que se ligavam a proteínas determinavam a formação de anticorpos ou substâncias anticorpo-símiles, supostamente responsáveis pela dermatite de contato alérgica. 40 anos depois, Shearer demonstrou que linfócitos T (LT) haptenospecíficos também respondem a esses complexos hapteno-proteicos (MARTINS; REIS, 2011).

São necessárias duas fases para atingir uma reação de hipersensibilidade cutânea máxima: Fase de sensibilização e fase de indução. Na primeira fase, a fase de sensibilização, acontece o primeiro contato do hapteno com a pele, que leva a expansão de células T hapteno-específicas nos linfonodos. As células dendríticas cutâneas migram da epiderme para a região paracortical dos linfonodos de drenagem, apresentando complexos de moléculas de histocompatibilidade principal/peptídeo conjugado a hapteno as células precursoras de células T hapteno-

específicas. As células T específicas saem dos linfonodos para o sangue e para órgãos linfoides secundários (HENNINO et al., 2005).

A fase de indução acontece horas após o contato posterior do hapteno com a pele, que vem a produzir quimiocinas, gerando ativação de células endoteliais e mastócitos, e infiltração de neutrófilos, que são necessários para recrutar células T específicas. As células cutâneas portando hapteno interagem com as células T. Ocorre produção de citocinas do tipo 1 pelas células células T CD8+ citotóxicas ativadas, induzindo a ativação de células cutâneas e a apoptose dos queratinócitos, o que gera a amplificação da inflamação pela produção do conjunto de citocinas e quimiocinas, sendo as últimas responsáveis pelo recrutamento de infiltrado celular polimorfo, que é característico de hipersensibilidade cutânea (HENNINO et al., 2005).

A fase da sensibilização dura cerca de 72 horas em humanos, e de 24 a 48 hora em camundongos. A reação inflamatória dura vários dias, diminuindo com a ativação de mecanismos de regulação negativa fisiológicos (HENNINO et al., 2005).

A prevalência da dermatite de contato alérgica nas diversas populações difere por ser fruto da peculiar exposição antigênica de cada região. Tendo a taxa de sensibilização de uma população sendo constantemente alterada, de acordo com mudanças na presença e exposição aos sensibilizantes (AYALA et al., 1996). Sendo frequente nos países industrializados, com grande impacto socioeconômico, sendo uma das doenças ocupacionais mais comuns (HENNINO et al., 2005).

4 METODOLOGIA

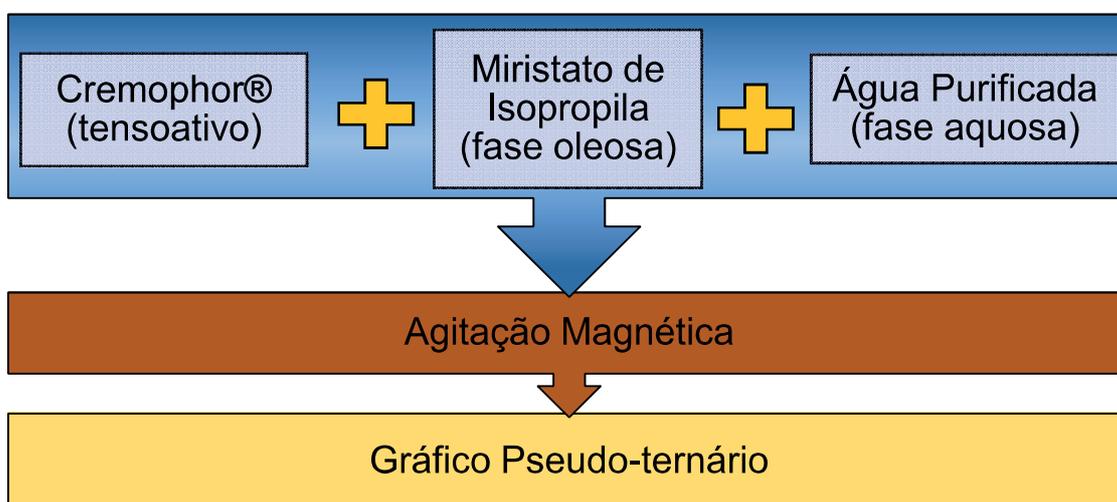
4.1 Desenvolvimento e caracterização de Microemulsão Gel-Like contendo óleo de Copaíba para uso tópico

4.1.1 Produção do diagrama de fase pseudo-ternário (DFPT)

Para a produção do DFPT, cremophor® foi misturado ao miristato de isopropila nas proporções de 1:9 a 9:1, como mostra a figura abaixo (Figura 1):

Com este procedimento, a transição de separação de fases, sistemas microemulsionados, emulsões semissólidas e emulsões líquidas puderam ser observados macroscopicamente. Com auxílio do software OriginPro 8® foi possível plotar os DFPT com suas regiões específicas bem delimitadas.

Figura 1. Produção do diagrama de fase pseudo-ternário.



Fonte: Modificado de (SILVA, 2014).

4.1.2 Seleção das formulações

Partindo-se dos diagramas obtidos, foi selecionada uma formulação do tipo microemulsão *gel-like* para incorporação do óleo de copaíba *in natura* em diferentes concentrações.

O processo de incorporação iniciou-se com a mistura do óleo de copaíba à fase oleosa (miristato de isopropila), seguindo da adição do tensoativo. Essa mistura foi colocada sob agitação no sonicador (modelo: DES500, Unique) por 1 min. Após essa primeira etapa, foi adicionada a água, de forma fracionada em três partes, e após cada adição a mistura foi sonicada por 1 min. Ao final, cada formulação obtida foi levada ao banho de ultra-som por 2 min. As amostras foram acondicionadas à temperatura ambiente por 48 horas para estabilização até poder ser utilizada para caracterização, estudo preliminar de estabilidade e estudo *in vivo*.

4.1.3 Caracterização físico-química das formulações

Foram analisadas alíquotas das formulações, incluindo-se as formulações brancas (sem a adição do óleo de Copaíba).

4.1.3.1 Potencial hidrogeniônico (pH)

O pH das formulações foi determinado em pHmetro. As amostras foram diluídas em água (1:10) e as medições foram realizadas em triplicata.

4.1.3.2 Condutividade elétrica

Para a determinação da condutividade elétrica foi utilizado um condutivímetro de bancada. As análises foram realizadas em triplicata após diluição das amostras em água (1:10).

4.1.3.3 Espalhabilidade

A determinação da espalhabilidade foi realizada em duplicata de acordo com metodologia descrita previamente (Knorst, 1991). Uma placa-molde circular de vidro com orifício central foi colocada sobre uma placa-suporte de vidro, posicionada sobre uma escala milimetrada. A amostra foi introduzida no orifício da placa-molde, e em seguida, foi colocada uma placa de vidro de peso conhecido. Após um minuto, foi realizada a leitura dos diâmetros abrangidos pela amostra, na vertical e horizontal, com auxílio da escala de papel milimetrado. Acrescentou-se sucessivamente outras placas, em intervalos de um minuto, até que 10 placas fossem colocadas. Posteriormente calculou-se o diâmetro médio. A espalhabilidade foi calculada de acordo com a equação abaixo (equação 1):

Equação 1. Equação para Cálculo da Espalhabilidade.

$$Ei = d^2 \cdot \frac{\pi}{4}$$

Legenda: Ei: espalhabilidade da amostra para um determinado peso (mm²);
d: diâmetro médio (mm).

4.1.4 Estabilidade Preliminar

A estabilidade das formulações foi avaliada conforme o Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos (BRASIL et al., 2004) contemplando as análises de centrifugação, estresse térmico e estabilidade preliminar (ciclo gelo-degelo).

4.1.4.1 Centrifugação

O teste de centrifugação produz condições de estresse nas amostras através do aumento na força de gravidade, aumentando-se a mobilidade das partículas de forma a simular possíveis instabilidades que poderão ser observadas na forma de precipitação, separação de fases, formação de caking e coalescência. Para tanto, as amostras foram centrifugadas a temperatura, tempo e velocidade padronizados

como se segue: Alíquotas de cada formulação foram acondicionadas em microtubos do tipo Eppendorf e submetidas a ciclos de 1000, 2500, 3500, 5000 e 7000 rpm (ou 89, 559, 1095, 2236 e 4382 g) por 15 minutos em cada rotação, à temperatura ambiente. Ao fim de cada ciclo observou-se em cada amostra a ocorrência de possíveis modificações no sistema como separação de fases e formação de precipitados (BRASIL, 2004).

4.1.4.2 Estresse térmico

Nesta etapa, as amostras foram submetidas a aquecimento em banho termostaticado na faixa de temperatura de 40 a 80 °C. O aumento da temperatura foi feito de forma gradativa de 5 em 5 °C, mantendo-se as amostras em cada temperatura por 30 minutos para então proceder-se com a leitura, classificando-se as amostras como: sem alteração (SA), levemente modificada (LM), modificada (M), intensamente modificada (IM) e separação de fases (SF).

4.1.4.3 Ciclo gelo/degelo

No ciclo gelo-degelo as amostras foram submetidas alternadamente a 4 °C por 24 h e 45 °C por 24 h. A leitura dos parâmetros avaliados foi realizada antes do teste (após 24 h de preparo) e ao final de cada ciclo (corresponde à 48h: 24 h na geladeira e 24 h na estufa). Desta forma, as amostras foram submetidas a 6 ciclos na geladeira e 6 ciclos na estufa, alternadamente, totalizando-se 12 dias de análise. Após esta etapa, as amostras foram avaliadas quanto às características organolépticas, pH e condutividade.

4.2 Avaliação *in vivo* da atividade anti-inflamatória do óleo de Copaíba ou de microemulsão contendo óleo de Copaíba

4.2.1 Animais

Foram utilizados camundongos Swiss fêmeas (n= 6 por grupo), pesando entre 25 e 35 g, provenientes do Biotério da UNIFACISA de Campina Grande/PB.

Estes animais foram mantidos em temperatura (22 ± 2 °C) e umidade (60-80%) controladas, ciclo claro/escuro de 12 horas e com livre acesso a água e ração.

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 (CEUA) da UNIFACISA de Campina Grande/PB (Projeto n° 0039/18122013; CIAEP/CONCEA n° 01.001.2012) (ANEXO A).

4.2.2 Indução da dermatite alérgica

O Cloro-2,4dinitrobenzeno (DNCB) foi usado para induzir a dermatite. Foi feita tricotomia de uma área de aproximadamente 8 cm² da região dorsal de cada animal onde 200 µL de uma solução de DNCB 1% (dissolvido em uma mistura de 3:1 de acetona e óleo de oliva) foram aplicados por 7 dias consecutivos para sensibilização. Sete dias após este período de sensibilização os animais voltaram a receber a aplicação tópica diária de 200 µL de solução de DNCB 0,5% durante 4 semanas (Figura 2).

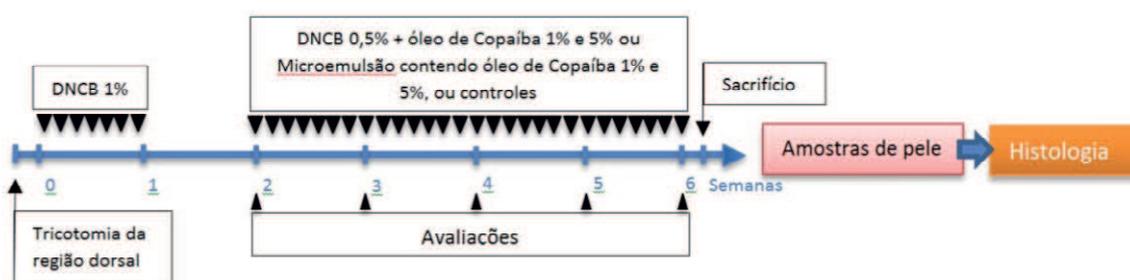
4.2.3 Tratamentos

Sete dias após a fase de sensibilização (aplicação diária de solução de 200 µL de DNCB 1% por 7 dias consecutivos), os animais receberam aplicação de 200 µL de DNCB 0,5%, diariamente por 4 semanas, tendo recebido os tratamentos 1 hora após a aplicação do DNCB de acordo com a divisão dos grupos que se segue:

- MICRO B (controle negativo): Animais que receberam a administração tópica diária de 200 µl de microemulsão branca (microemulsão sem óleo de copaíba);
- MIRISTATO (controle negativo): Animais que receberam a administração tópica diária de 200 µl miristato de isopropila;
- DEXA (controle positivo): Animais que receberam a administração tópica diária de 1 g/kg de creme de dexametasona (1 mg/g);
- COP 1%: (tratamento): Animais que receberam a administração tópica diária de 200 µL de óleo de Copaíba 1% (em Miristato de Isopropila);
- COP 5% (tratamento): Animais que receberam a administração tópica

- diária de 200 μ L de óleo de Copaíba 5% (em Miristato de Isopropila);
- MICRO 1%: (tratamento): Animais que receberam a administração tópica diária de 200 μ L de microemulsão contendo óleo de Copaíba 1%;
 - MICRO 5%: (tratamento): Animais que receberam a administração tópica diária de 200 μ L de microemulsão contendo óleo de Copaíba 5%;

Figura 2. Protocolo de indução da dermatite alérgica e aplicação dos tratamentos.



4.2.4.1 Peso

Todos os animais foram pesados semanalmente. A variação de peso foi expressa como a diferença entre o peso atual e aquele aferido no início do experimento (Δ).

4.2.4.2 Observação clínica da dermatite

A severidade da dermatite foi avaliada por seus sinais e sintomas clínicos (MATSUBARA et al., 2009), uma vez por semana durante as 4 semanas dos tratamentos (Figura 2). O escore total de severidade clínica foi definido como a soma dos graus de cada escore: 0 (nenhum), 1 (fraco), 2 (moderado), e 3 (severo) para cada uma das 4 manifestações: eritema/hemorragia, edema/papulação, escoriação/erosão e ressecamento/escamação.

4.2.4.3 Exame histológico

No final das 6 semanas do experimento todos os animais foram eutanasiados de acordo com as orientações, normas e considerações éticas aprovadas pelo Comitê

de Ética no uso de animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Médicas de Campina Grande/PB, e amostra da pele da região dorsal de cada camundongo foi retirada e fixada em formalina 10%. O material foi processado para inclusão em parafina seguindo protocolo de desidratação em etanol, diafanização com xilol, infiltração e emblocamento em parafina. Foram realizados cortes de 5 μm que foram corados com hematoxilina-eosina (H&E) para análise em microscópio óptico. Alterações histopatológicas como espessuras da epiderme, derme e hipoderme foram avaliadas.

4.3 Análise estatística

Os dados foram expressos como a média \pm erro padrão da média. Análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo Teste de Newman-Keuls foram utilizados para comparação entre os grupos. Foram consideradas significativas as diferenças com $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

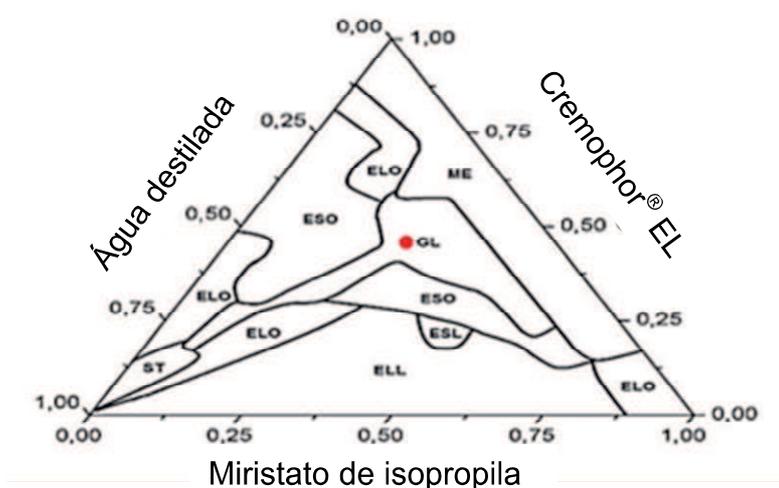
5.1 Desenvolvimento e caracterização de Microemulsão Gel-Like contendo óleo de Copaíba para uso tópico

5.1.1 Produção do diagrama de fase pseudo-ternário

O DFPT obtido está representado na figura 3. Percebe-se a presença de regiões representando os diferentes estados apresentados pelas combinações dos componentes do sistema, em especial as regiões formadoras de Microemulsão Gel-like, das quais foi selecionada a formulação para incorporação do óleo de Copaíba (Tabela 1).

O tensoativo não iônico selecionado, cremophor® EL, possui menor toxicidade quando comparados com os tensoativos iônicos e apresenta boa compatibilidade cutânea (TENJARLA, 1999). Contudo, foi escolhido o ponto para formulação que conteve a menor proporção de tensoativos, a fim de obterem-se formulações mais adequadas ao uso tópico local.

Figura 3. Diagramas de fase pseudo-ternário evidenciando o ponto de formulação de Microemulsão (ME) *gel-like*.



Legenda: ESO – sistema opaco; ELO – emulsão líquida opaca; ELL – emulsão líquida leitosa; ESL – emulgel; ST – Sistema Transparente; ME – microemulsão;
 ●GL- Microemulsão *gel-like*.

5.1.2 Incorporação do óleo de Copaíba na formulação

Duas concentrações do óleo de copaíba foram estabelecidas para incorporação na formulação anteriormente descrita: 1% (MICRO 1%) e 5% (MICRO 5%) e uma formulação sem o óleo de Copaíba (MICRO B). A incorporação do óleo de Copaíba no sistema proposto não acarretou instabilidade termodinâmica neste uma vez que as características de limpidez e transparência foram conservadas.

Tabela 1. Proporção dos componentes na formulação escolhida

Componentes	Percentagem (%) da formulação MICRO 1%	Percentagem (%) da formulação MICRO 5%	Percentagem (%) da MICRO B
Água destilada	47,1	47,1	47,1
Cremonophor [®] EL	31,7	31,7	31,7
Miristato de isopropila	20,2	16,2	21,2
Óleo de copaíba	1	5	-

Legenda: MICRO 1%: Microemulsão contendo 1% de óleo de copaíba, MICRO 5%: Microemulsão contendo 5% de óleo de copaíba e MICRO B: Microemulsão sem óleo de copaíba.

5.1.3 Caracterização físico-química das formulações incorporadas com o óleo de Copaíba

5.1.3.1 Potencial hidrogeniônico

Na análise do pH dos sistemas avaliou-se sua adequabilidade das formulações para uso tópico local (Tabela 2).

A padronização do pH ideal de uma formulação é feita de acordo com o pH de estabilidade dos componentes ativos presentes na formulação, e na tolerância biológica para produtos cutâneos, que varia de 5,5 a 8,0 (SILVA et al., 2009). A médias de pH das três formulações se encontra dentro da faixa de tolerância biológica sendo totalmente compatível com o pH da pele.

5.1.3.2 Condutividade elétrica

Nas formulações estudadas os valores de condutividade elétrica obtidos estão representados na tabela 2.

Tabela 2. Médias das triplicatas de pH e condutividade elétrica das formulações

Formulação	Parâmetro físico-químico	
	pH	Condutividade (σ)
MICRO B	6,31 \pm 0,03	49,46 \pm 0,19
MICRO 1%	6,38 \pm 0,05	44,54 \pm 0,13
MICRO 5%	6,34 \pm 0,02	42,76 \pm 0,09

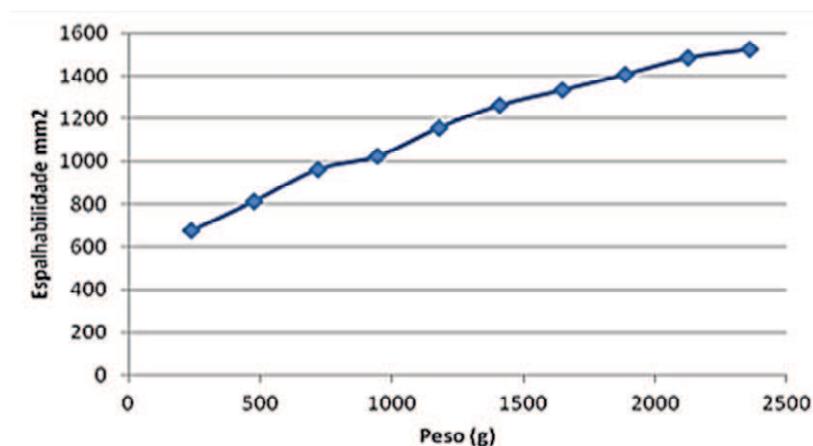
Legenda: MICRO 1%: Microemulsão contendo 1% de óleo de copaíba, MICRO 5%: Microemulsão contendo 5% de óleo de copaíba e MICRO B: Microemulsão sem óleo de copaíba.

Microemulsões que apresentam gotículas de água dispersas em óleo (microemulsões A/O) apresentam condutividade elétrica baixa, fato que se deve ao isolamento das gotículas de água pelo tensoativo. A condutividade passa a aumentar com o aumento da quantidade de água no sistema, que causa a formação de interligações entre as gotículas de água, o que dá origem a microemulsões gel-like (ou bicontínuas), que apresentam uma condutividade elétrica mais alta (ZHANG; MICHNIAK-KOHN, 2011).

5.1.3.3 Espalhabilidade

Na determinação da espalhabilidade, os resultados estão expressos como espalhabilidade da amostra em função do peso aplicado (Figura 4).

Uma das principais características das microemulsões é a espalhabilidade, pois está diretamente relacionada a sua aplicação local (KNORST, 1991). A Figura 4 mostra que a espalhabilidade da microemulsão contendo 5% de óleo de copaíba (MICRO 5%) aumenta de acordo com o peso aplicado sobre a mesma. Esse dado informa que a microemulsão se espalha sobre uma significativa área de superfície, sob ação de determinado peso.

Figura 4. Espalhabilidade da formulação MICRO 5%.

5.1.4 Estabilidade Preliminar

Ao fim de cada um dos ciclos de centrifugação 1000, 2500, 3500, 5000 e 7000 rpm (89, 559, 1095, 2236 e 4382 g, respectivamente), as formulações permaneceram estáveis, sem nenhuma alteração visível e sem apresentar separação de fases.

No teste de estresse térmico, após permanecer por 30 minutos em cada temperatura, as formulações começaram a sofrer influência da temperatura entre 70 e 80 °C (Tabela 3), se mostrando intensamente modificadas na temperatura de 80 °C, mas sem apresentar separação de fases.

Na avaliação do ciclo gelo-degelo, as formulações permaneceram estáveis durante os 6 ciclos de 48 h (24 h na geladeira/24 h na estufa), não sofrendo alterações como turvação ou separação de fases. Ao término do ciclo gelo/degelo, avaliou-se o pH e condutividade elétrica das formulações, não se observando mudanças significativas nestes valores.

Tabela 3. Resultados do estresse térmico.

Formulação	Temperatura do estresse térmico (°C)								
	40	45	50	55	60	65	70	75	80
MICRO B	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	LM	IM
MICRO 1%	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	LM	IM
MICRO 5%	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	LM	IM

Legenda: SA: sem alteração; LM: levemente modificada; IM: intensamente modificada.

De acordo com os resultados de estabilidade preliminar (centrifugação, estresse térmico e ciclo gelo-degelo) pode se atestar, desta forma, a estabilidade físico-química das formulações, demonstrando que as mesmas podem ser utilizadas nos testes *in vivo* da avaliação anti-inflamatória do óleo de copaíba.

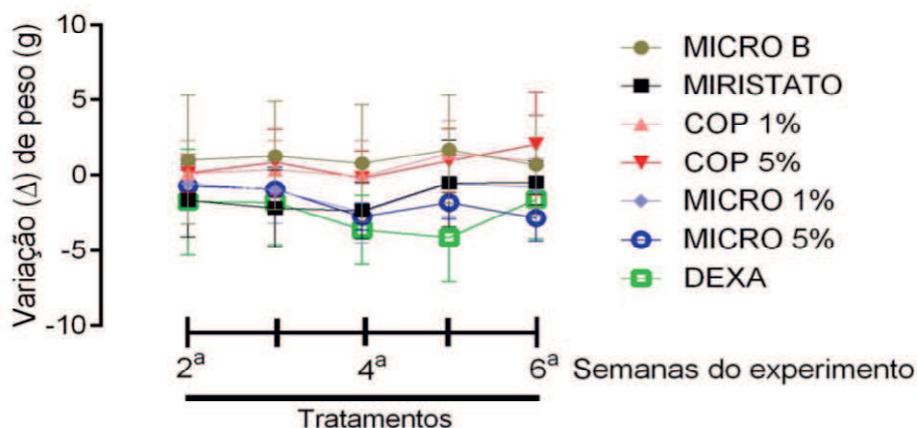
5.2 Avaliação *in vivo* da atividade anti-inflamatória do óleo de copaíba ou de microemulsão contendo óleo de copaíba

5.2.1 Avaliação dos efeitos dos tratamentos sobre a dermatite alérgica

5.2.1.1 Peso

Não houve diferença estatística significativa entre os grupos em todos os tempos avaliados ($p < 0,05$, Figura 5)

Figura 5. Variação do peso dos animais durante o experimento.

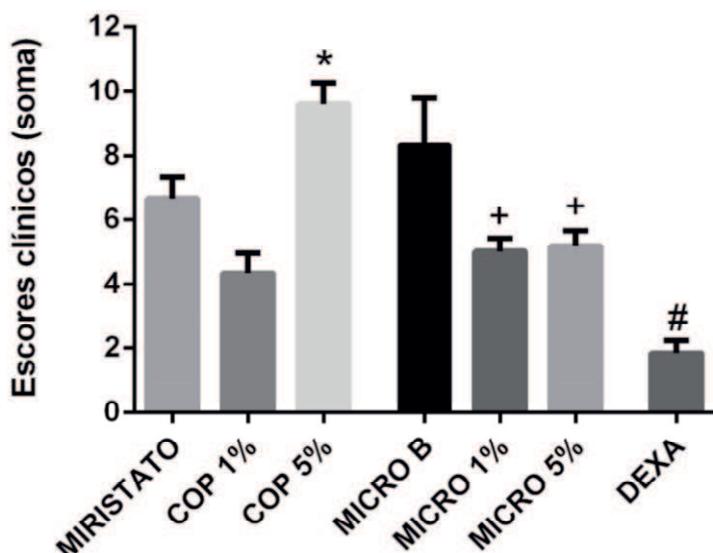


Legenda: A variação de peso está expressa como a diferença entre o peso atual e o peso no início do experimento (Δ). Não houve diferença estatística significativa entre os grupos nos diversos tempos estudados ($p < 0,05$). MIRISTATO (Miristato de Isopropila); COP 1% (óleo de Copaíba a 1%); COP 5% (óleo de Copaíba a 5%); MICRO B (Microemulsão branca); MICRO 1% (Microemulsão com 1% de óleo de Copaíba); MICRO 5% (Microemulsão com 5% de óleo de Copaíba); DEXA (Creme de Dexametasona 1mg/g).

5.2.1.2 Observação clínica da dermatite

A soma dos escores clínicos da dermatite tomados ao final do experimento (semana 6) mostrou que as microemulsões 1% (MICRO 1%) e 5% (MICRO 5%) foram efetivas em reduzir a severidade da dermatite quando comparadas com o controle microemulsão branca (MICRO B) ($p < 0,05$). Já a aplicação do óleo de Copaíba 5% (COP 5%) agravou significativamente os escores, enquanto que a aplicação do óleo de Copaíba 1% (COP 1%) os reduziu de forma não significativa estatisticamente, ambos comparadas com o grupo controle Miristato de Isopropila (MIRISTATO). ($p < 0,05$, Figura 6)

Figura 6. Escores clínicos da dermatite ao final do experimento (semana 6).

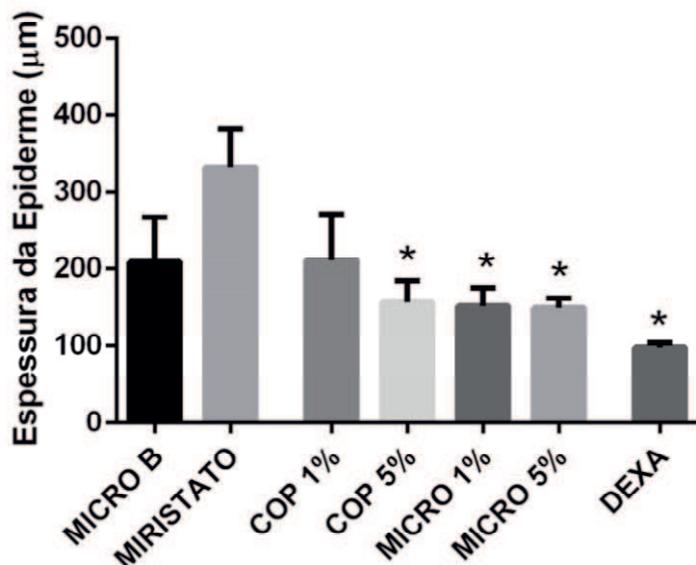


Legenda: MIRISTATO (Miristato de Isopropila); COP 1% (óleo de Copaíba a 1%); COP 5% (óleo de Copaíba a 5%); MICRO B (Microemulsão branca); MICRO 1% (Microemulsão com 1% de óleo de Copaíba); MICRO 5% (Microemulsão com 5% de óleo de Copaíba); DEXA (Creme de Dexametasona 1mg/g). *Diferente do grupo MIRISTATO; +Diferente do grupo MICRO B; #Diferente de todos os outros grupos; $p < 0,05$.

5.2.1.3 Exame histológico

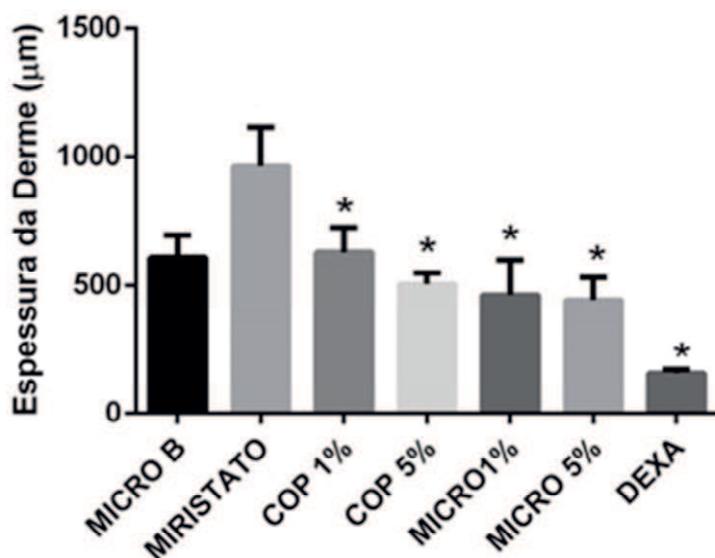
Quando se avaliou a espessura da epiderme, os animais dos grupos COP 1%, MICRO 1% e MICRO 5% apresentaram valores inferiores aqueles do grupo MIRISTATO. Da mesma forma, os animais do grupo DEXA apresentaram as epidermes mais delgadas comparado a todos os outros grupos ($p < 0,05$, figura 7). Quando a derme teve sua espessura avaliada, observou-se efeito muito semelhante, pois em todos os grupos obteve-se valores significativamente menores que aqueles do grupo MIRISTATO ($p < 0,05$, Figura 8). A espessura da hipoderme ficou significativamente menor nos animais do grupo DEXA quando comparado com todos os outros grupos, que tiveram valores muito semelhantes entre si ($p < 0,05$, Figura 8).

Figura 7. Espessura da epiderme obtida ao final do experimento.



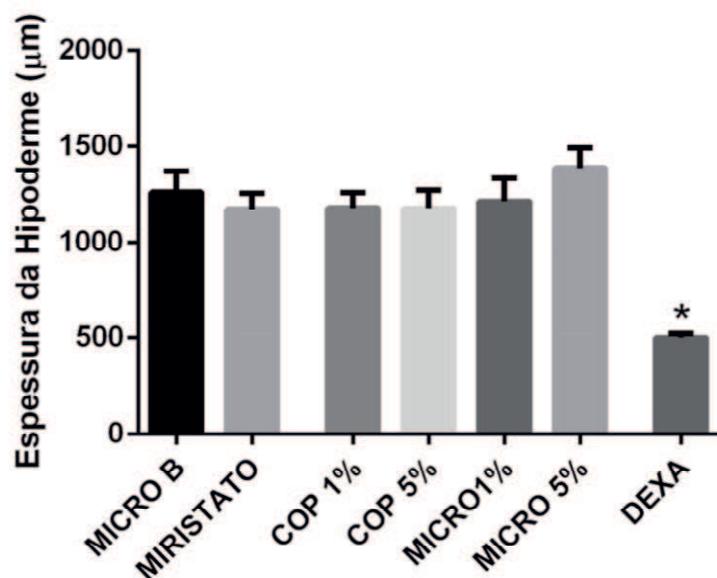
Legenda: MIRISTATO (Miristato de Isopropila); COP 1% (óleo de Copaíba a 1%); COP 5% (óleo de Copaíba a 5%); MICRO B (Microemulsão branca); MICRO 1% (Microemulsão com 1% de óleo de Copaíba); MICRO 5% (Microemulsão com 5% de óleo de Copaíba); DEXA (Creme de Dexametasona 1mg/g). *Diferente do grupo MIRISTATO, $p < 0,05$.

Figura 8. Espessura da derme obtida ao final do experimento.



Legenda: MIRISTATO (Miristato de Isopropila); COP 1% (óleo de Copaíba a 1%); COP 5% (óleo de Copaíba a 5%); MICRO B (Microemulsão branca); MICRO 1% (Microemulsão com 1% de óleo de Copaíba); MICRO 5% (Microemulsão com 5% de óleo de Copaíba); DEXA (Creme de Dexametasona 1mg/g). *Diferente do grupo MIRISTATO, $p < 0,05$.

Figura 9. Espessura da hipoderme obtida ao final do experimento.



Legenda: MIRISTATO (Miristato de Isopropila); COP 1% (óleo de Copaíba a 1%); COP 5% (óleo de Copaíba a 5%); MICRO B (Microemulsão branca); MICRO 1% (Microemulsão com 1% de óleo de Copaíba); MICRO 5% (Microemulsão com 5% de óleo de Copaíba); DEXA (Creme de Dexametasona 1mg/g). *Diferente de todos os demais grupos, $p < 0,05$.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As microemulsões foram obtidas satisfatoriamente e apresentaram bons resultados nos estudos de estabilidade preliminares realizados. O modelo de dermatite alérgica mostrou-se convincente com seus controles funcionando como o esperado. Avaliando os atuais resultados em conjunto, podemos dizer que as microemulsões contendo óleo de Copaíba a 1% e 5% mostraram-se efetivas em amenizar os efeitos da dermatite alérgica. O óleo de copaíba a 5% agrava os escores clínicos da dermatite. Assim, podemos dizer que nosso sistema microemulsionado contendo o óleo de Copaíba tem potencial e merece estudos posteriores.

REFERÊNCIAS

AKDIS, C. A. et al. Diagnosis and treatment of atopic dermatitis in children and adults: European Academy of Allergology and Clinical Immunology/American Academy of Allergy, Asthma and Immunology/PRACTALL Consensus Report. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 118, n. 1, p. 152–169, 1 jul. 2006.

AYALA, F. et al. Statistical evaluation of the persistence of acquired hypersensitivity by standardized patch tests. **Contact Dermatitis**, v. 34, n. 5, p. 354–358, 1 maio 1996.

BASILE, A. C. et al. Anti-inflammatory activity of oleoresin from Brazilian *Copaifera*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 22, n. 1, p. 101–109, 1 jan. 1988.

BRASIL et al. **Guia de estabilidade de produtos cosméticos**. Brasília: ANVISA, , 2004.

CARVALHO, J. C. T. et al. Topical antiinflammatory and analgesic activities of *Copaifera duckei dwyer*. **Phytotherapy Research**, v. 19, n. 11, p. 946–950, 1 nov. 2005.

CASCON, V.; GILBERT, B. Characterization of the chemical composition of oleoresins of *Copaifera guianensis Desf.*, *Copaifera duckei Dwyer* and *Copaifera multijuga Hayne*. **Phytochemistry**, v. 55, n. 7, p. 773–778, 1 dez. 2000.

CHIN, Y.-W. et al. Drug discovery from natural sources. **The AAPS Journal**, v. 8, n. 2, p. E239–E253, 2006.

CONSTANTINIDES, P. P. Lipid Microemulsions for Improving Drug Dissolution and Oral Absorption: Physical and Biopharmaceutical Aspects. **Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 11, p. 1561–1572, 1995.

CORREIA, M. P. **DICIONÁRIO DAS PLANTAS ÚTEIS DO BRASIL**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 1931.

FANUN, M. Microemulsions as delivery systems. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 17, n. 5, p. 306–313, out. 2012.

FERNANDES, E. F. A. **Estudo do metabolismo in vitro do diterpeno ácido caurenoico**. Ribeirão Preto: Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo, 11 mar. 2013.

FORMARIZ, T. P. et al. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 3, p. 301–313, set. 2005.

GOMES, N. M. et al. Antinociceptive activity of Amazonian Copaiba oils. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, n. 3, p. 486–492, 12 fev. 2007.

GRAMPUROHIT, N. Microemulsions For Topical Use– A Review. **Indian Journal of Pharmaceutical Research and Education**, v. 45, n. 1, 2011.

HENNINO, A. et al. **Fisiopatologia da dermatite de contato alérgica: papel das células T CD8 efectoras e das células T CD4 regulatórias** *An Bras Dermatol.* [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/abd/v80n4/v80n4a03.pdf>>. Acesso em: 8 out. 2018.

KNORST, M. T. Desenvolvimento Tecnológico de Forma Farmacêutica Plástica Contendo Extrato Concentrado de *Achyrocline satureioides* (LAM.) DC. *Compositae* (Marcela). p. 257, 1991.

LEUNG, D. Y. M. Atopic dermatitis: New insights and opportunities for therapeutic intervention. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 105, n. 5, p. 860–876, 1 maio 2000.

MARTINS, L. E. A. M.; REIS, V. M. S. DOS. Imunopatologia da dermatite de contato alérgica. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 3, p. 419–433, jun. 2011.

MATSUBARA, T. et al. Serum and monoclonal immunoglobulin E antibodies from NC/Nga mice with severe atopic-like dermatitis recognize an auto-antigen, histone H3. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 39, n. 4, p. 579–590, 1 abr. 2009.

OLIVEIRA, A. G. DE et al. Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 131–138, fev. 2004.

PAIVA, L. A. . et al. Gastroprotective effect of *Copaifera langsdorffii* oleo-resin on experimental gastric ulcer models in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 62, n. 1, p. 73–78, 1 ago. 1998.

PAIVA, L. A. . et al. Attenuation of ischemia/reperfusion-induced intestinal injury by oleo-resin from *Copaifera langsdorffii* in rats. **Life Sciences**, v. 75, n. 16, p. 1979–1987, 3 set. 2004.

PUGLIARELLO, S. et al. Phenotypes of atopic dermatitis. **JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, v. 9, n. 1, p. 12–20, 1 jan. 2011.

ROBINSON, M. M.; ZHANG, X. **Traditional Medicines: Global Situation, Issues And Challenges**. The World ed. Geneva , Switzerland: WHO Press, 2011.

SAEKI, H. [THE BRIEF COMMENTARY ON GUIDELINES FOR THE MANAGEMENT OF ATOPIC DERMATITIS 2015--the point of drug treatment]. **Arerugi = [Allergy]**, v. 64, n. 10, p. 1306–12, dez. 2015.

SANTOS, A. O. et al. Effect of Brazilian copaiba oils on *Leishmania amazonensis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, n. 2, p. 204–208, 20 nov. 2008.

SILVA, J. A. DA et al. Estudo de liberação e permeação in vitro do diclofenaco de dietilamônio em microemulsão gel-like. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1389–1393, 2009.

SILVA, N. E. DE S. E. Desenvolvimento e caracterização de microemulsões e emulsões gel-like para uso tópico local. 3 jul. 2014.

SOMOVA, L. . et al. Cardiovascular and diuretic activity of kaurene derivatives of *Xylopiya aethiopyca* and *Alepidea amatymbica*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 77, n. 2–3, p. 165–174, 1 out. 2001.

SOUZA, F. D. R. DE. **O manejo do óleo-resina de *Copaifera* spp. realizado pelas etnias Arara (Karo rap) e Gavião (Ikolen) na Terra Indígena Igarapé Lourdes, Rondônia. (Dissertação). Programa De Pós Graduação Em Biologia Tropical E Recursos Naturais Da Amazônia, Instituto Nacio.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <http://bdtd.inpa.gov.br/bitstream/tede/1112/1/Dissertacao_Flavia_Souza.pdf>. Acesso em: 8 out. 2018.

TENJARLA, S. Microemulsions: An Overview and Pharmaceutical Applications. **Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 16, n. 5, p. 62, 1999.

THESTRUP-PEDERSEN, K. Clinical aspects of atopic dermatitis. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 25, n. 7, p. 535–543, 1 set. 2000.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C. O gênero *copaifera* L. **Química Nova**, v. 25, n. 2, p. 273–286, maio 2002.

VEIGA, V. F.; PATITUCCI, M. L.; PINTO, A. C. **CONTROLE DE AUTENTICIDADE DE ÓLEOS DE COPAÍBA COMERCIAIS POR CROMATOGRAFIA GASOSA DE ALTA RESOLUÇÃO.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v20n6/v20n6a07.pdf>>. Acesso em: 8 out. 2018.

ZEKOVIĆ, Z. et al. Chromatography in our investigations of camomile (*Matricaria chamomilla* L.). **Chromatographia**, v. 39, n. 9–10, p. 587–590, nov. 1994.

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, n. 1, p. 34–44, 12 dez. 2011.

ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS





**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

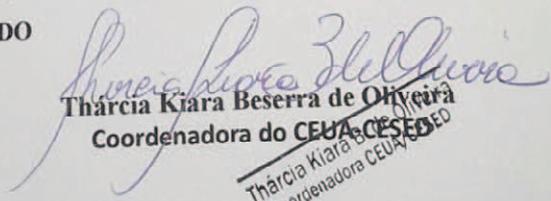
1. Pesquisador Responsável:
 Karina Lidiane Alcântara Saraiva

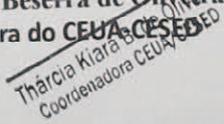
Título do Projeto:
 Óleos Vegetais da Flora Brasileira Aplicados a Nanomedicina

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


 Thárcia Kiara Beserra de Oliveira
 Coordenadora CEUA/CESED



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