



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**JAMILLY KELLY OLIVEIRA NEVES**

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROEMULSÕES  
ANTIMICROBIANAS E ANTI-INFLAMATÓRIAS CONTENDO ÓLEO DE  
COPAÍBA (*Copaifera multijuga*)**

CAMPINA GRANDE – PB  
2013

**JAMILLY KELLY OLIVEIRA NEVES**

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROEMULSÕES  
ANTIMICROBIANAS E ANTI-INFLAMATÓRIAS CONTENDO ÓLEO DE  
COPAÍBA (*Copaifera multijuga*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), em cumprimento à exigência para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. José Alexsandro da Silva  
Co-orientador: Prof. Dr. Valdir Florêncio da Veiga Júnior

CAMPINA GRANDE – PB  
2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL – UEPB

N518d

Neves, Jamilly Kelly Oliveira.

Desenvolvimento e caracterização de microemulsões antimicrobianas e anti-inflamatórias contendo óleo de copaíba (*Copaifera multijuga*) [manuscrito] / Jamilly Kelly Oliveira Neves. – 2013.

128 f. : il. color.

Digitado.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual da Paraíba, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, 2013.

“Orientação: Prof. Dr. José Alexsandro da Silva, Departamento de Farmácia.”

“Co-Orientação: Prof. Dr. Valdir Florêncio da Veiga Júnior, Departamento de Farmácia”.

1. Óleo de copaíba. 2. Fitoterapia. 3. Atividade antimicrobiana. I. Título.

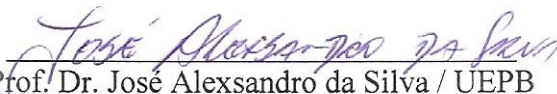
21. ed. CDD 615.321

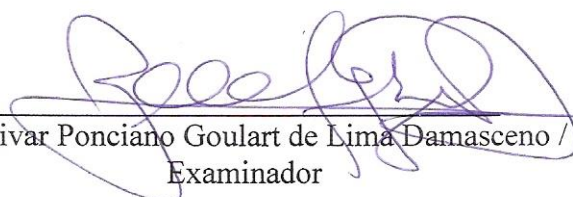
**JAMILLY KELLY OLIVEIRA NEVES**

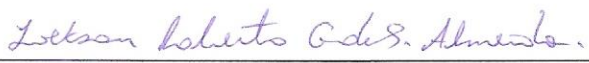
**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROEMULSÕES  
ANTIMICROBIANAS E ANTI-INFLAMATÓRIAS CONTENDO ÓLEO DE  
COPAÍBA (*C. multijuga*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós  
Graduação em Ciências Farmacêuticas da  
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), em  
cumprimento à exigência para obtenção do  
título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 27/06/2013 .

  
Prof. Dr. José Alessandro da Silva / UEPB  
Orientador

  
Prof. Dr. Bolivar Ponciano Goulart de Lima Damasceno / UEPB  
Examinador

  
Prof. Dr. Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida / UNIVASF  
Examinador



*“Posso, tudo posso Naquele que me fortalece. Nada e ninguém no mundo vai me fazer desistir.  
Quero, tudo quero sem medo entregar meus projetos.  
Deixar-me guiar nos caminhos que Deus desejou pra mim...”*  
*(Padre Fábio de Melo)*

Eternamente à minha mãe.  
O meu motivo de sempre lutar e não desistir nunca.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, *“Tudo é do Pai, toda honra e toda glória, é Dele a vitória alcançada em minha vida”*. Obrigada Senhor pela fé, por me manter crente em dias melhores mesmo em momentos difíceis, em que o mundo grita *“Você não vai conseguir”*, e o Senhor sussurra *“Você já conseguiu, pois estou ao teu lado”*.

Ao meu querido orientador Prof. Dr. José Alexandro, pela oportunidade e confiança em meu trabalho. Pela paciência, ensinamentos, experiência, pelo exemplo como professor, pesquisador e principalmente como ser humano, exemplo de responsabilidade, honestidade e humildade. Muito obrigada por tudo professor!

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Valdir Veiga Júnior, por sua colaboração em nosso trabalho.

À minha mãe, por ser minha fonte de força e coragem, que me faz sempre acreditar que sou capaz. Pelo apoio em TUDO que faço, em tudo que sonho, em tudo que almejo. Minha maior alegria em chegar onde estou e em acreditar que posso ir mais longe é somente em te dar orgulho e gratidão por tudo o que fizestes por mim. A senhora é a maior representação da palavra amor, da palavra mãe. Que um dia meus futuros filhos possam cultivar por mim este sentimento divino, inabalável, incomparável que sinto por você. Eu te amo mais que tudo em minha vida mainha.

Ao meu pai, meu irmão Neto, a minha cunhada Daniela e minha sobrinha e afilhada Sofia, por serem a minha família. Como Deus foi maravilhoso em me presentear com vocês. Meu amor maior, meu alicerce, minha base. *“Percebe e entende que os melhores amigos são aqueles que estão em casa esperando por ti. Acredita, nos momentos mais difíceis da vida eles sempre estarão por perto, pois só sabem te amar... (Anjos de Resgate)”*

A minha avó materna Terezinha e aos meus avôs paternos, Vavá e Letinha por tanto se orgulharem de mim.

Ao meu namorado Eugênio Filho, por sua paciência durante meu mestrado, pelo apoio, dedicação, atenção e amor. Por acreditar em mim, em meus sonhos, meus objetivos. Sou muito feliz em tê-lo ao meu lado meu amor. *“Que Deus abençoe todo esse amor. Que seja lindo em seu coração, por que em mim eu sei... Amo você! (Catedral).”*

A todos da minha família iluminada, tias, tios, primas, primos, meus padrinhos Rosita e Assis, e em especial ao meu amado tio Romero e minha prima Valéria que não estão mais presentes em corpo, mas tenho certeza que estão em espírito aqui neste momento. Não tenho

dúvidas que os momentos mais difíceis desses dois últimos anos foi perder vocês. Como dói até hoje a falta que sinto, a vontade de ter o abraço e o beijo de vocês neste momento. Mas tenho certeza que estão ao lado do nosso Pai Celestial orando e cuidando de mim. Tio Romero e Lela não esqueçam nunca o quanto amo vocês, o quanto sou grata a Deus por tudo o que vivemos juntos e por ter tido o amor de vocês. Vocês fizeram parte desta história, vocês também são responsáveis por esta vitória em minha vida. *“Nunca esqueçam nenhum segundo, que eu tenho o amor maior do mundo. Como é grande o meu amor por vocês... (Roberto Carlos).”*

Ao Prof. Dr. Bolivar Damasceno, pelos seus grandes ensinamentos, pela paciência, e acima de tudo pela amizade.

A profa. Dra. Karina Saraiva, por ter contribuído bastante com o trabalho, com sua experiência na microscopia e na área biológica. Pelo apoio e confiança em me oferecer uma bolsa de pesquisa. Você é um exemplo de mulher guerreira, de uma verdadeira pesquisadora e de uma excelente professora.

Ao corpo docente do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, por todo o conhecimento transmitido.

Aos meus queridos e eternos amigos da primeira turma do Mestrado em Ciências Farmacêuticas (UEPB), pelos momentos de alegria, de desespero, de estudos, em todos os momentos estivemos juntos, por isto ficamos conhecidos como uma turma sempre unida. A todos obrigada por fazerem parte da minha vida. Com a história de cada um de vocês me fez ter a certeza que cada vez mais vale a pena lutar pra vencer.

Em especial ao meu eterno companheiro e amigo Geovani, pela força, paciência, ajuda, ensinamentos, por me escutar e sempre ter a palavra certa, o conselho certo. Acredito que Deus tem planos para tudo em nossa vida, nada acontece ao acaso. Não foi ao acaso eu ter feito este mestrado, e principalmente não foi ao acaso eu e você nos tornarmos companheiros de pesquisa. Talvez eu sozinha tivesse conseguido chegar até aqui, mas saiba que você tornou muito mais fácil e possível esta vitória. Sua amizade foi um verdadeiro presente de Deus.

Agradeço a Deus por ter colocado Airlla em meus caminhos. Creio que sua amizade foi uma providência divina. Obrigada amiga pela disposição em sempre ajudar, principalmente no teste do edema de pata, onde só você tinha experiência e nos ajudou com tanta boa vontade em ensinar e dedicação ao realizar o experimento. Como já te disse, o mérito deste experimento é todo seu, se não fosse você não teríamos conseguido. E muito obrigada por ser minha amiga, por me escutar, me compreender, acalmar, aconselhar, acompanhar nos grupos de oração e quando muitas vezes chorei você segurou firme minha mão e rezamos juntas.

Quero sua amizade eternamente, ela faz toda a diferença em minha vida. *“Amigos pra sempre, bons amigos que nasceram pela fé. Amigos pra sempre, para sempre amigos sim se Deus quiser... (Anjos de Resgate)”*.

Aos meus alunos de Iniciação Científica, Yargo, Gabriela Batista, Dayanne e Camila. Por todo o empenho, determinação, esforço, dedicação e confiança no nosso projeto. Se fosse para escolher novos ICs escolheria novamente vocês. Aprendi muito com cada um, nossa relação foi muito além de mestrando/IC, foi uma relação de verdadeira amizade e companheirismo. Acredito muito no potencial de vocês, tenho certeza que alcançarão todos os seus objetivos. A vocês só tenho que ofertar minha gratidão eterna, obrigada por tornarem possível a realização deste meu sonho.

Aos meus queridos amigos do Laboratório de Desenvolvimento de Produtos Farmacêuticos (LDCPF), por terem tornado meu trabalho mais prazeroso, meus dias mais alegres. Pela cooperação, pelo trabalho em equipe, pela solidariedade. Agradecer em especial a Aleksandra, por tanto ter me ajudado desde o início do meu projeto, por ter transmitido sua experiência na área e também por sua amizade.

A CAPES e ao CnPq pelo apoio financeiro que tornou possível o desenvolvimento do nosso projeto.

A todos os laboratórios parceiros que tornaram viáveis a realização de algumas técnicas que não possuímos na nossa Instituição: Centro de Estratégias do Nordeste (CETENE) pelas análises de microscopia eletrônica de transmissão e reologia, ao Núcleo de Desenvolvimento Analítico e Tecnológico (NUDATEC) pelo doseamento do  $\beta$ - cariofileno, Laboratório Multiusuário de Imagens da Faculdade de Ciências Farmacêuticas UNESP pela técnica de luz polarizada e ao Laboratório de análise térmica do CERTBIO/UEPB pela análise de calorimetria exploratória diferencial. Em especial ao LABDEM, principalmente a prof. Dra. Ana Cláudia, por sempre estar disponível a nos ajudar. Aos seus alunos, Ravely, Deysiane, Elaine e os demais que nos ajudaram com os ensaios microbiológicos.

Aos meus queridos alunos das turmas do estágio docência, pela experiência e confiança. Fizeram acreditar mais no meu sonho de um dia ser professora universitária. Vocês serão eternos em meu coração.

A todos que direto ou indiretamente contribuíram de alguma forma para realização deste trabalho.

## RESUMO

O óleo-resina de copaíba é extraído das Copaiibeiras, árvores comuns a América Latina e África Ocidental, encontradas em mais de 20 espécies no Brasil, distribuídas no Sudeste, Centro-Oeste e Amazônia. Dentre as várias atividades farmacológicas estudadas para este óleo, destacam-se a antimicrobiana e anti-inflamatória. É utilizado por via tópica ou oral, porém de forma indiscriminada, muitas vezes sem nenhum controle de qualidade. O uso extensivo deste óleo tem despertado cada vez mais o interesse da pesquisa farmacêutica em desenvolver formas farmacêuticas que o contenha. Desta forma, torna-se interessante o desenvolvimento de microemulsões (ME) de administração tópica do tipo O/A, a fim de melhorar a sua permeabilidade cutânea deste óleo, bem como o seu efeito terapêutico. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e caracterizar ME contendo o óleo de copaíba e avaliar sua atividade antimicrobiana e anti-inflamatória. Inicialmente foi determinado o Equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) do óleo *Copaifera multijuga* (11-12) e posteriormente foi definido o EHL da mistura de tensoativo/cotensoativo, direcionando a escolha dos diagramas de fases pseudoternários (2:1 e 4:1). Nas regiões de ME dos diagramas foram selecionadas 7 formulações e escolhidas duas (ME-F2 e ME-F6) para estudos de caracterização. Quanto ao pH, todas as formulações encontraram-se dentro da faixa do pH cutâneo. Todas as amostras, após centrifugação, mantiveram-se inalteradas. As técnicas de condutividade elétrica e Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) sugeriram um sistema do tipo O/A. A microscopia eletrônica de transmissão revelou gotículas esféricas de tamanhos uniformes inferiores a 200nm e de distribuição homogênea. A microscopia de luz polarizada mostrou campos escuros característicos de sistemas isotrópicos do tipo ME O/A. O tamanho das gotículas foi confirmado pela técnica de espalhamento de luz dinâmica onde foi observado um fenômeno de desestabilização por maturação de Ostwald, ocorrendo o aumento no diâmetro das gotículas quando o sistema foi diluído. As ME apresentaram potencial zeta negativo, baixa viscosidade e comportamento Newtoniano. As ME-F2 e ME-F6 apresentaram atividade para as cepas bacterianas *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* e para o fungo *Cryptococcus neoformans*. Em relação à atividade anti-inflamatória a ME-F6 apresentou atividade aguda superior ao controle positivo (Emulgel de diclofenaco dietilamônio). Já a ME-F2 apresentou um *lag time* até a terceira hora, porém menos intenso que o controle. Desta forma, os sistemas desenvolvidos tornam-se agentes promissores na terapêutica antimicrobiana e principalmente para inflamações agudas, podendo ser uma alternativa para utilização de anti-inflamatórios não esteroidais orais, reduzindo assim os efeitos colaterais. No entanto, tornam-se necessários mais estudos de controle de qualidade do óleo de copaíba visto as muitas variáveis em relação à composição e conseqüentemente a atividade farmacológica. Desta forma, deve-se padronizar a utilização deste óleo, como também realizar estudos de irritabilidade cutânea e toxicidade das formulações.

**PALAVRAS-CHAVE:** Atividade Anti-inflamatória, Atividade Antimicrobiana, Diagrama de fases, Microemulsão, Óleo de copaíba.

## ABSTRACT

Copaiba oil, extracted from the Copaiba plant, a common tree to Latin America and West Africa. It is found over 20 species in Brazil, throughout Southeast, Midwest and Amazon regions. Among the various pharmacological activities studied for this oil, antimicrobial and anti-inflammatory stand out. It is taken topically or orally, but indiscriminately, often without any quality control. The extensive use of this oil has attracted increasing interest in pharmaceutical research to develop pharmaceutical forms containing them. This way, it is interesting the development of topically administered microemulsions (ME) O/W, in order to improve the skin permeability of this oil, as well as its therapeutic effect. Thus, the aim of this study was to develop and characterize ME containing copaiba oil and evaluate its antimicrobial and anti-inflammatory activity. It was initially determined the hydrophile-lipophile balance (HLB) of the *Copaifera multijuga* oil (11-12) and it was subsequently defined the HLB of the mixture of surfactant/cosurfactant, guiding the choice of the pseudoternary phase diagrams (2:1 and 4:1). In ME regions of diagrams were selected seven formulations and chosen two (ME-F2 and ME-F6) for characterizing study. Regarding pH, all formulations were within the range of pH of the skin. All samples, after centrifugated, remained unchanged. The electrical conductivity and differential scanning calorimetry (DSC) techniques suggested a system of O/W. The transmission electron microscopy revealed spherical droplets of uniform size less than 200nm and homogeneous distribution. The polarized light microscopy showed dark fields that characterize isotropic systems of the type ME O/W. The size of the droplets was confirmed by dynamic light scattering (DLS) on which it was observed a phenomenon of destabilization by Ostwald ripening, increasing the diameter of the droplets when the system is diluted. All the ME showed negative zeta potential, low viscosity and Newtonian behavior. The ME-F2 and ME-F6 showed activity for the bacterial strain *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* and for the fungi *Cryptococcus neoforman*. Regarding the anti-inflammatory activity the ME-F6 showed acute activity higher than the positive control (diclofenac diethylamine emulgel). As for ME-F2, it presented a lag time up to the third hour, but less intense than the control one. Therefore, the systems developed become promising agents in antimicrobial therapy and particularly for acute inflammation, which can be an alternative to use oral nonsteroidal anti-inflammatory, thereby reducing side effects. However, it is necessary further studies for quality control of copaiba oil since there are many variables in relation to the composition and consequently the pharmacological activity. Thus, the use of this oil should be standardized as well as carried out studies of skin irritability and toxicity of the formulations.

**KEYWORDS:** Anti-Inflammatory, Antimicrobial Activity, Copaiba Oil, Microemulsion, Activity, Phase Diagram.

## LISTA DE TABELAS

|                  |  |    |
|------------------|--|----|
| <b>TABELA 1-</b> | Principais diferenças entre EM e ME  | 28 |
| <b>TABELA 2-</b> | Números de grupos de EHL   | 31 |
| <b>TABELA 3-</b> | Composição das emulsões para determinação do EHL do óleo de copaíba ( <i>C. multijuga</i> ).   | 39 |
| <b>TABELA 4-</b> | Composição centesimal das formulações utilizadas para os estudos de caracterização.  | 56 |
| <b>TABELA 5-</b> | Estudos de caracterização preliminar (pH, condutividade elétrica, índice de refração e centrifugação) das formulações em estudo.                       | 58 |
| <b>TABELA 6-</b> | Estudos de caracterização quanto ao tamanho de gotículas (DLS), IPD e potencial zeta das formulações em estudo (ME-F2 e ME-F6) e diluições sucessivas. | 68 |
| <b>TABELA 7-</b> | Concentração inibitória mínima (CIM) em relação às diluições (%) das substâncias testadas frente a cepas bacterianas.                                  | 80 |
| <b>TABELA 8-</b> | Concentração inibitória mínima (CIM) do óleo de copaíba <i>in natura</i> e das ME-F2 e ME-F6 frente a cepas bacterianas.                               | 80 |



## LISTA DE FIGURAS

|                   |  |    |
|-------------------|--|----|
| <b>FIGURA 1-</b>  | Fotografia da Copaibeira.  | 19 |
| <b>FIGURA 2-</b>  | Extração do óleo de copaíba  | 22 |
| <b>FIGURA 3-</b>  | Principais sesquiterpenos encontrados nos óleos de copaíba   | 24 |
| <b>FIGURA 4-</b>  | Formas de agregação de tensoativos relacionado ao PEC.   | 30 |
| <b>FIGURA 5-</b>  | Representação esquemática das camadas da pele e anexos.  | 33 |
| <b>FIGURA 6-</b>  | Técnica de hidrodestilação por arraste a vapor.  | 45 |
| <b>FIGURA 7-</b>  | Representação esquemática da microplaca utilizada para testes de microdiluição.  | 47 |
| <b>FIGURA 8-</b>  | Teste de edema de pata em ratos induzido por carragenina 1%.   | 50 |
| <b>FIGURA 9-</b>  | Diagrama de fases pseudoternário na proporção 4:1 (Tensoativo/cotensoativo).   | 55 |
| <b>FIGURA 10-</b> | Diagrama de fases pseudoternário na proporção 2:1 (Tensoativo/cotensoativo).   | 56 |
| <b>FIGURA 11-</b> | Formulações utilizadas para estudos de caracterização.   | 57 |
| <b>FIGURA 12-</b> | Termograma (DSC) Tensoativos Labrasol (A) e Plurol oleique (B).  | 59 |
| <b>FIGURA 13-</b> | Termograma (DSC) do óleo de copaíba.   | 60 |
| <b>FIGURA 14-</b> | Termograma (DSC) da água deionizada.   | 60 |
| <b>FIGURA 15-</b> | Termograma (DSC) das formulações em estudo (ME-F2 e ME-F6).  | 62 |
| <b>FIGURA 16-</b> | Fotomicrografia das formulações ME-F2 e ME-F6 (MET).   | 64 |
| <b>FIGURA 17-</b> | Fotomicrografia das formulações ME-F2 e ME-F6 (Microscopia de luz polarizada).   | 65 |
| <b>FIGURA 18-</b> | Comportamento reológico das formulações em estudo (ME-F2 e ME-F6).<br>Reograma Tensão <i>versus</i> Taxa de cisalhamento.      | 66 |
| <b>FIGURA 19-</b> | Comportamento reológico das formulações em estudo (ME-F2 e ME-F6).<br>Reograma viscosidade <i>versus</i> Taxa de cisalhamento. | 67 |
| <b>FIGURA 20-</b> | Representação esquemática dos mecanismos de instabilidade das emulsões óleo/água.  | 70 |
| <b>FIGURA 21-</b> | Aspecto visual da ME bruta e das sucessivas diluições realizadas para determinação do tamanho de gotículas.                    | 71 |
| <b>FIGURA 22-</b> | Espalhamento de luz dinâmica ME-F2.  | 73 |
| <b>FIGURA 23-</b> | Espalhamento de luz dinâmica ME-F6.  | 73 |
| <b>FIGURA 46-</b> | Formulações ME-F2 e ME-F6 quando preparadas adicionando o óleo de copaíba à mistura de tensoativos e água.                     | 74 |
| <b>FIGURA 25-</b> | Perfil cromatográfico da fração volátil do óleo-resina de copaíba, obtido por CG/DIC.  | 78 |
| <b>FIGURA 26-</b> | Cromatograma do Padrão interno <i>Trans</i> -(-)cariofileno.   | 78 |
| <b>FIGURA 27-</b> | Avaliação da redução do edema induzido por carragenina em modelo animal em função do tempo (1,5; 3 e 5 horas).                 | 85 |

## LISTA DE SIGLAS

|        |  |
|--------|--|
| CIM    | Concentração inibitória mínima                         |
| CO     | Cotensoativo   |
| CLSI   | <i>Clinical and Laboratory Standard Institute</i>      |
| CG-DIC | Cromatógrafo gasoso com detector de ionização de chama |
| DDA    | Diclofenaco Dietilamônio                               |
| DFPT   | Diagrama de fases pseudo-ternário                      |
| DLS    | Espalhamento de luz dinâmico                           |
| DSC    | Calorimetria exploratória diferencial                  |
| EC     | Etrato córneo  |
| ELBL   | Emulsão líquida branco-leitosa                         |
| ELO    | Emulsão líquida opaca                                  |
| EM     | Emulsão  |
| EHL    | Equilíbrio hidrófilo-lipófilo                          |
| EHLc   | Equilíbrio hidrófilo-lipófilo crítico                  |
| FDA    | Food and Drug Administration                           |
| ESL    | Emulsão semi-sólida leitosa                            |
| IPD    | Índice de polidispersão                                |
| IR     | Índice de refração                                     |
| ME     | Microemulsão   |
| ME A/O | Microemulsão água em óleo                              |
| ME O/A | Microemulsão óleo em água                              |
| MET    | Microscopia eletrônica de transmissão                  |
| NE     | Nanoemulsão  |
| PEC    | Parâmetro de empacotamento crítico                     |
| PTA    | Ácido fosfotúngstico                                   |
| SF     | Separação de fases                                     |
| T      | Tensoativo   |
| TCL    | Triglicerídeo de cadeia longa                          |
| TCM    | Triglicerídeo de cadeia média                          |

## SUMÁRIO

|        |  |    |
|--------|--|----|
| 1      | <b>INTRODUÇÃO</b>  | 16 |
| 2      | <b>REFERENCIAL TEÓRICO</b>   | 19 |
| 2.1    | Óleo de copaíba  | 19 |
| 2.1.1  | Extração do óleo   | 21 |
| 2.1.2  | Composição química dos óleos de copaíba  | 22 |
| 2.1.3  | Atividades farmacológicas  | 24 |
| 2.2    | Microemulsões  | 26 |
| 2.3    | Parâmetro de empacotamento crítico (PEC)   | 29 |
| 2.4    | Equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL)  | 30 |
| 2.5    | A pele   | 32 |
| 3      | <b>OBJETIVOS</b>   | 36 |
| 3.1    | Objetivo geral   | 36 |
| 3.2    | Objetivos específicos  | 36 |
| 4      | <b>MATERIAL E MÉTODOS</b>  | 38 |
| 4.1    | Material   | 38 |
| 4.2    | Métodos  | 38 |
| 4.2.1  | Obtenção do óleo de copaíba  | 38 |
| 4.2.2  | Determinação do EHL do óleo de copaíba   | 38 |
| 4.2.3  | Construção dos diagramas de fases pseudoternários (DFPT)   | 40 |
| 4.2.4  | Seleção das formulações  | 40 |
| 4.2.5  | Caracterização das ME  | 40 |
| 4.2.6  | Determinação do pH   | 41 |
| 4.2.7  | Condutividade elétrica das ME  | 41 |
| 4.2.8  | Índice de refração (IR)  | 41 |
| 4.2.9  | Centrifugação  | 41 |
| 4.2.10 | Calorimetria exploratória diferencial (DSC)  | 42 |
| 4.2.11 | Microscopia eletrônica de transmissão  | 42 |
| 4.2.12 | Microscopia de luz polarizada  | 43 |
| 4.2.13 | Reologia   | 43 |
| 4.2.14 | Tamanho de gotículas por espalhamento de luz dinâmica (DLS) e Índice de polidispersão                                  | 43 |
| 4.2.15 | Potencial zeta   | 43 |
| 4.2.16 | Doseamento do marcador $\beta$ -cariofileno no óleo de copaíba e incorporado na ME                                     | 44 |
| 4.2.17 | Avaliação da atividade antibacteriana e determinação da concentração inibitória mínima (CIM)                           | 46 |
| 4.2.18 | Avaliação da atividade antifúngica e determinação da concentração inibitória mínima (CIM)                              | 48 |
| 4.2.19 | Determinação <i>in vivo</i> da atividade antiedematogênica por edema de pata induzido por carragenina em modelo animal | 49 |
| 5      | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>  | 52 |
| 5.1    | Determinação do EHL crítico (EHL <sub>c</sub> ) do óleo de copaíba   | 52 |
| 5.2    | Escolha dos tensoativos e determinação do EHL do sistema   | 52 |
| 5.3    | Diagramas de fases pseudoternários (DFPT)  | 54 |
| 5.4    | Seleção das formulações  | 56 |
| 5.5    | Caracterização físico-química das ME   | 57 |
| 5.6    | Doseamento do marcador do óleo de copaíba ( $\beta$ -cariofileno)  | 75 |

|     |   |     |
|-----|---|-----|
| 5.7 | Avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da CIM | 79  |
| 5.8 | Avaliação da atividade anti-inflamatória                    | 84  |
| 6   | <b>CONCLUSÃO</b>  | 89  |
|     | <b>REFERÊNCIAS</b>  | 91  |
|     | <b>ANEXO I</b>  | 105 |
|     | <b>ANEXO II</b>   | 106 |

## *Introdução*

---

## 1. INTRODUÇÃO

Diversas doenças microbianas de origens bacteriana ou fúngica são relatadas na literatura. Em muitos casos, os responsáveis pelas infecções adquirem resistência ao medicamento administrado, e por este motivo grande número de antibióticos tem sido desenvolvido. Paralelamente, a busca de antimicrobianos de origem natural que apresentem atividade sobre grande espectro de microrganismos e que possam ser usados como alternativa aos antibióticos convencionais tem despertado o interesse da classe científica, sobretudo nas moléculas de origem vegetal, já que as plantas possuem grande potencial em sintetizar substâncias químicas com estruturas diversificadas, como sistema de defesa contra agentes patogênicos (DEUS, ALVES, ARRUDA, 2011).

Um dos gêneros que detém destaque progressivo pelas propriedades biológicas é o *Copaifera*. Das copaibeiras é extraído o óleo-resina da copaíba responsável por inúmeras atividades farmacológicas comprovadas principalmente antimicrobiana e anti-inflamatória. Pode ser usado puro *in natura* por via tópica, ou como componente na preparação de uma variedade de produtos terapêuticos, sendo estes de administração principalmente oral, tais como xaropes e cápsulas (SAMPAIO, 2000). Porém muitas vezes estes produtos são fabricados sem nenhum controle de qualidade, sem identificação botânica da árvore, condições adequadas de coleta e armazenamento do óleo e estudos que relacionem a estrutura química e a atividade farmacológica, e sendo muitas vezes, utilizados de forma indiscriminada pela população. Estas condições justificam os diferentes perfis farmacológicos destes óleos e produtos encontrados no mercado, por apresentarem variações na composição química entre as espécies e até mesmo na mesma espécie, dependendo das condições e época de coleta, e até mesmo o local (região) que foi coletado. Outro problema é a adulteração destes óleos vendidos comercialmente em feiras de todo o Brasil, onde já foi verificada mistura com outros óleos, principalmente o óleo de soja e até mesmo outras substâncias (VEIGA JR, PATITUCCI, PINTO, 1997). Desta forma, deve-se padronizar a utilização destes óleos e realizar estudos de composição e atividade.

Uma das limitações do uso de produtos contendo óleo de copaíba de ação sistêmica são os efeitos colaterais quando administrados por via oral, tais como irritação gastrointestinal, diarreia, sialorréia e depressão do sistema nervoso central. Os produtos de via tópica limitam-se à ação superficial, sendo utilizados apenas para infecções e inflamações cutâneas locais (SACHETTI et al., 2009; BASILE et al., 1988).

Nos últimos anos a procura por novos sistemas transdérmicos de liberação de fármacos tem sido muito relevante no sentido de se estabelecer alternativas terapêuticas mais eficientes, que possibilitem administrar fármacos por via tópica com mais segurança e com efeitos colaterais minimizados. Desse modo, muita atenção tem sido dada aos sistemas microemulsionados, por sua capacidade em aumentar a eficácia terapêutica de diversos fármacos, permitindo a redução da dose administrada e minimizando os efeitos colaterais potenciais dos mesmos. Devido ao reduzido tamanho das gotículas e alta concentração de tensoativos, estes sistemas permitem um aumento na permeação cutânea por promover desestruturação dos lipídeos do estrato córneo (OLIVEIRA et al., 2004). Compostos terpênicos, principais constituintes do óleo de copaíba atuam como promotores de permeação (DAS, BHATTACHARYA, GHOSAL, 2006).

Sendo assim, torna-se interessante o desenvolvimento de uma microemulsão (ME) contendo o óleo de copaíba como princípio ativo, fase oleosa e como promotor de permeação para formulação, como alternativa terapêutica no tratamento de infecções antimicrobianas e patologias inflamatórias. Apresentando vantagens como a comodidade da aplicação, sendo indolor e prática, e desta forma, favorecendo a adesão do paciente ao tratamento. Bem como, apresenta o fator econômico, visto que se utiliza como princípio ativo um produto natural, encontrado em grande escala na flora brasileira, valorizando assim a economia nacional. Tornando-se uma alternativa terapêutica aos antibióticos sintéticos para infecções microbianas, diminuindo a resistência bacteriana, como também aos anti-inflamatórios não esteroidais orais no tratamento de inflamações, reduzindo assim os efeitos colaterais, principalmente gastrointestinais.

Neste sentido, objetivou-se no presente trabalho o desenvolvimento de ME O/A de aplicação tópica contendo o óleo de copaíba para fins antimicrobiano e anti-inflamatório. Para isto, utilizou-se a ferramenta do diagrama de fases pseudo-ternários para o desenvolvimento destas formulações e posteriormente foram realizados alguns estudos de caracterização e atividade farmacológica *in vitro* e *in vivo*, como os testes de microdiluição e edema de pata induzido por carragenina, para avaliação do efeito antimicrobiano e anti-inflamatório, respectivamente.

*Referencial Teórico*

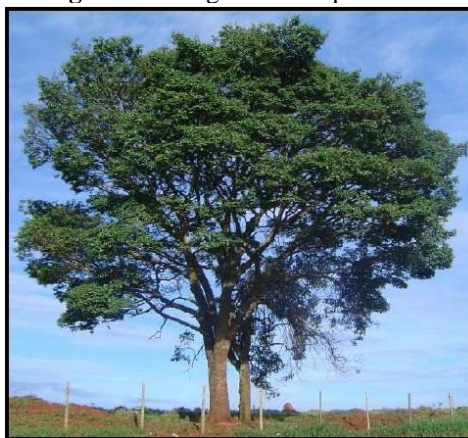


## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 ÓLEO DE COPAÍBA

As copaibeiras (Figura 1) são árvores comuns à América Latina e África Ocidental (FRANCISCO, 2005), sendo encontradas, no Brasil, nas regiões Sudeste, Centro-Oeste e Amazônica. No Brasil, as árvores são conhecidas como copaíba, copaibeira, pau-de-óleo, copaúva, copai (CASCON, 2004), copaibarana (RODRIGUES, 1989), copaibo, copal, marimari e bálsamo dos jesuítas, e o óleo é chamado de óleo de copaíba ou bálsamo (PIERE, MUSSI, MOREIRA, 2009).

**Figura 1-** Fotografia da copaibeira



(FONTE: ÁRVORES DO BRASIL, 2010).

Essa planta se apresenta na classificação botânica, pertencente à família *Leguminosae*, sub-família *Caesalpinoideae*, gênero *Copaifera* (YAMAGUCHI, GARCIA, 2012, OLIVEIRA et al., 2006; VEIGA JUNIOR et al., 2005; MACIEL et al., 2002; BRITO et al., 2000). Seu gênero compreende 72 espécies, existindo mais de 20 espécies no Brasil; dessas, 17 são endêmicas, dentre as quais as principais encontradas no país são: *Copaifera officinalis* L., *Copaifera reticulata* Ducke, *Copaifera multijuga* Hayne, *Copaifera confertiflora*, *Copaifera langsdorffii*, *Copaifera cariaceae* e *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke (PIERI et al., 2009; SANTOS et al., 2008).

Da árvore da copaíba é extraído um óleo-resina que variam a viscosidade, odor e a cor que vai do amarelo ouro a marrom dependendo da espécie (LEANDRO et al., 2012, YAMAGUCHI, GARCIA, 2012; PIERE, MUSSI, MOREIRA, 2009; LLOYD, 1898). Por exemplo, o óleo proveniente da *C. reticulata* é viscoso, amarelo escuro e com odor desagradável, o óleo da *C. langsdorffii* tem consistência de óleo de oliva e os óleos da espécie

*C. multijuga* apresentam odor característico bastante agradável, podendo ser utilizado até mesmo como aromatizante (PLOWDEN, 2004).

O uso do óleo de copaíba é difundido desde que os colonizadores europeus chegaram ao Brasil no século XVI. O conhecimento sobre as propriedades do óleo teve origem, provavelmente, da observação do comportamento de certos animais que, quando feridos, friccionavam-se nos troncos das copaibeiras para cicatrizarem suas lesões (VEIGA JÚNIOR, PINTO, 2002).

O primeiro relato do uso descreve a copaíba como *copei* em 1534 pelo papa Léo X (PLOWDEN, 2004). Por volta de 1560, o padre jesuíta José de Anchieta, em carta ao padre geral comenta o poder cicatrizante do óleo de copaíba. Em meados do século XVI, em obra publicada sob título “História da Província de Santa Cruz, que vulgarmente chamamos de Brasil”, Pero de Magalhães Gôndavo foi o primeiro a descrever a eficácia do óleo de copaíba como analgésico e cicatrizante, que resultou em um comentário mundial a respeito da copaíba, tornando o óleo junto ao cravo, anil e tabaco, um dos quatro produtos mais exportados por províncias do Maranhão e Grão-Pará (PIERE, MUSSI, MOREIRA, 2009).

Em 1625 um monge Português escrevendo sobre produtos naturais brasileiros descreveu uma droga denominada *cupayba* (POWDEN, 2004). A árvore foi a primeiramente descrita em 1648, a Farmacopéia Inglesa listou a droga em 1677 e Lineu descreveu o gênero *copaifera* em 1762. No ano de 1821, o Francês Desfontaines adicionou duas novas espécies ao gênero *Copaifera*: *C. guaianensis* e *C. langsdorffi* (PIERE, MUSSI, MOREIRA, 2009). O óleo foi incluído na Farmacopéia Americana de 1828 e em 1940 foi incorporado ao *National Formulary* (PLOWDEN, 2004).

Os primeiros relatos mencionaram a utilização medicinal do óleo de copaíba pelas populações indígenas como Tupi, Puinaves, Kaw e Makunas, com a denominação tupi *Kupaiwa*, de onde se originou o nome copaíva e posteriormente copaíba (CASCON, GILBERT, 2004).

Este óleo tem sido há anos matéria de vários estudos, visando comprová-las ou adaptá-las a novas terapias. No ano de 1972, o *Food and Drug Administration*, órgão americano regulamentador de fármacos, aprovou o óleo de copaíba, após ser submetido a testes de sensibilização e irritação, com o uso de 25 voluntários, obtendo-se resultado negativo para ambos (VEIGA JUNIOR, PINTO, 2002).

Atualmente a copaíba é uma das plantas mais utilizadas pela população da Amazônia brasileira, que em sua grande maioria não tem acesso a produtos farmacêuticos e serviços de saúde (CASCON, GILBERT, 2004).

### 2.1.1 Extração do óleo de copaíba

O óleo de Copaíba provém de canais esquizo-lizígeos (CASCON, 2004), que são secretores, localizados em todas as partes da árvore. São canais formados pela dilatação de espaços intercelulares (meatos). O caráter mais saliente desse aparelho está no lenho, onde os canais longitudinais, distribuídos em faixas concêntricas, nas camadas de crescimento demarcadas pelo parênquima terminal, reúnem-se com traçados irregulares em camadas lenhosas muitas vezes sem se comunicarem (ALENCAR, 1982). Há exudação das árvores de *Copaifera* (LIMA NETO et al., 2008; FRANCISCO, 2005; MACIEL et al., 2002) em condições patológicas (BRITO et al., 2005), sendo então o óleo, segundo Romero (2007) produto da desintoxicação do organismo vegetal, e que funciona como defesa da planta contra animais, fungos e bactérias.

Sendo assim, o óleo pode ser obtido através da perfuração no tronco da copaibeira (RIGAMONTE AZEVEDO et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2006; RAMOS, 2006; FRANCISCO, 2005; OLIVEIRA et al., 2005;) tendo sido utilizadas, desde os primórdios da exploração do produto, inúmeras formas de extração que provocavam danos sérios às árvores ou até provocavam sua morte (MATTA, 1913). Porém, uma técnica tem sido considerada a única prática não agressiva, e é hoje a mais utilizada, consistindo na perfuração do tronco com um trado de aproximadamente 2 metros de diâmetro em dois furos. O primeiro deve ser feito 1 metro acima da base da planta e o segundo de 1 a 1,5 metros acima do primeiro (OLIVEIRA et al., 2006; RAMOS, 2006; RIGAMONTE AZEVEDO et al., 2006; VEIGA JUNIOR, PINTO, 2002; ALENCAR, 1982). Insere-se então um cano de PVC de 3/4 de polegada nos orifícios (Figura 2), por onde o óleo escoar, e reserva-se o óleo. Após a finalização da extração, veda-se o orifício para proteção contra fungos e cupins (OLIVEIRA et al., 2006; RAMOS, 2006; RIGAMONTE AZEVEDO et al., 2006) com o uso de argila ou tampa vedante de plástico sendo ambas de fácil retirada para posteriores colheitas de óleo com maior facilidade de manipulação (OLIVEIRA et al., 2006; RAMOS, 2006).

**Figura 2-** Extração do óleo de copaíba. O óleo escoo pelo orifício 2 quando ambos estão desobstruídos. Ao selar a abertura do orifício 1, sela o escoamento do óleo



(FONTE: PIERE, MUSSI, MOREIRA, 2009)

A quantidade extraída do óleo-resina pode ser variável, podendo chegar a 50 litros/árvore por ano, sendo uma média por cada extração de 0,3 a 3 litros dependendo da espécie e condições de extração, podendo algumas árvores fornecer até 30 litros em uma só retirada. Não há, porém, estudos definitivos sobre o tempo necessário para uma copaibeira recompor o óleo extraído. Sabe-se também que não se extrai óleo de todas as árvores de copaíba, mas não existem estudos precisos da média de árvores efetivamente fornecedoras de óleo, o que pode variar de acordo com as características do solo, clima, espécie da *Copaifera* e época seca ou chuvosa (RIGAMONTE AZEVEDO et al., 2004).

### **2.1.2 Composição química dos óleos de copaíba**

O óleo-resina de copaíba é uma substância natural, composta de uma parte sólida, resinosa não volátil formada por ácidos diterpênicos (RAMOS, 2006; OLIVEIRA et al., 2006; VEIGA JUNIOR et al., 2005; RIGAMONTE AZEVEDO et al., 2004; CASCON, GILBERT, 2000) responsável por 55 a 60 % do óleo (RIGAMONTE AZEVEDO et al., 2004), que, segundo Freire et al. (2006), é utilizada como bálsamos, diluída na outra parte, um óleo essencial, composto de sesquiterpenos (OLIVEIRA, et al., 2006; RAMOS, 2006). Estes

podem ser divididos em sesquiterpenos oxigenados (alcóois) e hidrocarbonetos sesquiterpênicos (CASCON, GILBERT, 2000).

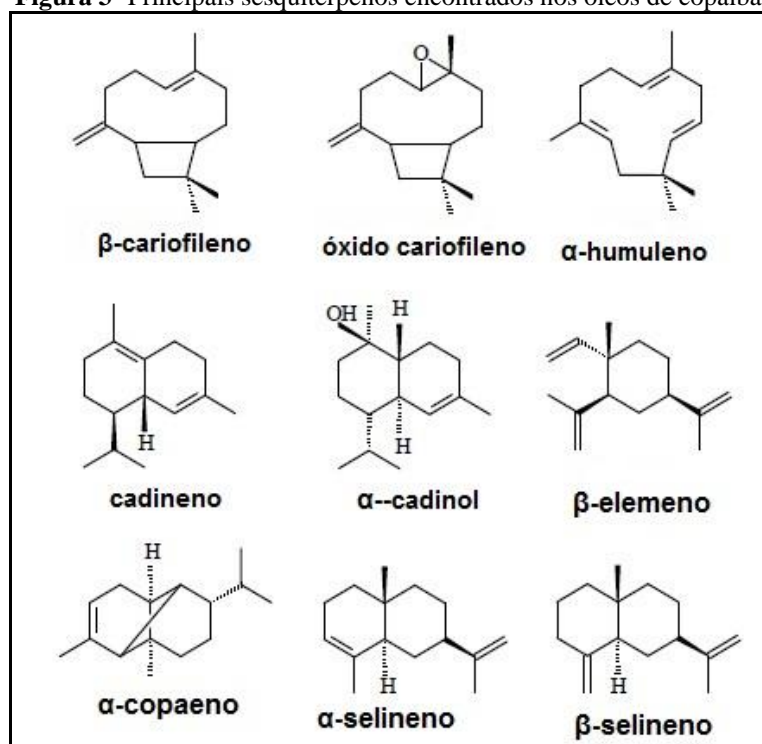
O óleo extraído pode variar em relação à concentração e natureza dos diterpenos e sesquiterpenos presentes (RAMOS, 2006; VEIGA JUNIOR et al., 2005) de acordo com variações de espécies ou mesmo na mesma espécie, fatores biológicos como insetos e fungos (RAMOS, 2006), ou fatores abióticos (OLIVEIRA et al., 2006; RAMOS, 2006). Pacheco, Barata e Duarte (2006) avaliaram a atividade antimicrobiana de óleos de copaíba (*C. multijuga*) coletados em diferentes épocas do ano, observando diferentes perfis de atividade.

Um problema observado reside na venda destes óleos de copaíba, pois geralmente não é extraído de uma única espécie, em sua grande maioria é composto por uma mistura de óleos obtidos de diferentes espécies de *copaifera*. Além disso, é comum sua adulteração por ácidos graxos ou álcool (VEIGA JUNIOR, 1997). Veiga Júnior, Patituci e Pinto (1997) analisaram diferentes óleos de copaíba comerciais e verificaram a presença de ácidos carboxílicos lineares, indicando adulteração nestes óleos possivelmente por óleo de soja.

Apesar de poderem apresentar alterações nas quantidades e tipos de diterpenos e sesquiterpenos, apenas essas classes de substâncias podem estar presentes na composição do óleo puro (VEIGA JUNIOR et al., 2005).

Os principais sesquiterpenos encontrados no óleo-resina da copaíba são  $\beta$ -cariofileno, óxido-cariofileno,  $\beta$ -bisaboleno,  $\alpha$ -humuleno,  $\alpha$ -selineno,  $\beta$ -selineno,  $\alpha$ -copaeno,  $\beta$ -elemeno,  $\gamma$ -cadineno,  $\alpha$ -cadinol, entre muitos outros, mostrados na Figura 3 (PIERE, MUSSI, MOREIRA, 2009). Cascon e colaboradores (2000) sugeriram que o óxido de cariofileno é possivelmente um artefato oxidativo produzido durante o armazenamento do óleo-resina.

Segundo Silva et al. (2006), o óleo essencial extraído das folhas da copaibeira possui composição semelhante à da parte volátil sesquiterpênica do óleo-resina, com substâncias como  $\beta$ -cariofileno, cadinol, germacreno D e B e  $\gamma$ -cadineno.

**Figura 3-** Principais sesquiterpenos encontrados nos óleos de copaíba.

(FONTE: Adaptado de LEANDRO et al., 2012)

A parte resinosa do óleo-resina é composta pelos diterpenos ácido hardwíckico, colavenol, ácido copaiférico ou copaífero, ácido copaiferólico, ácido calavênico, ácido patagônico, ácido copálico entre outros (PIERE, MUSSI, MOREIRA, 2009).

Mesmo com a grande variação na composição química destes óleos de copaíba geralmente o componente β-cariofileno é considerado um marcador químico destas óleos, sendo considerado o principal constituinte (CASCON, GILBERT, 2000). No entanto, α-copaeno foi o principal constituinte de amostras de oleoresinas de *Copaifera paupera* e *Copaifera piresii* coletados no Acre e Rondônia, respectivamente (ZOGHBI ET AL., 2009), e foi também o constituinte principal nas amostras de oleoresinas *Copaifera Martii* coletados em Pará (ZOGHBI, LAMEIRA, OLIVEIRA, 2007). Enquanto isso, β-bisaboleno apresentou-se como o principal constituinte em várias amostras de *Copaifera duckei* e *Copaifera reticulata* coletados no Pará (LAMEIRA ET AL., 2009; ZOGHBI ET AL., 2009).

### 2.1.3 Atividades farmacológicas

O óleo-resina de copaíba é amplamente utilizado na medicina popular, através da administração tópica e oral (LEANDRO et al., 2012). As principais propriedades terapêuticas citadas são: a atividade anti-inflamatória (GOMES et al., 2010; VEIGA JÚNIOR et al., 2010;

VEIGA JÚNIOR et al., 2007; VEIGA JÚNIOR et al., 2006; BRITO et al., 2005; BAYLAC, RACINE, 2004; VEIGA JÚNIOR et al., 2001; BASILE et al., 1988), atividade antimicrobiana (SANTOS et al., 2012; PIERE et al., 2011; DEUS, ALVES, ARRUDA, 2011; PIERE et al., 2010, MENDONÇA, ONOFRE, 2009; DEUS et al., 2009; SANTOS et al., 2008; PACHECO, BARATA, DUARTE, 2006), antileishmania (SANTOS et al., 2012, 2011, 2008), antitumoral (BRITO et al., 2010; GOMES et al., 2008; LIMA et al., 2003), antinoceptivo (GOMES et al., 2010; GOMES et al., 2007), anti-isquêmico (ARAÚJO et al., 2005), ansiolítica (CURIO et al., 2009), inseticida (PROPHIRO et al., 2012; KANIS et al., 2012; RIBAS, CARREÑO, 2010; SEO et al., 2009; FERNANDES, FREITAS, 2007; SILVA et al., 2003; SILVA, ZANON, SILVA, 2003), ação cicatrizante (RAMOS, 2006; SILVA et al., 2006; ARAÚJO JÚNIOR et al., 2005; BRITO et al., 2005; FRANCISCO, 2005; RIGAMONTE AZEVEDO et al., 2004; BRITO et al., 2000; MACIEL et al., 2002; VEIGA JÚNIOR, PINTO, 2002), potencial anti-séptico (RAMOS, 2006; VEIGA JUNIOR et al., 2005; CASCON, 2004; RIGAMONTE AZEVEDO et al., 2004), germicida (BLOISE, 2003), expectorante (RAMOS, 2006; FREIRE et al., 2006; BRITO et al., 2005; RIGAMONTE AZEVEDO et al., 2004; MACIEL, et al., 2002; BRITO et al., 2000) diurético (FREIRE et al., 2006; SILVA et al., 2006) e analgésico (PACHECO et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2005; GURGEL, 2004; VEIGA JÚNIOR, PINTO, 2002).

Outras indicações também são conhecidas e citadas, como a ação antiviral (GURGEL, 2004; VEIGA JÚNIOR, PINTO, 2002), antidiarréica, contra o reumatismo, psoríase (MACIEL et al., 2002; BRITO et al., 2000), hemorragias, moléstias de pele, urticárias (MACIEL et al., 2002), pneumonia, eczema, paralisia, cefaléia, picada de cobra (RIGAMONTE AZEVEDO et al., 2004), sífilis (PACHECO et al., 2006), como antitetânico, antiblenorrágico (RIGAMONTE AZEVEDO et al., 2004), antileucorréico e cercaricida (MACIEL et al., 2002), além de ações antiulcerogênicas, estimulantes (RAMOS, 2006) e afrodisíacos (RIBEIRO, 1971). O extrato das folhas da copaibeira tem sido apontado como uma de suas funções, a atividade antioxidante, função não comprovada no óleo-resina (RAMOS, 2006; ARAÚJO JÚNIOR et al., 2005; RIGAMONTE AZEVEDO et al., 2004; VEIGA JUNIOR, PINTO, 2002).

Outras ações têm sido descobertas, como a de ação vasorelaxante, citotóxico e embriotóxico (COSTA LOTUFO et al., 2002), com o isolamento do diterpeno, ácido caurenóico, encontrado até hoje apenas na *Copaifera langsdorffii* (VEIGA JUNIOR et al., 2005) e que acumula também atividades anti-inflamatória e protetora de colite induzida por ácido acético (VEIGA JUNIOR et al., 2005; PAIVA et al., 2004). Além disso, pesquisas

realizadas nas últimas duas décadas apontam o óleo de copaíba para o campo da odontologia, como substituto do eugenol em três formulações (RAMOS, 2006; CASCON, 2004; VEIGA JUNIOR, PINTO, 2002). Na mistura com o óxido de zinco, na formulação do cimento endodôntico, para obturações de canais radiculares, com vantagens sobre a formulação usual, por produzir menor irritação (RIBEIRO, 1989). Em composição obturadora provisória medicamentosa, em combinação com o hidróxido de cálcio, apresenta melhor capacidade antimicrobiana, em relação à formulação com o eugenol (RAMOS, 2006; VEIGA JUNIOR, PINTO, 2002). A pasta feita com o óleo de copaíba apresentou pequeno potencial irritativo, sendo preferível ao médio potencial do eugenol, além de potencializar as propriedades do CaOH, na compatibilidade tecidual, na indução da formação de tecido mineralizado; em cimento formado com a união de óleo de copaíba, CaOH e óxido de zinco mostra maior eficiência nas infiltrações apicais em obturações de canais radiculares (RAMOS, 2006).

Recentemente têm sido realizados ensaios laboratoriais com a finalidade de comprovar ação antimicrobiana da copaíba sobre bactérias formadoras da placa dental (Piere, 2007; VALDEVITE et al., 2007), tendo inclusive sido registrado um gel à base de copaíba, para esta finalidade (SIMÕES, 2004). A utilização do óleo de copaíba sobre as bactérias formadoras de placa dental foi comprovada recentemente em estudo realizado em cães, tendo sido obtido ao final do período experimental, redução significativa da formação da placa dental nos animais com a utilização de solução a base do fitofármaco (PIERE, 2007). Este autor também testou *in vitro* a atividade antimicrobiana do óleo de copaíba, sobre a bactéria *Streptococcus pyogenes*, causadora de inflamações de garganta, obtendo resultados positivos na inibição do crescimento deste microrganismo.

Muitos estudos têm sido realizados para confirmar estas propriedades cientificamente e validar a utilização generalizada deste óleo e suas diversas atividades farmacológicas. Apesar dos muitos trabalhos publicados, alguns dos dados sobre a composição química e a atividade farmacológica do óleo de copaíba permanece contraditória (LEANDRO et al., 2012).

## 2.2 MICROEMULSÕES

O termo microemulsão (ME) foi introduzido na década de 40 por Hoar e Schulman para definir um sistema fluido e semi-transparente obtido pela titulação até o ponto de clarificação de uma emulsão simples com um álcool de cadeia média como o hexanol ou o pentanol. No ponto de clarificação não foi necessária agitação e uma dispersão transparente



foi formada espontaneamente. Estes pesquisadores observaram, através de microscopia eletrônica, que as dispersões transparentes formadas eram constituídas de microgotículas de óleo em água (O/A) ou água em óleo (A/O), cercadas por um filme interfacial misto de tensoativo e co-tensoativo (álcool). O tamanho das gotículas variava de 100 a 600 nm, significativamente menores que os da emulsão simples inicial, justificando seu aspecto transparente e o termo microemulsão (HOAR e SCHULMAN, 1943).

Este termo foi revisado muitas vezes e a definição atualmente mais aceita descreve as ME como dispersões coloidais de água e óleo, estabilizadas por um tensoativo e por um co-tensoativo quando necessário, sendo consideradas sistemas termodinamicamente estáveis devido ao equilíbrio entre seus componentes. Além disso, 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., 2010; FLANAGAN, SINGH, 2006; CUNHA JÚNIOR *et al.*, 2003).

O tamanho da gotícula destes sistemas é muito reduzido, tipicamente entre 10-300nm. Por essa razão, ME são relativamente translúcidas, ou seja, opticamente límpidas, o que se justifica pelo fato de o diâmetro médio das gotículas ser menor do que  $\frac{1}{4}$  do comprimento de onda da luz incidente. Com isso, as mesmas não espalham luz e o sistema fica transparente, caracterizando-se como isotrópico (DAMASCENO et al., 2011; LANGEVIN, 1988; ROSANO, 1974).

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; FANUN, 2009; OLIVEIRA et al., 2004), devido a sua capacidade de solubilizar grande quantidade de fármacos lipófilos ou hidrófilos (FASOLIN, SANTANA, CUNHA, 2012; CAMPO et al., 2004). Desta forma, 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, 20010; FANUN, 2010; FORMARIZ et. al., 2005).

É possível se estabelecer nitidamente diferenças entre uma ME e uma emulsão (EM) (Tabela 1). A tensão interfacial de uma ME é muito baixa quando comparada com a tensão interfacial de uma EM. Isso pode levar a formação espontânea das ME e, conseqüentemente, a um pequeno tamanho das gotículas. Enquanto isso, as emulsões são dispersões opticamente turvas e leitosas e, normalmente, só podem ser obtidas por agitação mecânica devido a sua instabilidade termodinâmica (BAGWE et al., 2001; TENJARLA, 1999).

**Tabela 1-** Principais diferenças entre EM e ME

| <b>EMULSÕES</b>  | <b>MICROEMULSÕES</b>  |
|--|---|
| Termodinamicamente instáveis tendendo a separação de fases | Termodinamicamente estáveis                                     |
| Sistemas relativamente estáticos                           | Sistemas altamente dinâmicos                                    |
| Área interfacial moderadamente grande                      | Área interfacial bastante grande                                |
| Pouco tensoativo é requerido para estabilização            | Grande quantidade de tensoativo é necessária para estabilização |
| Pequena curvatura da interface O/A                         | O filme interfacial pode estar altamente curvado                |

(FONTE: TENJARLA, 1999)

As ME podem ser compostas por gotículas de água em óleo (A/O) ou óleo em água (O/A), podendo inverter de um tipo para outro pela adição de uma fase ou alteração do tensoativo (FANUN, 2009; FANUN, 2010, OLIVEIRA, 2004). A formação de uma ME O/A se dá quando o volume de óleo é baixo. Ao contrário, ME A/O se formam quando o volume de água é reduzido. Em sistemas em que as quantidades de água e óleo são similares, ME bicontínuas são formadas (LAWRENCE; REES, 2000). A formação dessas diferentes microestruturas pode afetar fortemente a liberação de fármacos (CORREA et. al., 2005).

A principal desvantagem desses sistemas microemulsionados relaciona-se à utilização de elevadas concentrações de tensoativos e co-tensoativos em relação às emulsões, possibilitando a ocorrência de irritação no local de aplicação. Assim, esses adjuvantes, além de permitirem a formação dos sistemas devem, também, ser atóxicos e apresentar registro para emprego em produtos farmacêuticos. Entretanto, esta limitação varia dependendo do uso pretendido para a preparação em questão, havendo maior disponibilidade de substâncias para produtos que visam à administração cutânea, maiores restrições aos que se destinam à via oral e, principalmente, aos que devem ser preparados de forma estéril (parenterais e oftálmicos) (CUNHA-JÚNIOR et al., 2003).

Os tensoativos vêm sendo extensamente estudados por serem moléculas anfifílicas que em baixas concentrações, têm a capacidade de serem adsorvidas na interface de dispersões líquidas, reduzindo a tensão interfacial. A adsorção na interface dos líquidos é consequência da estrutura molecular dos tensoativos, sendo formado por duas regiões que se comportam de maneira distinta: uma parte apolar (cauda) constituída, geralmente, por uma cadeia de hidrocarbonetos (8 a 18 átomos) que interage bem com a fase óleo; e uma parte polar (cabeça) que pode ser iônica (catiônica ou aniônica), não-iônica ou anfótera, que interage fortemente

com a fase aquosa através de forças do tipo dipolo-dipolo ou íon-dipolo (Figura 4). Essas regiões distintas são denominadas hidrofóbicas [ou lipofílica (subunidade apolar da molécula do tensoativo)] e hidrofílica (subunidade polar). A presença destas duas subunidades distintas em uma mesma molécula favorece a adsorção dos tensoativos nas interfaces líquido-líquido, líquido-gás ou sólido-líquido de um dado sistema (NISTSCHKE, PASTORE, 2002; MANISSO, 2001; SCHREIER et al., 2000; CREVECOUEUR et al., 1999; ADAMSON, GAST, 1997). Devido estas características os tensoativos são considerados um dos produtos químicos mais versáteis e utilizados nos diversos setores industriais (DANTAS NETO et al., 2003; NITSCHKE, PASTORE, 2002; ELACHOURI et al., 1995; LUO et al., 1998; DESAI, BANAT, 1997).

A eficácia dos tensoativos é determinada pela sua capacidade de reduzir a tensão superficial ou interfacial de um determinado sistema líquido. Esta eficácia é dada pela medida de energia livre da tensão da superfície por unidade de área, necessária para trazer uma molécula do interior do líquido para a superfície (ROSEN, 2004).

### 2.3 PARÂMETRO DE EMPACOTAMENTO CRÍTICO (PEC)

Moléculas de tensoativos podem se auto-agregar na presença de água formando uma rica variedade de estruturas. Quando são incorporados em misturas imiscíveis de óleo e água, eles podem se localizar na interface óleo/água, resultando em diferentes estruturas de escala macroscópica ou microscópica com diferentes regiões de solubilização. Essa propriedade possibilita compartimentalizar o fármaco, podendo direcioná-lo para os sítios onde deverá exercer o efeito farmacológico, além de poder controlar a velocidade de liberação, sem alterar a estrutura química da molécula transportada, sendo considerados, portanto sistemas reservatórios. Nestes tipos de sistemas, o fármaco encontra-se separado do meio de dissolução através de um revestimento, uma membrana, ou uma interface, devendo transpor essa barreira para ser liberado do meio (LAWRENCE, REES, 2000).

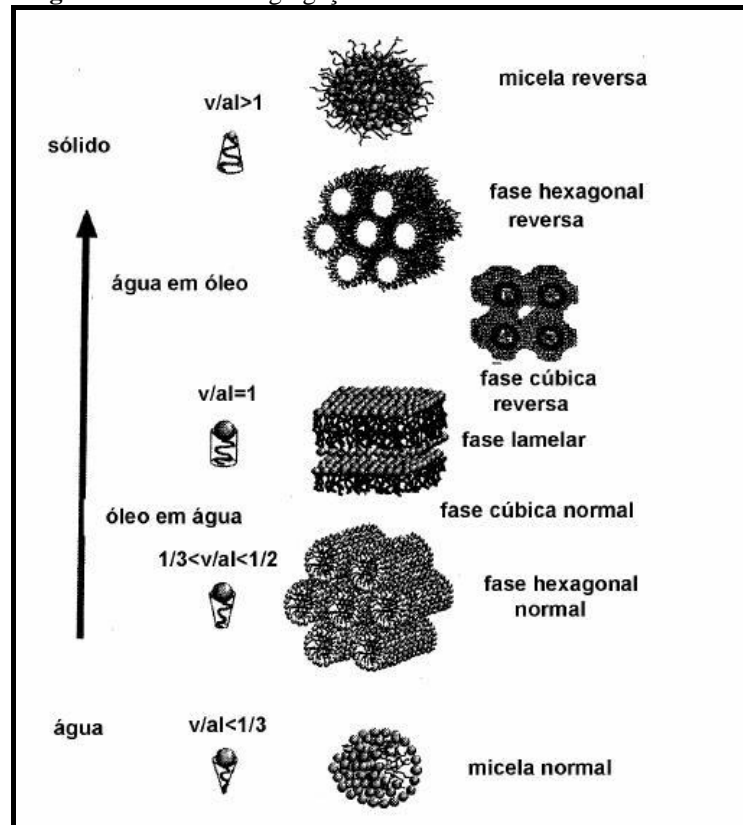
O parâmetro de empacotamento crítico (PEC) é útil para predizer a estrutura preferencialmente formada por um composto anfifílico, uma vez que relaciona o formato da molécula com propriedades que influenciam a curvatura da interface polar-apolar e, conseqüentemente, o tipo de agregado formado. O PEC pode ser calculado utilizando a Equação 1 (MITCHELL, NINHAM, 1981):

$$PEC = \frac{V}{a_c \cdot l_c} \quad (1)$$

Onde, PEC o fator de empacotamento, V volume da cauda hidrocarbonada,  $l_c$  o comprimento do anfifílico e  $a_c$  à área da cabeça polar.

A Figura 4 relaciona o PEC com os tipos de agregados formados. Uma variedade de estruturas pode ser formada, incluindo as ME O/A e as reversas A/O, fases cúbicas lamelares, ou hexagonal (ANTON, VANDAMME, 2011; BINKS, FLETCHER, TIAN, 2010), sendo estes últimos sistemas denominados como cristais líquidos (FASOLIN, SANTANA, CUNHA, 2012).

**Figura 4-** Formas de agregação de tensoativos relacionado ao PEC



(FONTE: BORNÉ et al., 2001).

## 2.4 EQUÍLIBRIO HIDRÓFILO-LIPÓFILO (EHL)

Em 1949, Griffin introduziu o conceito do Equilíbrio Hidrofílico-Lipófilico (EHL), sendo este uma noção semi-empírica para quantificar os efeitos das contribuições das partes apolares e polares existentes na estrutura molecular do tensoativo. A predominância de uma

das partes dotará a molécula anfifílica de características específicas, determinando os tipos de aplicações, de acordo com a capacidade de emulsionar uma mistura de líquidos imiscíveis (BERTHOD, 1983).

De acordo com Adamson (1976), o valor de EHL indica o percentual hidrofílico de um tensoativo sendo dependente somente da estrutura molecular do tensoativo. Sendo assim, um EHL baixo corresponde a um tensoativo com baixo poder hidrofílico, um aumento neste parâmetro corresponde a um aumento no caráter hidrofílico do tensoativo (ADAMSON, 1976).

Davies (1957) propôs para tensoativos iônicos, um método alternativo de estimativa do EHL, tendo adicionado uma propriedade intrínseca a cada grupo presente na molécula, e atribuindo valores que variam de acordo com caráter hidrofílico( $\alpha_i$ ) ou lipofílico( $\beta_i$ ). A Tabela 2 apresenta os valores de alguns grupos funcionais. O valor do EHL pode ser estimado pela Equação 2:

$$\text{EHL} = \sum \alpha_i - \sum \beta_i \quad (2)$$

**Tabela 2-** Números de grupos de EHL.

| Grupos               |  | $\alpha_i^*$ | $\beta_i^*$ |
|----------------------|--|--------------|-------------|
| Hidrofílicos         | -SO <sub>4</sub> -Na <sup>+</sup>      | 38,7         | -           |
|                      | -COO-K <sup>+</sup>                    | 21,1         |             |
|                      | -COO-Na <sup>+</sup>                   | 19,1         |             |
|                      | Sulfonados                             | 11,0         |             |
|                      | Éster (em anel)                        | 6,8          |             |
|                      | Éster (livres)                         | 2,4          |             |
|                      | -COOH                                  | 2,1          |             |
|                      | Hidroxilas (livres)                    | 1,9          |             |
|                      | -O-                                    | 1,3          |             |
| Hidroxilas (em anel) | 0,5                                    |              |             |
| Lipofílicos          | -CH-, -CH <sub>2</sub> -               | -            | 0,475       |
|                      | -CH <sub>3</sub> , =CH-                | -            | 0,475       |
| Derivados            | -(CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -O) | -            | 0,330       |
|                      | -CF <sub>2</sub> -                     | -            | 0,870       |
|                      | -CF <sub>3</sub>                       | -            | 0,870       |

\* Valores estimados.

(FONTE: DAVIES e RIDEAL, 1957.)

Outro método consiste em comparar a massa molar da parte hidrofílica (H) e da parte lipofílica (L), para obter o valor de EHL, através da Equação 3. Este valor compreendido entre 0 e 20, o valor maior (20) correspondente ao percentual 100% indicativo de caráter hidrofílico máximo.

$$\text{EHL} = \left( \frac{H}{H+L} \right) \times 20 \quad (3)$$

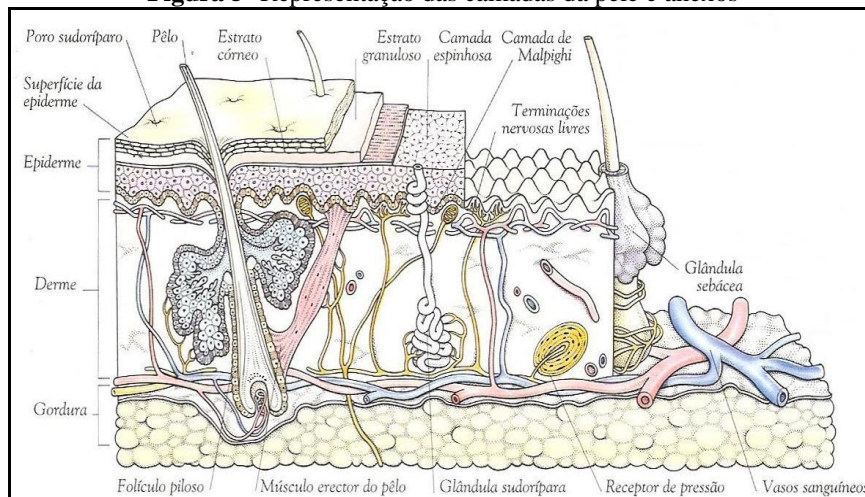
A mistura de tensoativos com Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo adequado proporciona a condição máxima de “solubilização” do óleo e da água (MITAL, 1999). A orientação dos sistemas para O/A ou A/O é dependente das propriedades físico-químicas do tensoativo e do óleo, da relação entre as proporções tensoativo/co-tensoativo e entre as proporções água/óleo (CRUZ, UCKUN, 2001; CONSTANTINIDES et al., 1994). Normalmente, tensoativos com EHL entre três e oito favorecem a formação de uma ME A/O, enquanto tensoativos com EHL entre 8 e 18 favorecem a formação de uma ME O/A (LAWRENCE et al., 2000; TENJARLA, 1999).

Entretanto, além do valor do EHL, a posição geométrica dos tensoativos na interface pode ser outro fator de influência a ser considerado em termos de seus efeitos na curvatura e na fluidez da interface. Como consequência, a adição de um cotensoativo é capaz de reduzir a energia livre na interface e tensão através da penetração no filme de tensoativo e, portanto, criar um filme desordenado devido a um espaço vazio entre as moléculas do mesmo. Eles atuam também modificando o valor do EHL do sistema de tensoativo para um valor ótimo e adequado para a formulação de ME (HO, HSIAO, SHEU, 1996).

## 2.5 A PELE

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, o fato de ser indolor e a facilidade de aplicação (SILVA et al., 2009). Como também, menos efeitos adversos favorecendo uma maior adesão do paciente a terapia. No entanto, a pele é uma barreira natural, e apenas alguns fármacos podem penetrar com facilidade e em quantidades suficientes para ser eficaz (OZGUNEY et al., 2006).

A pele é o maior órgão do corpo humano, ocupando área média de 2 m<sup>2</sup> (LEONARDI, 2004). É um órgão completo e tem uma variedade de tipos celulares. Pode-se considerar a pele como uma espécie de órgão “espelho” que reflete e amplifica as reações do organismo pouco acessíveis à investigação. Se examinarmos um corte transversal da pele no microscópio é possível visualizar três estratos principais (Figura 5).

**Figura 5- Representação das camadas da pele e anexos**

(FONTE: BURNIE & COOLING, 1996)

A pele é constituída na camada mais superficial pela epiderme (tecido epitelial estratificado), na camada média a derme (tecido conjuntivo) e na camada profunda a hipoderme (tecido conjuntivo adiposo) (HERNANDEZ, MERCIER-FRESNEL, 1999), sendo considerada uma barreira complexa com organização anatômica e estrutura química especial (VERMA et al, 2003; RESENDE, et al 2006).

A camada mais externa da pele, a epiderme, pode ter espessura diferente conforme a região do corpo. Constituída por um epitélio estratificado pavimentoso, a célula principal é o queratinócito, a qual produz a queratina. As células da epiderme constituem um sistema dinâmico, ou seja, estão em constante renovação, desde sua junção com a derme até a superfície cutânea, onde se efetua uma descamação permanente. Também fazem parte desta camada, as células de Langerhans (sistema de defesa operado pelo sistema imunológico) e as células de merkel (sensíveis ao tato e pressão) (LEONARDI, 2004).

A porção menos permeável da epiderme é a camada mais superficial, formada por corneócitos organizados e agrupados, ligados entre si através de desmossomas. Nesta camada as células são mais queratinizadas e o teor de lipídios intracelulares (ceramidas, colesterol e ácidos graxos) é mais elevado, os quais estão dispostos em camadas lamelares, preenchendo os espaços extracelulares contribuindo para a coesividade, o que acaba dificultando a difusão dos ativos (LEONARDI, 2004). Esta camada é chamada estrato córneo (EC), principal determinante para a permeação de substâncias ativas. É considerado o maior responsável pela promoção da “barreira cutânea”. A espessura e integridade (cristalinidade e quantidades totais de lipídios) do EC podem sofrer alterações de acordo com a idade, sexo, raça e região corporal, variando sua efetividade (HARRIS, 2009).

A penetração através desta camada depende das propriedades físico-químicas da substância ativa aplicada e do veículo onde a substância encontra-se incorporada (CROSS et al, 2003). Se a molécula não for metabolizada depois que atravessa o estrato córneo, provavelmente será difundida através das camadas da pele (LEONARDI, 2004).

Muitas estratégias têm sido utilizadas para melhorar a entrega dérmica e transdérmica de fármacos. Estas incluem a utilização de potenciadores de penetração de produtos químicos, preparação de sistemas de fármacos supersaturadas de entrega, iontoforese, assim como o uso de sistemas de liberação de fármacos com esta capacidade promotora de permeação (LIU, CHANG, HUNG, 2011). As microemulsões oferecem uma alternativa promissora para a administração por via dérmica (local) e transdérmica (sistêmica) de fármacos hidrofílico e lipofílico (FANUN, 2010; FANUN, 2009; BACHHAV, PATRAVALE, 2009; OZGUNEY et al., 2006; KREILGAARD, 2002; KREILGAARD et al, 2000).

Óleos essenciais e seus componentes, tais como terpenos, são biocompatíveis e podem melhorar a eficácia de entrega do sistema transdérmico, por isso vêm recebendo muita atenção como promotores de penetração, devido às suas baixas toxicidades em comparação com potenciadores de penetração sintéticos (DAS, BHATTACHARYA, GHOSAL, 2006). Por exemplo, foi relatado que o limoneno potencializou a entrega de cetoprofeno e aceclofenaco (LEE, et al., 2005; RHEE et al., 2001). Óleo de eucalipto contendo o óleo essencial de 1,8-cineol foi utilizado como um veículo para a administração transdérmica de esteróides hormonais (BIRUSS, KAHLIG, VALENTA, 2007), e de hidrocortisona (MAGHRABY, 2008). Além disso, Terpeneol foi utilizado como um potenciador transdérmico para a zidovudina e buspirona (KHALILI, MEIDAN, MICHNIAR, 2003). Três terpenos também promovorem uma melhor permeação da curcumina (LIU, CHANG, HUNG, 2011).

Vários mecanismos têm sido propostos para explicar as vantagens de ME para a administração transdérmica e dérmica de fármacos (ZHAO et al, 2006; CHEN et al, 2006; GUPTA et al, 2005): 1) a termodinâmica do fármaco na pele é aumentada devido à sua grande quantidade de fármaco incorporado na formulação. 2) o aumento desta atividade termodinâmica pode favorecer a sua partição do fármaco na pele. 3) alguns componentes da formulação atuam como potenciadores de permeação. Além disso, o efeito de hidratação da ME O/A tem influência na capacidade de permeação de formulações no estrato córneo (MOHAMMED E MANOJ, 2000).



*Objetivos*

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolvimento e caracterização de uma microemulsão de administração por via tópica contendo o óleo de copaíba (*Copaifera multijuga*) e avaliação da sua atividade antimicrobiana e anti-inflamatória.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o Equilíbrio Hidrófilo- Lipófilo (EHL) crítico do óleo de copaíba;
- Desenvolver e utilizar diagramas de fases pseudo-ternários para obtenção e identificação das regiões de ME de interesse usando o óleo da copaíba como fase oleosa;
- Identificar o domínio de ME líquidas nas regiões do diagrama pseudo-ternário possíveis de obtenção de sistemas opticamente transparentes;
- Caracterizar os sistemas obtidos, contemplando as análises de: pH, reologia, densidade relativa, condutividade, índice de refração, calorimetria exploratória diferencial, tamanho das gotículas e potencial zeta, microscopia eletrônica, microscopia de luz polarizada e reologia;
- Quantificar o marcador  $\beta$ -cariofileno do óleo de copaíba nos sistemas ME por cromatografia gasosa;
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos sistemas utilizando a técnica de microdiluição;
- Avaliar a atividade anti-inflamatória em modelo animal utilizando a técnica de edema de pata em ratos.

*Material e Métodos*

---

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL

**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<sup>®</sup> - Brasquim; poligliceril 6-dioleato (Lote: 127425), Plurol Oleique<sup>®</sup> - Gattefossé.

### 4.2 MÉTODOS

#### 4.2.1 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 (2008), 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.

#### 4.2.2 Determinação do EHL do óleo de copaíba

Foram preparadas 11 emulsões óleo em água utilizando a técnica de inversão de fases. Estas formulações foram compostas por 5% de óleo de copaíba, 93 % de água destilada e 2% da mistura de dois tensoativos. A mistura de tensoativos foi composta por um tensoativo hidrofílico (Tween<sup>®</sup> 20) e um lipofílico (Spam<sup>®</sup> 80), de EHL 15 e 4,3, respectivamente. Estes tensoativos foram escolhidos a fim de se obter uma faixa ampla de valores finais de EHL (5 a 15), variando a concentração dos mesmos conforme a equação (3) abaixo (Griffin, 1949). A composição de cada formulação está descrita na Tabela 3.

$$\text{EHL} = \frac{(W_{\text{tw}} \times \text{EHL}_{\text{tw}}) + (W_{\text{sp}} \times \text{EHL}_{\text{sp}})}{(W_{\text{tw}} + W_{\text{sp}})} \quad (3)$$

Onde:  $W_{\text{tw}}$ = Quantidade (peso) de Tween<sup>®</sup> 20 utilizado;  $W_{\text{sp}}$ = quantidade (peso) de Spam<sup>®</sup> 80 utilizado;  $\text{EHL}_{\text{tw}}$  e  $\text{EHL}_{\text{sp}}$ = valores de EHL do Tween e Spam, respectivamente. EHL= valor final de EHL do sistema composto por Tween 20 e Spam 80.

**Tabela 3-** Composição das emulsões para determinação do EHL do óleo de copaíba (*C. multijuga*)

| Emulsão   | Tween <sup>®</sup> 20 | Spam <sup>®</sup> 80 | Óleo de copaíba | Água deionizada | EHL da mistura |
|-----------|-----------------------|----------------------|-----------------|-----------------|----------------|
| <b>1</b>  | 0,03g                 | 0,37g                | 1g              | 18,6ml          | 5              |
| <b>2</b>  | 0,06g                 | 0,34g                | 1g              | 18,6ml          | 6              |
| <b>3</b>  | 0,09g                 | 0,31g                | 1g              | 18,6ml          | 7              |
| <b>4</b>  | 0,12g                 | 0,28g                | 1g              | 18,6ml          | 8              |
| <b>5</b>  | 0,15g                 | 0,25g                | 1g              | 18,6ml          | 9              |
| <b>6</b>  | 0,18g                 | 0,22g                | 1g              | 18,6ml          | 10             |
| <b>7</b>  | 0,22g                 | 0,18g                | 1g              | 18,6ml          | 11             |
| <b>8</b>  | 0,25g                 | 0,15g                | 1g              | 18,6ml          | 12             |
| <b>9</b>  | 0,28g                 | 0,12g                | 1g              | 18,6ml          | 13             |
| <b>10</b> | 0,31g                 | 0,09g                | 1g              | 18,6ml          | 14             |
| <b>11</b> | 0,34g                 | 0,06g                | 1g              | 18,6ml          | 15             |

(FONTE: dados da pesquisa)

As fases aquosa e oleosa foram aquecidas separadamente a uma temperatura de 70°C. A fase aquosa consistiu da água e do Tween<sup>®</sup> 20 e a fase oleosa do óleo de copaíba e o Spam<sup>®</sup> 80, devido EHL de cada tensoativo. Aquecidas, a fase aquosa foi vertida na fase oleosa e homogeneizada em um Ultra-Turrax digital (Modelo T25<sup>®</sup>, IKA, Alemanha) com rotação de 13000 rpm por 10 minutos (XAVIER JÚNIOR, 2011).

Após o período de 90 dias foram observados visualmente os aspectos macroscópicos (cor e estabilidade visual) das formulações. As emulsões que apresentaram maior estabilidade, ou seja, o menor volume de cremeado e sem separação de fases, ou separação mínima indicou o EHL crítico do óleo de copaíba.

Calculado o EHLc do óleo de copaíba, foram selecionados os tensoativos e calculado o EHL requerido (tensoativo/ cotensoativo) para este óleo, a fim de se obter a formação de sistemas microemulsionados. Para o cálculo do EHL do sistema foi utilizado a equação de Griffin (Equação 3).

### **4.2.3 Construção dos diagramas de fases pseudoternários (DFPT)**

Os DFPT, desta pesquisa, foram obtidos por inspeção visual das misturas dos componentes Labrasol<sup>®</sup> (T) com Plurol Oleique<sup>®</sup> (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,1997). Para plotagem dos pontos foi utilizado o programa OriginPro8.0. Os diagramas foram feitos em duplicatas.

### **4.2.4 Seleção das formulações**

A partir das regiões de ME dos dois diagramas foram selecionados pontos distintos, a fim de abranger toda a região (ME com diferentes proporções de componentes). Para garantia da estabilização termodinâmica dos sistemas, as ME foram preparadas 48 horas antes dos testes de caracterização. A preparação e caracterização preliminar das formulações de ME foram realizadas no Laboratório de Desenvolvimento e Caracterização de Produtos Farmacêuticos (LDCPF) da Universidade Estadual da Paraíba.

### **4.2.5 Caracterização das ME**

Para a análise estatística dos ensaios de caracterização foi utilizado ANOVA de uma via, sendo considerados os valores significativos quando  $p < 0,05$ .

#### 4.2.6 Determinação do pH

O pH das formulações foi avaliado por meio de pHmetro digital (Modelo mPA210, Tecnocon, Brasil), com eletrodo de vidro e sensor de temperatura, calibrado previamente com soluções tampão pH 4,0 e 7,0 a uma temperatura de  $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$ . Foram preparadas soluções aquosas de 1:10 e inseridas no eletrodo. A análise foi feita em triplicata.

#### 4.2.7 Condutividade elétrica das ME

A condutividade elétrica das formulações ME foi determinada em condutivímetro digital (Tecnocon, Brasil). O equipamento foi calibrado com uma solução de calibração apresentando condutância específica de  $1413\mu\text{S cm}^{-1}$ , à temperatura de  $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$ . As determinações dos valores de condutividade foram obtidas com introdução do eletrodo diretamente no interior das formulações acondicionadas em frasco de cintilação. A análise foi feita em triplicata.

#### 4.2.8 Índice de Refração (IR)

A determinação do índice de refração foi realizada no Refratômetro Abbe (Carl Zeiss, Brasil), conforme metodologia descrita na Farmacopéia Brasileira (1988). A temperatura durante as leituras foi ajustada e mantida em  $20 \pm 0,5^\circ\text{C}$ . O equipamento foi calibrado no início do experimento com água destilada, cujo índice de refração é de 1,3330 a  $20 \pm 0,5^\circ\text{C}$ . O ensaio foi realizado em triplicata.

#### 4.2.9 Centrifugação

Para este teste foi utilizado uma microcentrífuga de bancada (Modelo 1801, Nova Instruments, Brasil), onde 1g de cada formulação foi colocada em *ependorf* e submetida à rotação de 7000rpm correspondente a 4382g por 30 minutos. As formulações foram caracterizadas como estáveis, levemente modificadas e separação de fases.

#### 4.2.10 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As curvas DSC dos componentes isolados (água deionizada, óleo de copaíba e os tensoativos) e as formulações avaliadas (ME-F2 e ME-F6) foram obtidas em um módulo Calorimétrico Exploratório Diferencial DSC (Modelo Q20, TA – *Instruments*, Estados Unidos). Foram utilizadas amostras de  $2,00 \pm 0,05$ mg, acondicionadas em cadinho de alumínio hermeticamente fechados. . Inicialmente as amostras foram submetidas a resfriamento (25 a  $-50^{\circ}\text{C}$ ) a uma taxa de  $5^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ , sendo mantidas por 3 minutos a  $-50^{\circ}\text{C}$ . Em seguida estas amostras foram aquecidas até a temperatura de  $250^{\circ}\text{C}$ , analisadas na razão de aquecimento de  $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ . Utilizou-se atmosfera de nitrogênio, com fluxo de  $20\text{ mL min}^{-1}$ .

O equipamento foi calibrado para a temperatura utilizando como padrões os pontos de fusão do índio (PF=  $156,6^{\circ}\text{C}$ ) e zinco metálico (PF=  $419,5^{\circ}\text{C}$ ) com pureza de  $99,99^{\circ}\text{C}$ . A calibração para energia foi feita com base na entalpia de fusão do índio metálico ( $\Delta H_{\text{Fusão}} = 28,54\text{ Jg}^{-1}$ ).

As curvas DSC foram analisadas pelo programa TA *Instruments Universal Analysis* 2000, versão 4.7A, da TA *Instruments*, a fim de caracterizar as transições de fase, etapas de decomposição e perda de massa das mesmas.

Este ensaio foi realizado no Laboratório de Análise Térmica da unidade do Laboratório de Certificação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste – CERTBIO/UEPB.

#### 4.2.11 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Durante a preparação da amostra, uma gotícula da ME foi colocada sobre uma grade de carbono coberta com filme de *holey carbon*. Posteriormente, foi aplicada uma solução aquosa do corante (ácido fosfotúngstico/ PTA 2%) e deixou-se secar a amostra. Por fim, foi examinada em microscópio eletrônico de transmissão (Modelo Morgani 268, FEI, Estados Unidos). Esta análise foi realizada no CETENE (Centro de Tecnologia Estratégicas do Nordeste).



#### **4.2.12 Microscopia de luz polarizada**

A isotropia das formulações foram verificadas por microscopia de luz polarizada utilizando microscópio (Modelo Leitz DM RXE, Leica, Alemanha), acoplado com câmera 2 Mega Pixel modelo Moticam 2000 e Software analisador de imagem Motic Images Advanced 3.2. Esta análise foi realizada no Laboratório Multiusuário de Imagens da Faculdade de Ciências Farmacêuticas UNESP.

#### **4.2.13 Reologia**

As propriedades reológicas das formulações foram analisadas utilizando-se ensaios de escoamento e oscilação. As análises foram realizadas utilizando-se o reômetro (Modelo Physica MCR301, Anton Paar, Austria) com a geometria de cilindros concêntricos. As leituras foram feitas no intervalo de 0 a  $100 \text{ s}^{-1}$  para a curva ascendente e de  $100$  a  $0 \text{ s}^{-1}$  para curva descendente. Durante o ensaio a temperatura foi mantida constante em  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . Com auxílio do software Rheoplus/32 versão 3.40 (Anton Paar, Austria) foram plotadas curvas de escoamento relacionando a tensão de cisalhamento ou a viscosidade com a taxa de cisalhamento para descrever as características de fluxo das formulações. A viscosidade dos sistemas foi calculada através do coeficiente angular da curva.

#### **4.2.14 Tamanho de gotículas por espalhamento de luz dinâmico (DLS) e Índice de polidispersão**

O tamanho das gotículas de ME foi determinada em um equipamento Zetaplus (Brookhaven Instruments, EUA). Todas as medidas foram realizadas em triplicata a temperatura constante de  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  com feixe de luz de comprimento de onda de  $659,0\text{nm}$ , com ângulo de incidência de  $90^\circ\text{C}$ . Para cada amostra foram feitas 5 leituras de 1 minuto cada. A análise foi feita com a ME bruta (sem diluir) e com sucessivas diluições com água destilada (1:10, 1:50, 1:100 e 1:500).

#### **4.2.15 Potencial zeta**

O potencial zeta das formulações foi obtido utilizando o equipamento Zetaplus (Brookhaven Instruments, EUA). A análise foi feita com a ME bruta (sem diluir) e com

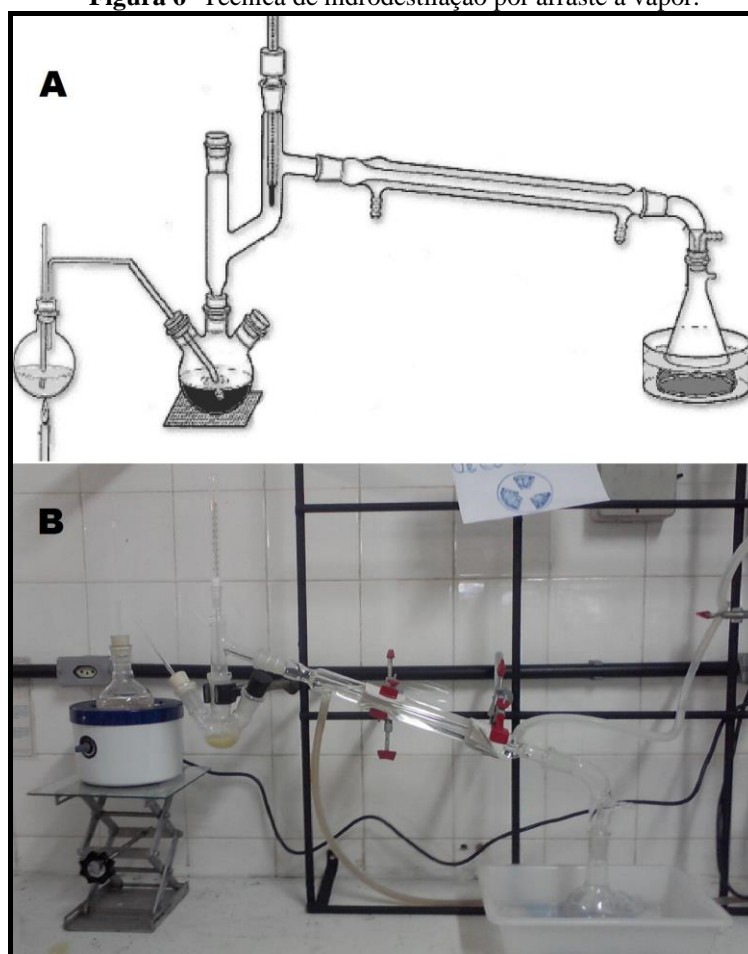
sucessivas diluições com água destilada (1:10, 1:50, 1:100 e 1:500). A técnica foi realizada no laboratório.

#### **4.2.16 Doseamento do marcador $\beta$ -cariofileno no óleo de copaíba puro e incorporado na ME**

##### *Preparo da amostra*

Para se obter a fração volátil do óleo de copaíba foi realizado a técnica de arraste a vapor, utilizando um aparato tipo Clevenger (Figura 6). Onde o vapor de água passa pelo balão que contem a amostra a ser destilada (óleo de copaíba puro ou ME) através de uma cânula de vidro. Neste balão, encontra-se a amostra e a água condensada, na fase líquida, e, na fase de vapor. O vapor após passar no condensador, irá se condensar para um líquido de duas fases imiscíveis: a fase aquosa proveniente da água em ebulição e a fase orgânica (fração volátil) do óleo. Ao final do experimento (cerca de duas horas) a fonte de energia térmica é desligada, espera-se 15 minutos para resfriamento do aparelho e lava-se o condensador com 2mL de diclorometano, a mistura é levada a funil de separação e a fase orgânica é coletada em *eppendorf* contendo sulfato de sódio anidro.

**Figura 6-** Técnica de hidrodestilação por arraste a vapor.



LEGENDA: A- Representação esquemática do aparelho de destilação por arraste a vapor; B- Aparelho utilizado para realização dos experimentos  
(FONTE: Dados da pesquisa)

#### *Preparo da solução padrão*

Para solução de referência foram pesados cerca de 10mg de *trans* (-)-cariofileno (Sigma®). e solubilizados em 1mL de diclorometano.

#### *Condições cromatográficas*

Para a análise cromatográfica foram injetadas 1 $\mu$ L em triplicata de solução padrão ou da fração volátil no cromatógrafo gasoso. Foi utilizado cromatógrafo Shimadzu, modelo GC-17<sup>a</sup>, equipado com detector de ionização de chama (DIC). Foi utilizada uma coluna capilar de 30m de comprimento e 0,25mm de diâmetro interno, com revestimento interno de 0,25  $\mu$ m composto por (5%fenil)-metilpolisiloxano (DB-5); A temperatura do injetor e do detector foram mantidas em 250°C e 260°C respectivamente; Hélio foi utilizado como gás de arraste a uma vazão de 2,0 mL.min<sup>-1</sup>, o volume de injeção foi de 0,5  $\mu$ L e razão de Split de 50; a programação da temperatura do forno foi de um gradiente com temperatura inicial de 120°C

durante 5 minutos, com taxa de aumento de 2°C/min até 160°C seguidos por taxa de aumento de 20°C/min até 240°C e mantidos por 5min. Os cromatogramas foram registrados e as áreas dos picos integrados. Utilizando a técnica de normalização interna a concentração da fração volátil e do  $\beta$ -cariofileno foram determinados pelo equipamento. Esta análise foi feita no NUDEF (Núcleo de Desenvolvimento Analítico e Tecnológico de Produtos Naturais).

#### **4.2.17 Avaliação da atividade antibacteriana e determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)**

##### *Cepas utilizadas*

Para a avaliação da atividade antibacteriana foram selecionadas 3 cepas *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). Os microrganismos foram obtidos do Laboratório de Desenvolvimento e Ensaios em Medicamentos (Universidade Estadual da Paraíba – UEPB).

##### *Cultivo dos microrganismos*

As cepas de bactérias foram previamente semeadas em Ágar Muller Hinton e incubadas por um período de 24 horas antes da realização dos testes de atividade antimicrobiana.

##### *Obtenção dos inóculos*

Inicialmente foram selecionadas 5 colônias com diâmetro próximo a 1 mm da cultura de 24 horas para cepas de bactérias. As colônias foram suspensas em 5mL de solução salina estéril 0,145mol/L (8,5 g.L<sup>-1</sup> NaCl; Salina a 0,85%).

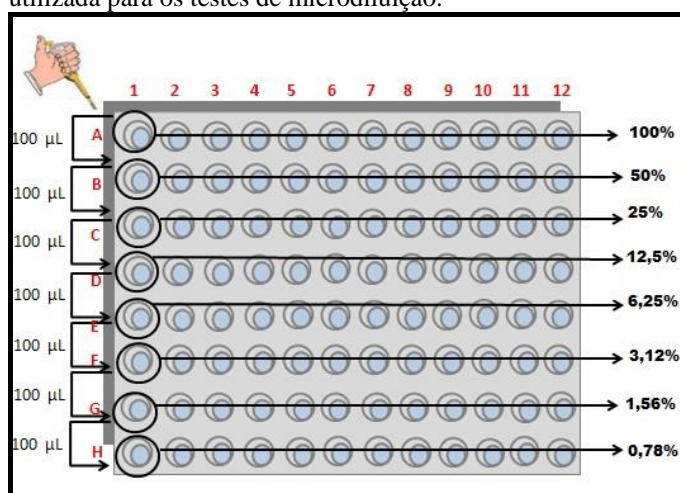
A suspensão resultante foi colocada em agitador tipo vórtex durante 15 segundos e a densidade celular ajustada em espectrofotômetro (Modelo 35D, Biosistem, Brasil), acrescentando-se solução salina para obter a transmitância de 85%, equivalente de uma solução da escala de McFarlad 0,5, em comprimento de onda de 530nm, fornecendo uma suspensão-padrão de  $1 \times 10^6$  a  $5 \times 10^6$  células por mL. A suspensão é padronizada fazendo-se uma diluição de 1:100 seguida de uma diluição de 1:20 da suspensão-padrão, resultando em uma concentração de  $10^6$  UFC/mL.

### Teste de microdiluição

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizada de acordo com os documentos M27A2 e M27S3 do *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI), com adaptações.

Inicialmente foi realizada a reativação das cepas, onde foram adicionados 100µL de Caldo Muller Hinton no orifício das placas de microdiluição com 96 poços dispostos em 12 colunas e 8 linhas. Em cada placa foi feita a análise de um microrganismo. A primeira coluna das placas foi destinada à análise da formulação ME-F2, a segunda coluna foi destinada à formulação ME-F6, a terceira coluna ao óleo *in natura*, a quarta coluna apenas os tensoativos que compunham as ME para verificar se estes apresentaram atividade antimicrobiana. Desse modo, foi adicionado 100µL das formulações ME-F2 e ME-F6 e do óleo na primeira linha da placa de microdiluição. E em seguida, foi feita a diluição seriada partindo-se da primeira linha (concentração inicial/100%) sendo retirado 100µL do poço anterior para o posterior, até completar a última linha, sendo descartado os 100µL da última linha (diluições 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,12%, 1,56%, 0,78%) (Figura 7). Para análise do óleo de copaíba puro foi utilizado um tensoativo (Tween 80<sup>®</sup>) em concentração de 10% em solução com óleo (TAKARADA et al., 2004; COX et al., 2000). A análise foi realizada em duplicata.

**Figura 7-** Representação esquemática da microplaca utilizada para os testes de microdiluição.



(FONTE: Dados da pesquisa)

### Incubação

As microplacas foram incubadas por um período de 24 horas em estufa a 37°C e ao final deste tempo foi adicionado o corante resazurina, e incubadas por mais 2 horas para visualização dos resultados. O corante é azul e na presença de bactérias apresenta-se com a

coloração rosada, logo se houver atividade das substâncias testadas o poço permanece azul. CIM foi definida como a concentração mais baixa de óleo na ME que inibiu o crescimento visível, tal como indicado pela coloração.

#### **4.2.18 Avaliação da atividade antifúngica e determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)**

##### *Cepas utilizadas*

Para a avaliação da atividade antifúngica foram selecionadas 4 cepas *Candida albicans* (ATCC 18804), *Candida tropicalis* (ATCC 34135), *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) e *Cryptococcus neoformans* (proveniente do Laboratório de Micologia da Universidade Federal da Paraíba/UFPB- Cepa LM10). Os microrganismos foram obtidos do Laboratório de Desenvolvimento e Ensaio em Medicamentos (Universidade Estadual da Paraíba – UEPB).

##### *Cultivo dos microrganismos*

As cepas de fungos foram previamente semeadas em Agar Sabouraud e incubadas por um período de 48 horas antes da realização dos testes de atividade antifúngica.

##### *Preparo do inóculo*

Para o preparo do inóculo foram selecionadas 5 colônias com diâmetro próximo a 1 mm da cultura de 48 horas das cepas de fungos testadas. As colônias foram suspensas em 5mL de solução salina estéril 0,145mol/L (8,5 g.L<sup>-1</sup> NaCl; Salina a 0,85%). A padronização da suspensão foi feita exatamente como descrita para atividade antibacteriana.

##### *Teste de microdiluição*

Para realização do teste de microdiluição utilizou-se a mesma técnica desenvolvida para avaliar atividade antibacteriana, no entanto, foi utilizado caldo Sabouraud como meio e um controle positivo na décima primeira coluna da placa (Fluconazol 32µL.mL<sup>-1</sup>).

##### *Incubação*

As microplacas foram incubadas por um período de 2 horas em estufa a 37°C e ao final deste tempo foi adicionado o corante TCT (2,3,5, cloreto de trifetil tetrazólio), e incubadas por mais 2 horas para visualização dos resultados. O corante é amarelo e na

presença de fungos apresenta-se com a coloração avermelhada, logo se houver atividade das substâncias testadas o poço permanece transparente.

#### **4.2.19 Determinação *in vivo* da atividade antiedematogênica por edema de pata 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<sup>®</sup>) *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 dietilamnônio/emugel). Os outros grupos (3,4 e 5) corresponderam aos grupos testes. O grupo 3 e 4 testaram ME-F2 e ME-F6, respectivamente e o grupo 5 o óleo de copaíba *in natura*. Foi administrada uma 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 $\mu\text{L}$  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 realizado a leitura do volume das patas dos animais com o auxílio de um paquímetro digital (Messen, Brasil) (Figura 8). 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 estatística utilizada para os resultados obtidos foram determinados a partir do programa 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.

**Figura 8-** Determinação do volume do edema induzido por carragenina em ratos Wistar



(FONTE: Dados da pesquisa)



## *Resultados e Discussão*

---

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 DETERMINAÇÃO DO EHL CRÍTICO (EHLc) DO ÓLEO DE COPAÍBA

A fim de determinar o EHLc de um óleo, emulsões são produzidas com diferentes proporções de mistura de tensoativos representando diferentes EHLs, e são investigadas em relação a sua estabilidade (SHISHU, RAJAN, KAMALPREET, 2009).

Para a determinação do EHLc do óleo de copaíba foram preparadas 11 emulsões de valores de EHLs entre 5 a 15, associando os tensoativos Tween<sup>®</sup> 20 e Spam<sup>®</sup> 80 (Tabela 3). Dentre estas, apenas as emulsões 7 e 8 de valores de EHL 11 e 12, respectivamente permaneceram estáveis até o período de 90 dias. As demais ocorreram cremeação ou completa separação de fases. Desta forma, considerou-se o EHL crítico do óleo de copaíba entre 11 e 12. Observa-se uma discrepância com o valor de EHL (15) do óleo de copaíba (*Copaifera langsdorffii*) determinado por Xavier Júnior (2011). Supõe-se que a espécie possa influenciar no valor de EHL de cada óleo do gênero *Copaifera*, talvez pela variação na composição química destes óleos. De acordo com Monte e colaboradores (2009), as concentrações e a natureza das espécies de sesquiterpenos e diterpenos podem variar entre as espécies, porém estão sempre presentes nos óleos de copaíba. Em outro estudo foi analisado cromatogramas de amostras de óleos de diferentes espécies do gênero *Copaifera*, verificando variações nas frações diterpênicas e sesquiterpênicas (VEIGA JÚNIOR et al., 2007).

### 5.2 ESCOLHA DOS TENSOATIVOS E DETERMINAÇÃO DO EHL DO SISTEMA

As ME têm a capacidade de fornecer quantidades maiores de água e agentes aplicados na pele do que a água isoladamente ou outros veículos tradicionais, tais como loções ou cremes porque elas agem melhorando a solubilização de fármacos pouco solúveis (GRAMPUROHIT, RAVIKUMAR, MALLYA, 2010), atuando como agentes promissores tanto para ação tópica (SHALURI et al., 2011; PATEL et al., 2011; DABHI et al., 2011), como transdérmica (BURKE et al., 2011; FANUN, 2009, 2010, 2011).

Os tensoativos não-iônicos mostram vantagens particulares devido a baixa toxicidade às membranas celulares, baixa irritabilidade, elevada estabilidade química e por promoverem uma grande permeabilidade do fármaco pela pele, por isso são preferíveis para desenvolvimento de formulações de aplicação tópica (GRAMPUROHIT, RAVIKUMAR, MALLYA, 2010; TENJARLA, 1999). Possuem também maior grau de compatibilidade com

diversas substâncias, quando comparados aos tensoativos catiônicos e aniônicos e são menos sensíveis às alterações de pH ou à adição de eletrólitos (BILLANY, 2005). Desta forma, para o desenvolvimento das ME em estudo, foi utilizado o tensoativo Labrasol<sup>®</sup>, de caráter hidrofílico (HLB 14), e Plurol oleique<sup>®</sup>, lipofílico (HLB 6), que designamos como cotensoativo. A literatura mostra que a adição de um cotensoativo diminui o tamanho das gotículas e amplia as regiões de ME nos DFPT (MAGHRABY, 2008; MA, WU, 2012), por reduzir de forma significativa a tensão interfacial do sistema (DAMASCENO et al., 2011; TROTTA; PATTARINO; IGNONI, 2002).

Os sistemas mais comumente encontrados utilizam como cotensoativos alcoóis de cadeia curta, como butanol, pentanol e hexanol, os quais apresentam certa toxicidade e tornam-se inadequados para uso farmacêutico (SUBRAMANIAN et al., 2004). O Labrasol<sup>®</sup> tem demonstrado capacidade de formar ME com alguns cotensoativos não-alcóolicos, diminuindo o risco de reações toxicológicas e aumentando a relevância farmacêutica das ME (SINTOV; SHAPIRO, 2004).

A fase oleosa foi composta pelo óleo de copaíba *in natura*, previamente submetido a um processo de purificação. Segundo Cunha Júnior et al. (2003), o grau de pureza de óleos de origem vegetal deve ser elevado, no sentido de prevenir a ocorrência de irritação que pode ser provocada pelos constituintes presentes em óleos com baixa pureza.

Óleos de origem vegetal ou semi-sintética, constituídos principalmente de triglicerídeos de cadeia média (TCM) e longa (TCL), têm sido extensivamente empregados, principalmente por estarem em conformidade com os princípios da química verde, pelo fato de serem obtidos por fontes renováveis (FASOLIN, SANTANA, CUNHA, 2012; MENDONÇA et al., 2009; ZIELINSKA et al., 2008). O óleo de copaíba são considerados TCM sendo cerca de 100 vezes mais miscíveis em água do que os análogos de cadeia longa e são assim capazes de dissolver elevadas concentrações de fármacos das classes biofarmacêuticas II e IV, ou seja, lipossolúveis (FRONZA, CAMPOS, TEIXEIRA, 2004).

Um outro parâmetro que levou-se em consideração para escolha destes tensoativos foi o EHL do sistema (T/CO), pois de acordo com Schmidts e colaboradores (2010), as ME são melhores formuladas quando o valor de EHL crítico do óleo está próximo ao EHL da mistura de T/CO.

Após a determinação do EHL do óleo de copaíba (11-12), foi determinado o EHL requerido para mistura de tensoativos (Labrasol<sup>®</sup>/ HLB 14 e Plurol oleique<sup>®</sup>/ HLB 6) mais próximo, a fim de se obter o máximo de equilíbrio do sistema, levando a formação de amplas regiões de ME no DFPT. Para o DFPT 2:1 e 4:1 (proporção T/CO) obteve-se valores de EHL

de 11,33 e 12,4, respectivamente. Desta forma, estes foram os diagramas selecionados para a pesquisa.

### 5.3 DIAGRAMAS DE FASES PSEUDOTERNÁRIOS (DFPT)

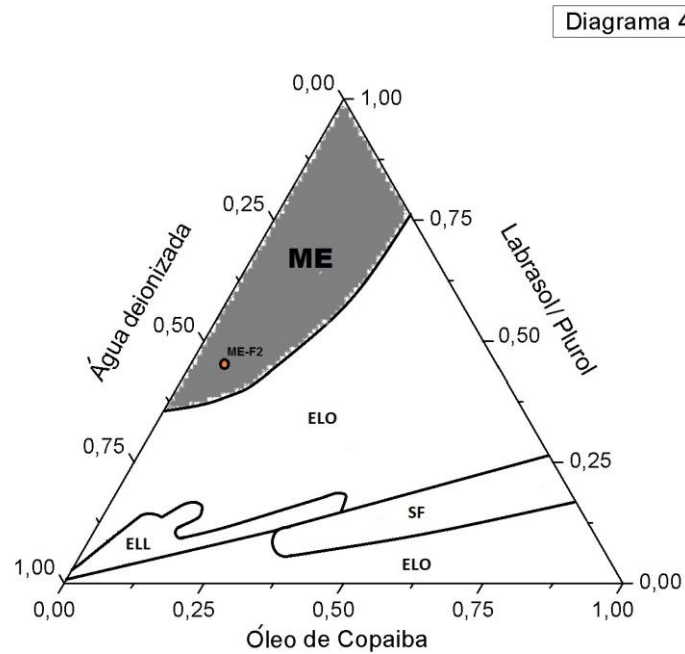
A construção de DFPT pode requerer um gasto dispendioso de tempo, principalmente quando um dos objetivos é delinear com precisão os limites de cada fase. Além disso, a sonicação pode ser utilizada para se alcançar rapidamente o equilíbrio, principalmente quando são usados tensoativos não-iônicos (WARISNOICHAROEN et al., 2000). Este método é considerado rápido e eficiente para o desenvolvimento de ME com gotículas de pequeno diâmetro e baixa polidispersidade (LIN, CHEN, 2008). A sonda de ultrassom (sonicador) produz ondas de comprimento de onda na ordem de 10 nm, que causam a ruptura das gotas da emulsão por cavitação. Cavitação consiste na formação e no colapso de milhões de bolhas minúsculas dentro de um líquido. Ela é produzida pela alternância de ondas sonoras de pressões altas e baixas geradas pelo ultrassom. Estas ondas sonoras de alta frequência são produzidas por um gerador de ultrassom e, convertidas por um transdutor em ondas mecânicas no interior do líquido. Durante a fase de baixa pressão, as bolhas crescem, em tamanho microscópico, até que atinjam a fase de pressão alta, na qual elas são comprimidas e implodem (HIELSCHER, 2005).

Os DFPT podem ser obtidos a partir de dados de titulação ou pela preparação de amplo número de amostras com diferentes proporções dos componentes. A vantagem do primeiro método é que este pode ser usado para estudar amplo número de amostras de diferentes composições de maneira rápida (LAWRENCE, REES, 2000; BHARGAVA et al., 1987). Normalmente, as ME podem ser diferenciadas visualmente dos outros sistemas, uma vez que os demais sistemas apresentam como emulsões líquidas opacas, emulsões géis opacas, representadas por sistemas de viscosidade elevada, ou com separação de fases. Já as ME líquidas são caracterizados como sistemas translúcidos ou opticamente transparentes (DJORDJEVIC et al., 2004; FORMARIZ, 2004).

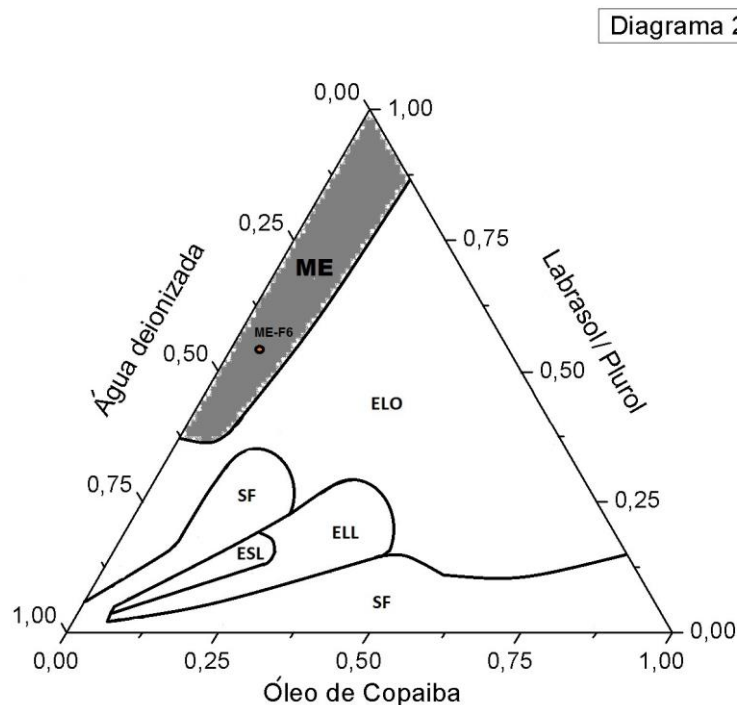
A técnica empregada para a determinação dos DFPT destes sistemas mostrou-se bastante simples e reprodutível. Após as titulações, foi possível definir as várias regiões do diagrama, como separação de fases (SF), emulsão líquida branca leitosa (ELBL), emulsão líquida opaca (ELO), emulsão semi-sólida leitosa (ESL) e regiões opticamente transparentes que foram classificadas visualmente como microemulsões (ME), como representada nas Figuras 9 e 10. Observa-se uma faixa do lado esquerdo de cada diagrama de uma região de

ME, para as proporções 4:1 e 2:1 de tensoativo/co-tensoativo. Como esta região existe um predomínio de fase aquosa e uma concentração relativa de tensoativos, esta faixa é representativa de ME do tipo O/A, com volume de fase interna pequeno (OLIVEIRA et al., 2004).

**Figura 9-** Diagrama de fases pseudoternário na proporção 4:1 (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 10-** Diagrama de fases pseudoternário na proporção 2:1 (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).

#### 5.4 SELEÇÃO DAS FORMULAÇÕES

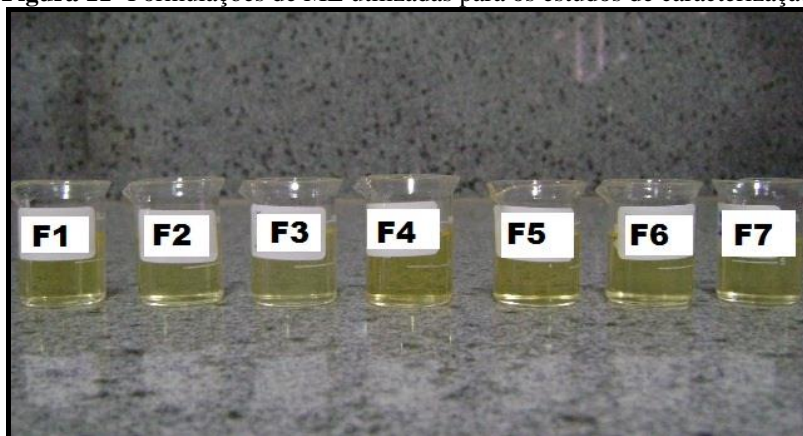
Das regiões de ME dos dois diagramas desenvolvidos, foram selecionadas sete formulações para os estudos de caracterização, variando as proporções dos componentes. A composição de cada formulação está descrita na Tabela 4. Todas as formulações mantiveram-se líquidas, de coloração amarelada, límpidas e transparentes após o período de 48 horas antes da realização das análises (Figura 11).

**Tabela 4-** Composição centesimal das formulações utilizadas para os estudos de caracterização.

| Componente             | Diagrama 4:1 (%) |        |        | Diagrama 2:1 (%) |        |        |        |
|------------------------|------------------|--------|--------|------------------|--------|--------|--------|
|                        | ME-F1            | ME-F2  | ME-F3  | ME-F4            | ME-F5  | ME-F6  | ME-F7  |
| <b>Plurol Oleique®</b> | 9,76%            | 8,46%  | 7,18%  | 23,06%           | 20,70% | 18,30% | 15,86% |
| <b>Labrasol®</b>       | 39,04%           | 33,84% | 28,70% | 46,13%           | 41,40% | 36,60% | 31,73% |
| <b>Óleo de Copaiba</b> | 12,20%           | 10,60% | 9,0%   | 7,70%            | 6,90%  | 6,10%  | 5,30%  |
| <b>Água</b>            | 39,0%            | 47,10% | 55,20% | 23,10%           | 31,0%  | 39,0%  | 47,10% |

(FONTE: Dados da pesquisa)

**Figura 11-** Formulações de ME utilizadas para os estudos de caracterização.



(FONTE: Dados da pesquisa).

### 5.5 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS ME

A caracterização da estrutura formada em sistemas dispersos, como as ME, é muitas vezes difícil. Com a necessidade da diluição prévia da amostra, podem ocorrer reorganizações moleculares ou transições de fase, constituindo-se uma limitação para a caracterização do sistema (LAWRENCE, 2000). Portanto, torna-se necessária a combinação de várias técnicas para obter-se uma caracterização mais precisa (BRUXEL et al., 2012).

A Tabela 5 mostra os resultados obtidos da caracterização dos sete sistemas desenvolvidos. Inicialmente todas as formulações foram centrifugadas até a rotação de 4382.56g. O teste de centrifugação produz estresse na amostra simulando um aumento na força de gravidade, atuando sobre a amostra, aumentando a mobilidade das gotículas no seu interior, deixando visível possíveis instabilidades. Todas as formulações avaliadas mantiveram-se estáveis, sem separação de fases.

A acidez das formulações poderia gerar uma preocupação em relação à manutenção do equilíbrio hidro-lipídico da superfície cutânea, convencionalmente designada de manto ácido cutâneo (ZLOTOGORSKI, 1987). A pele apresenta pH levemente ácido (4,6-5,8) que contribui para que ocorra proteção bactericida e fungicida em sua superfície, contudo, frequentemente sofre alteração em consequência da utilização de produtos tópicos inadequados, expondo-a à uma série de agentes agressores, em especial micro-organismos (LEONARDI et al., 2002). Desta forma, as formulações testadas por se encontrarem na faixa do pH cutâneo, são consideradas aceitáveis, por evitar assim o risco de contaminação e irritação tópica (JAIN et al., 2010). Estes valores de pH verificados também encontram-se

dentro da faixa de maior estabilidade física e química para formulações (pH 5,5 a 8,0) (FRONZA; CAMPOS; TEIXEIRA, 2004).

A condutividade elétrica é um parâmetro indicativo da estrutura do sistema, sendo considerados sistemas do tipo A/O com valores de condutividade reduzidos, e O/A de valores maiores, diretamente relacionado a fase externa do sistema (BUMAJDAD; EASTOE, 2004). Os valores obtidos de condutividade das formulações em estudo sugerem que se trata de sistemas do tipo O/A, por sua predominância da fase aquosa (MORAIS, 2006).

O aumento da quantidade de fase aquosa nas formulações tem influência também no valor do índice de refração (IR). O aumento desta fase promove a redução do IR, como também a diminuição da proporção de fase oleosa, devido o IR do óleo de copaíba ser mais alto (1,498) que o da água que é de 1,3330. Desta forma, a diferença nas proporções destes componentes pode influenciar diretamente neste parâmetro. No entanto, valores próximos de IR foram observados nas duas formulações (Tabela 5).

**Tabela 5-** Estudos de caracterização preliminar (pH, condutividade elétrica, índice de refração e centrifugação) das formulações em estudo.

| Parâmetro                               | ME-F1        | ME-F2         | ME-F3        | ME-F4        | ME-F5        | ME-F6         | ME-F7        |
|---|--------------|---------------|--------------|--------------|--------------|---------------|--------------|
| Aspecto macroscópico                    | Límpido      | Límpido       | Límpido      | Límpido      | Límpido      | Límpido       | Límpido      |
| pH                                      | 5,02± 0,01   | 5,25 ± 0,03   | 5,29± 0,01   | 5,55± 0,04   | 5,69± 0,02   | 5,74 ± 0,01   | 5,77± 0,02   |
| Condutividade ( $\mu\text{S cm}^{-1}$ ) | 109,75± 1,03 | 120,90 ± 0,80 | 127,1± 1,10  | 69,07± 0,80  | 72,88± 0,90  | 79,47 ± 1,26  | 92,05± 1,04  |
| Índice de refração                      | 1,426± 0,002 | 1,412 ± 0,002 | 1,447± 0,003 | 1,437± 0,002 | 1,433± 0,001 | 1,426 ± 0,001 | 1,432± 0,002 |
| Centrifugação                           | Estável      | Estável       | Estável      | Estável      | Estável      | Estável       | Estável      |

(FONTE: Dados da pesquisa)

Como os próximos testes de caracterização foram realizados em laboratórios parceiros, tornou-se necessário uma redução na quantidade de amostras. Desta forma, foi selecionada uma formulação de cada diagrama para os estudos posteriores. Como nas análises anteriores não houve nenhuma formulação fora dos parâmetros analisados, não apresentando diferença estatisticamente significativa entre as formulações ( $p > 0,05$ ), selecionou-se as duas formulações levando em consideração os critérios de melhores proporções de componentes, principalmente as formulações que continham menor concentração de tensoativos e que apresentaram melhor estabilidade no período de 3 meses. No caso do diagrama 4:1 a ME-F3 que apresentava menor proporção de tensoativos tornou-se levemente turva após este período,

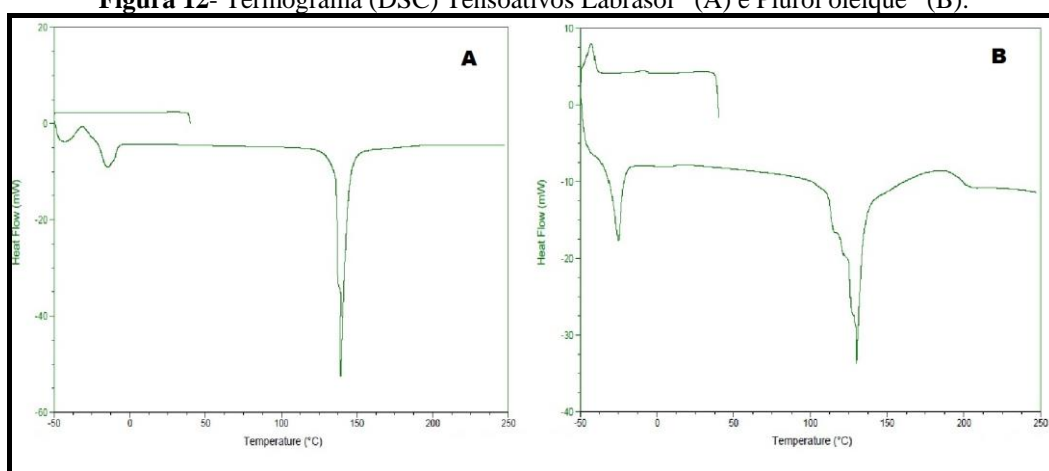


sendo selecionada a ME-F2, que manteve-se suas características. No diagrama 2:1 situação semelhante foi observada, selecionando-se a ME-F6 para estudos de caracterização seguintes. As duas formulações selecionadas continham 10,6% e 6,1% de óleo de copaíba, respectivamente.

A DSC é uma ferramenta analítica que pode ser utilizada na determinação indireta da estrutura de sistemas microemulsionados. Garti et al. (1996) utilizaram pela primeira vez a DSC em baixas temperaturas para investigar o comportamento da água em ME não- iônicas. Levando em consideração os termogramas isolados dos componentes água, óleo e tensoativos, bem como os termogramas das formulações pode-se correlacionar os picos apresentados com as formas de estruturação dos sistemas. As Figuras 12, 13 e 14 representam os termogramas obtidos durante a análise de DSC dos componentes isolados.

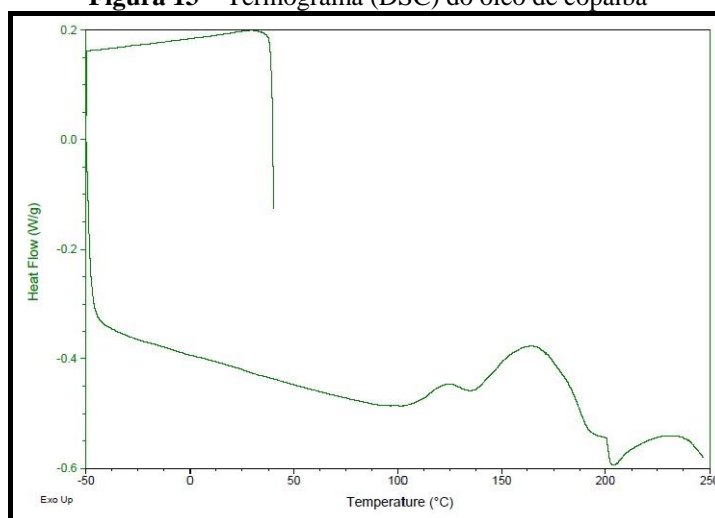
O termograma do Labrasol<sup>®</sup> (Figura 11-A) verificou-se pico exotérmico na temperatura de -20,7°C e dois picos endotérmicos nas temperaturas de -12,1°C e 142,3°C. Quanto ao Plurol oleique<sup>®</sup> (Figura 11-B), foram observados um pico exotérmico de -34,1°C e endotérmicos de -24,8°C e 138°C.

**Figura 12-** Termograma (DSC) Tensoativos Labrasol<sup>®</sup> (A) e Plurol oleique<sup>®</sup> (B).



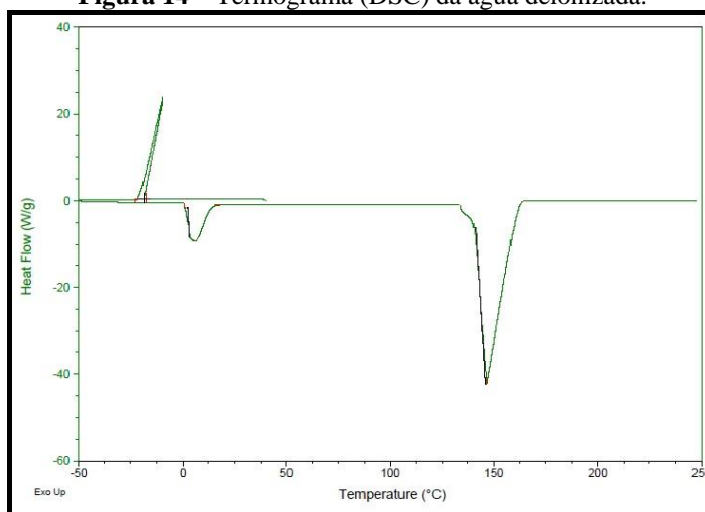
(FONTE: Dados da pesquisa)

O termograma do óleo de copaíba puro apresentou picos endotérmicos e exotérmicos a temperaturas superiores a 100°C. Segundo Veiga Júnior e Pinto (2001), o óleo de copaíba apresenta pontos de fusão e solidificação acima desta temperatura e ponto de ebulição acima de 200°C, principalmente devido a alta concentração do componente cariofileno nestes óleos o qual apresenta ponto de ebulição de (258- 261°C) (Figura 13).

**Figura 13** – Termograma (DSC) do óleo de copaíba

(FONTE: Dados da pesquisa)

Na análise da água (Figura 16) foram evidenciados um pico exotérmico na temperatura de  $-9,21^{\circ}\text{C}$ , entalpia ( $\Delta H= 360,0\text{J/g}$ ) e um pico endotérmico a  $5,82^{\circ}\text{C}$  ( $\Delta H= 424,0\text{J/g}$ ). Estes picos estão relacionados respectivamente aos processos de solidificação e fusão da água analisada (Figura 14).

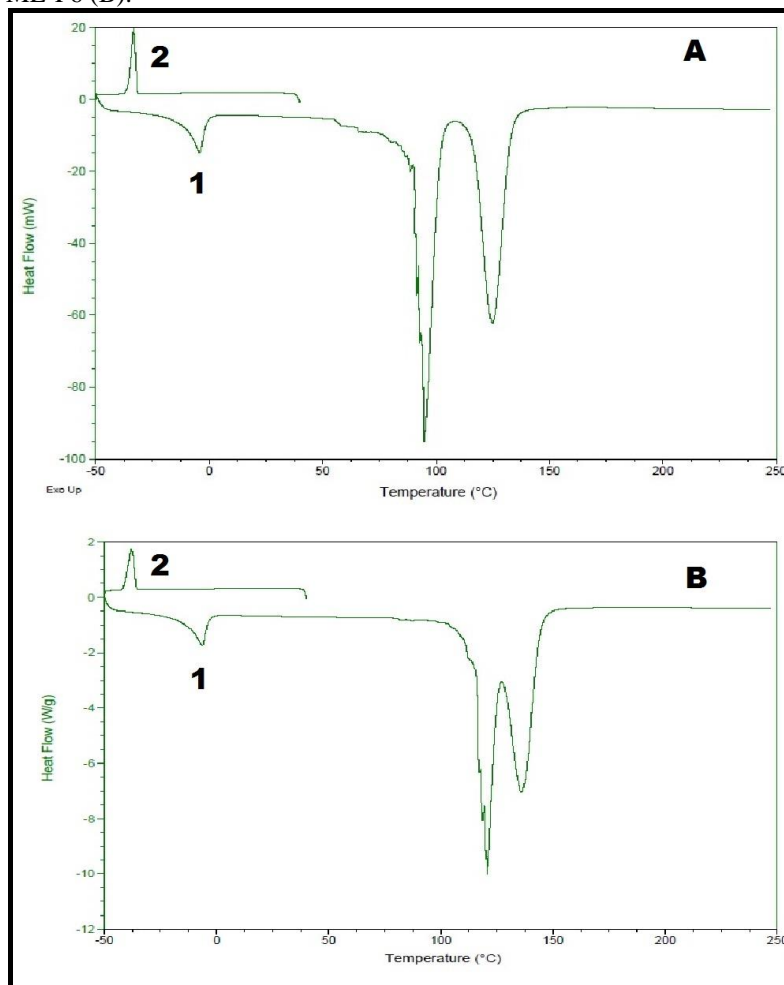
**Figura 14** – Termograma (DSC) da água deionizada.

(FONTE: Dados da pesquisa)

A Figura 15 mostra os termogramas das formulações em estudo (ME-F2 e ME-F6), respectivamente. Pode-se observar eventos endotérmicos em ambas as formulações que podem estar relacionados à fusão da água livre (pico 1:  $-4,04^{\circ}\text{C}$  e  $-6,26^{\circ}\text{C}$ ), onde esta possui propriedades físico-químicas semelhantes às da água pura. Também se verifica picos exotérmicos nas temperaturas de (pico 2:  $-33,10^{\circ}\text{C}$  e  $-38,00^{\circ}\text{C}$ ), representando os picos de solidificação. Dependendo da posição do pico de solidificação na curva de resfriamento do DSC o estado físico dos sistemas pode ser sugerido (HEUSCHKEL, WOHLRAB,

NEUBERT, 2009). Estes picos (2) estão relacionados à água interfacial do sistema correspondente a água que interage com tensoativos. Devido a essa interação, ocorre alterações nas propriedades termodinâmicas da água, como ponto de solidificação, ponto de fusão, entalpia e capacidade calorífica da água (JUNYAPRASERT et al., 2007; GARTI et al., 2000). Assim, pode-se visualizar no termograma de DSC o pico de solidificação a uma temperatura mais baixa em comparação com o pico da água na forma livre (PODLOGAR et al., 2005). Desta forma, estes picos estão diretamente relacionados ao diferente grau de interação e miscibilidade entre as moléculas dos tensoativos e da água, o que pode ser confirmado também comparando com os picos de solidificação do Labrasol<sup>®</sup> (-20,7°C) e Plurol oleique<sup>®</sup> (-34,1°C) que se encontram próximos à temperatura de congelamento das ME (água interfacial) (HEUSCHKEL, WOHLRAB, NEUBERT, 2009).

**Figura 15** – Termograma (DSC) das formulações em estudo ME-F2 (A) e ME-F6 (B).



(FONTE: Dados da pesquisa)

Estes valores distintos dos picos de congelamento das duas formulações estão relacionados às diferentes proporções de tensoativos nestes sistemas. Desta forma, a formulação ME-F6 por apresentar maior proporção apresentou maior quantidade de água interfacial, conseqüentemente deslocou o pico de congelamento para temperaturas ainda menores. A presença de outros picos endotérmicos em faixas próximas a 100°C podem estar associados à interação do T/CO visto que ambos apresentaram um pico endotérmico próximo a essa temperatura quando analisados isoladamente e a ebulição da água.

A análise DSC de ME pode resultar em três comportamentos específicos: formulações do tipo água em óleo (A/O) apresentam apenas os picos relativos ao comportamento da fase oleosa; formulações do tipo óleo em água (O/A), por sua vez, apresentam apenas os picos relativos aos processos térmicos da água e microemulsões bicontínuas apresentam picos separados e distintos relacionados às fases aquosa e oleosa (ZHANG, MICHNIAK-KOHN, 2011). Como não foi observado no termograma picos relacionados ao óleo de copaíba sugere-

se que este possa estar presente na fase interna de gotículas em meio aquoso, o que é indicativo de ME do tipo O/A. No entanto, outras técnicas foram necessárias para caracterização da estrutura destes sistemas.

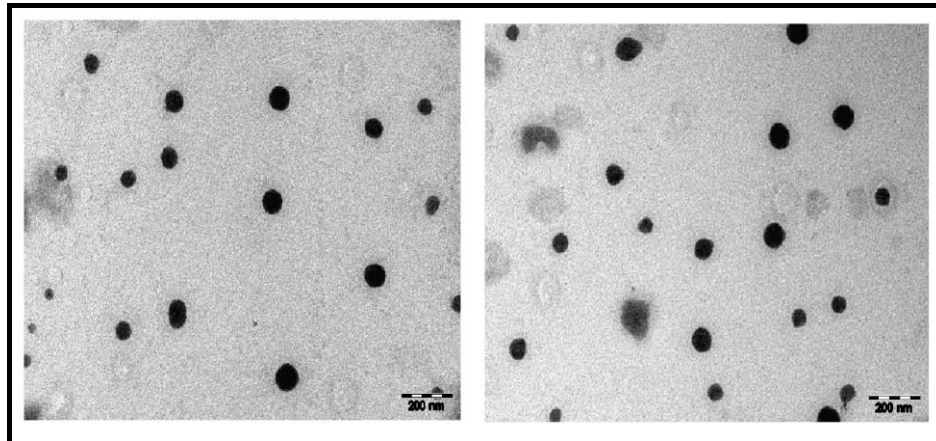
Em ato contínuo, na tentativa de definir a estrutura das ME selecionadas foram realizadas os ensaios de microscopia eletrônica de transmissão (MET) das ME. Este ensaio é normalmente empregado para a análise de sistemas coloidais, já que pode visualizar estruturas coexistentes e transições microestruturais (BALI et al., 2010; SILVA et al., 2009), podendo assim ser considerada uma análise preliminar do sistema coloidal (KLANG et al., 2012). Esta técnica consiste em preparar uma fina película da amostra, de modo que um feixe de elétrons possa atravessar a mesma. O contraste da imagem é obtido pelas interações dos elétrons com o material, ou seja, o espalhamento de elétrons. Técnicas de coloração são frequentemente empregados para melhor visualização de sistemas coloidais com MET, uma vez que são fáceis, rápidas e universalmente aplicável (KUNTSCHE et al., 2011; MASSOVER, 2008). Os corantes utilizados devem ser benignos para as amostras, formar uma fina camada vítrea após a secagem e os elétrons devem resistir aos danos da radiação de forma satisfatória (MASSOVER, 2008). No entanto, pode acontecer que determinados componentes da formulação não sofra interação com o corante utilizado, dificultando a visualização da estrutura (HAYAT, 2000). Para análise de ME, os corantes acetato de uranila (ARAÚJO et al., 2011; HATANAKA et al., 2010; SCHALBART et al., 2010) e ácido fosfotúngstico (PTA) (PATHAN, SETTI, 2011; LIU, YU, 2010; GANTA, AMIJI, 2009) são mais frequentemente empregados. Para avaliação das formulações em estudo foi utilizado o PTA 2%.

Assim como acontece com todas as técnicas baseadas em Microscopia eletrônica, pode ocorrer a formação de artefatos, devido ao processo de secagem, ocorrendo desidratação do sistema (ver metodologia) (ACHARYA, HARTLEY, 2012). Esse processo de secagem pode promover outras mudanças significativas no sistema, como agregação de gotículas tornando-as maiores. De acordo com Friedrich et al (2010), deve-se ter um grande cuidado durante a interpretação das imagens obtidas por MET.

A figura 16 mostra as fotomicrografias do MET dos dois sistemas avaliados. Observa-se a presença de gotículas esféricas de tamanhos uniformes, bem distribuídas no campo, sendo caracterizadas por gotículas oleosas circundadas por uma interface de tensoativos dispersas em um meio aquoso. A uniformidade do tamanho e na distribuição das gotículas está diretamente relacionada a estabilidade das formulações, visto que impede a agregação destas, evitando a formação de gotículas maiores, conseqüentemente a instabilidade do sistema

(COELHO, 2005). Como foram observadas gotículas de óleo de tamanhos inferiores a 200nm dispersas em água, pode-se inferir que se trata de sistemas microemulsionados.

**Figura 16-** Fotomicrografia das formulações ME-F2 e ME-F6, respectivamente (MET). Barra de escala: 200 nm.



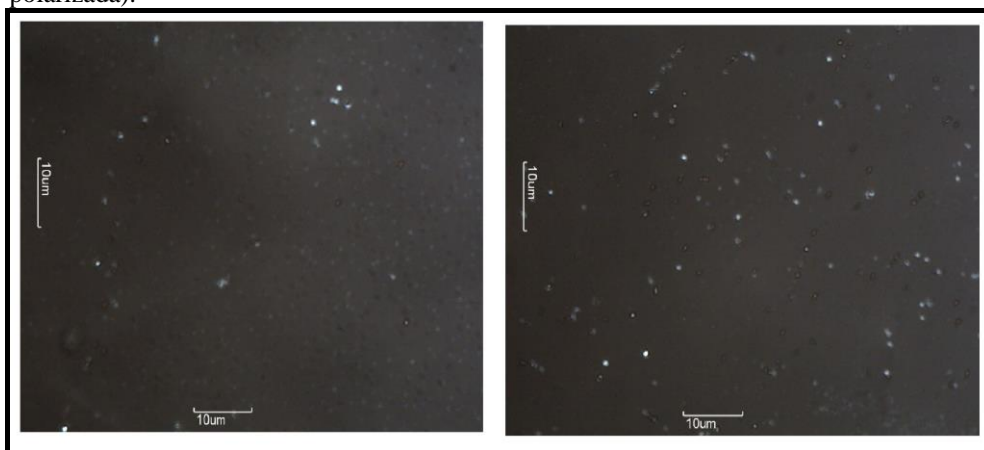
(FONTE: Dados da pesquisa)

Outra maneira de classificar os sistemas é através da determinação da isotropia óptica utilizando a técnica de microscopia de luz polarizada. Sob um plano de luz polarizada a amostra é considerada anisotrópica se for capaz de desviar o plano da luz incidente e isotrópica se não desviar a luz (HYDE, 2001). Materiais isotrópicos e anisotrópicos podem ser distinguidos através desta técnica.

As propriedades ópticas dos materiais anisotrópicos podem ser usadas para revelar informações sobre a estrutura e composição dos materiais. Assim, os materiais isotrópicos devem ter apenas um índice de refração e não restringir a direção da vibração de luz que passa através deles e exibam a mesma propriedade óptica em todas as direções. Por outro lado, materiais anisotrópicos devem ter propriedades ópticas que se alteram com a orientação da luz incidente, apresentando índices de refração dependendo da direção de propagação da luz através da substância e a orientação do plano de vibração (FORMARIZ et al., 2007). Mesofases lamelares e hexagonais são anisotrópicas, enquanto as cúbicas e as ME são isotrópicas (FORMARIZ et al., 2005; HYDE, 2001).

A Figura 17 mostra as fotomicrografias das formulações avaliadas. Pode-se observar que todas as amostras apresentaram-se como campos escuros, caracterizando a ausência de sistemas estruturados, como fase lamelar ou hexagonal, confirmando assim a isotropia dos sistemas (ME ou fases cúbicas).

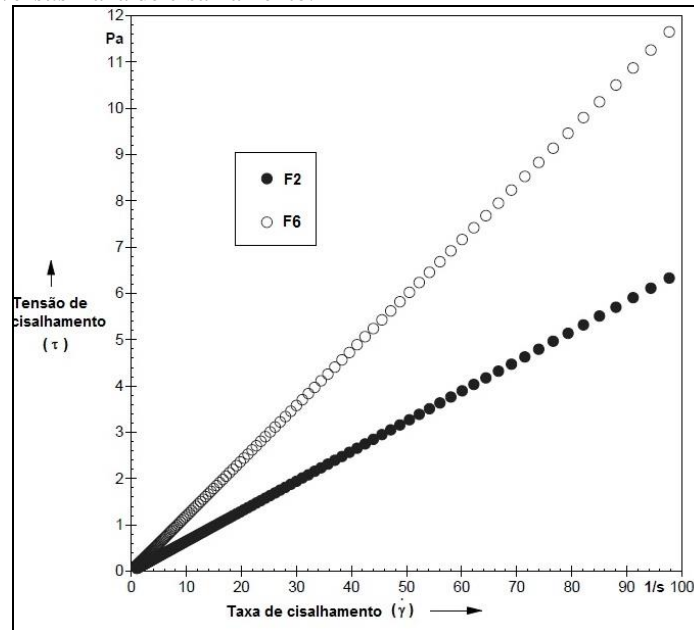
**Figura 17-** Fotomicrografias das formulações ME-F2 e ME-F6 (Microscopia de luz polarizada).



(FONTE: Dados da pesquisa)

No entanto, a possibilidade de se tratar de um sistema de fase cúbico foi descartado, pois além dos resultados do MET, onde foi observado gotículas esféricas, mas principalmente pelos dados da reologia. Ambos os sistemas apresentaram uma viscosidade constante em função da taxa de cisalhamento (Figura 18), com comportamento de fluxo ( $n=1$ ). Assim, todos os fluidos que seguem esse comportamento são denominados fluidos Newtonianos tempo- independente (DAMASCENO et al., 2011; FLORENCE et al., 2003). A figura da taxa de cisalhamento *versus* tensão de cisalhamento comporta-se como uma reta, onde ambas (ascendente e descendente) se sobrepõe (Figura 19). As ME usualmente comportam-se como fluidos Newtonianos, sendo adequada a aplicação tópica, visto sua baixa influência a mudanças de temperatura e pressão, refletindo bom espalhamento durante a aplicação e formação de filme uniforme na pele (MARGULIS- GOSHEN et al., 2010; SINTOV, LEVY, BOTNER, 2010; HEUSCHKEL, WOHLRAB, NEUBERT, 2009). Estes resultados estão de acordo com vários sistemas microemulsionados encontrados na literatura (LI et al., 2012; FASOLIN, SANTANA, CUNHA, 2012, SAHLE et al., 2012).

**Figura 18-** Comportamento reológico das formulações em estudo (ME-F2 e ME-F6). Reograma Tensão de cisalhamento *versus* Taxa de cisalhamento.

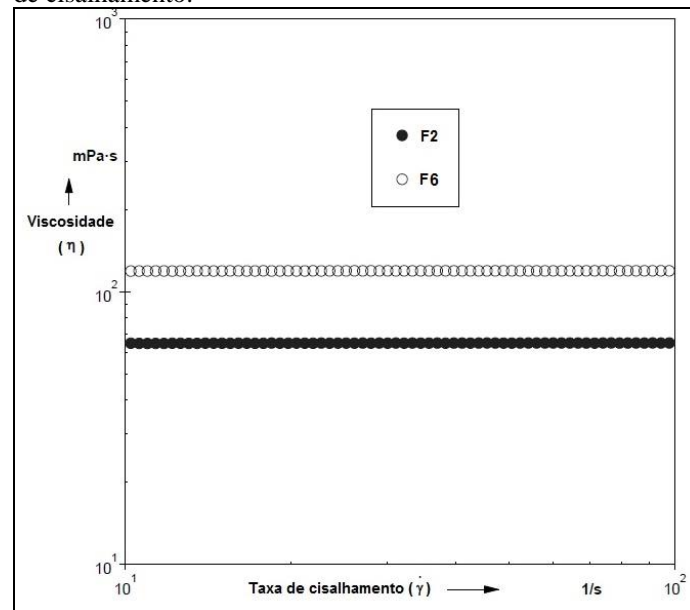


(FONTE: Dados da pesquisa)

Correa e colaboradores (2005) mostraram que a viscosidade aparente de sistemas microemulsionados e emulsionados é dependente do volume de fase e da natureza da fase oleosa, visto que o aumento do volume de fase interna oleosa provocou aumento da viscosidade aparente das ME. No entanto, geralmente em formulações contendo até 20% de fase interna oleosa não se observa o efeito do diâmetro de gotícula na viscosidade (BRUXEL et al., 2012). Pois neste caso, gotículas pequenas fluem de forma mais livre (movimento browniano facilitado) no meio, reduzindo a viscosidade do sistema (DALVIN, 2011). De forma geral, as ME apresentam baixas viscosidades, até mesmo em elevadas concentrações de gotículas, muito provavelmente devido a instabilidade reversível das mesmas (LANGEVIN, 1988) e as fases cúbicas apresentam viscosidade extremamente elevada (FORMARIZ et al., 2005; GABBOUN et al., 2001; HYDE, 2001). Ambas formulações apresentaram viscosidade relativamente baixa (SAHLE et al., 2012) ME-F2 ( $64,42 \pm 0,667 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ ) e ME-F6 ( $118,78 \pm 0,503 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ ) visualizados na Figura 19. Estes valores podem ser justificados pelo tamanho de gotículas do espalhamento de luz dinâmica.



**Figura 19-** Comportamento reológico das formulações em estudo (ME-F2 e ME-F6). Reograma Viscosidade *versus* Taxa de cisalhamento.



FONTE: Dados da pesquisa.

A presença de cotensoativos nestes sistemas também teve influência na redução da viscosidade. De fato, uma das funções do cotensoativo é aumentar a fluidez da camada interfacial entre as fases aquosas e oleosas. Sua ausência acarreta, portanto, em uma maior rigidez dos domínios água-óleo formados, modificando a viscosidade do sistema (GOMES, 2010; MILLER, NEOGGI, 2008).

Fazendo-se uma comparação entre as ME desenvolvidas, observa-se que a ME-F6 apresentou menor viscosidade que a ME-F2 devido à maior quantidade de água presente (47,1%), o que fatalmente ocorreu o aumento da fluidez das gotículas.

Várias técnicas podem ser utilizadas para determinação do tamanho de gotículas e sua distribuição. Dentre elas, destaca-se o espalhamento de luz dinâmico (DLS). Esta técnica também referido como espectroscopia de correlação fotônica (*PCS*, do inglês *photon correlation spectroscopy*) é um método bem estabelecido para medida do tamanho de gotículas e partículas na escala nanométrica e mesmo, para tamanhos menores que 1nm. Partículas, gotículas e moléculas em suspensão sofrem movimento browniano, o qual é induzido pelo bombardeamento de moléculas do solvente que se encontram em movimento devido à energia térmica. Quando as moléculas, partículas ou gotículas são iluminadas com laser, a intensidade da luz espalhada flutua numa velocidade que depende do tamanho das mesmas; quanto menor for seu tamanho, mais rapidamente elas se movem.

Desse modo, como o material analisado trata-se de ME, o tamanho da gotícula (raio  $r$ ) pode então ser determinado usando a relação de Stokes-Einsten abaixo (Equação 4).

$$R_h = KT/6\pi\eta D \quad (4)$$

Onde,  $R_h$  = raio hidrodinâmico,  $K$  = constante de Boltzmann,  $T$  = temperatura absoluta,  $\eta$  = viscosidade do meio,  $D$  = coeficiente de difusão das partículas (JOSHI, BHATTACHARYYA, WAZED ALI, 2008).

Observa-se, no entanto, que se o sistema é concentrado, ou seja, quando a fase dispersa estiver em elevadas concentrações, a interpretação torna-se dificultada em razão das interações intergotículas (SAHLE et al., 2012; SHUKLA, NEUBERT, 2006; SHUKLA, GAENER, NEUBERT, 2004). Para suprimir a interação entre gotículas a diluição do sistema microemulsionado com a fase dispersante é necessária (LAWRENCE, REES, 2000; FORMARIZ et al., 2006).

A Tabela 6 mostra os resultados do tamanho de gotículas e o índice de Polidispersão (IPD) das ME (sem diluição) e as diluições sucessivas destes sistemas (1:10, 1:50, 1:100 e 1:500 (v/v)).

**Tabela 6-** Estudos de caracterização quanto ao tamanho de gotículas (DLS), IPD e potencial zeta das formulações em estudo (ME-F2 e ME-F6) e diluições sucessivas.

| Amostra             | ME-F2                     |              |                     | ME-F6                     |              |                     |
|---------------------|---------------------------|--------------|---------------------|---------------------------|--------------|---------------------|
|                     | Tamanho de gotículas (nm) | IPD          | Potencial zeta (mV) | Tamanho de gotículas (nm) | IPD          | Potencial zeta (mV) |
| <b>Microemulsão</b> | 165,3± 12,1               | 0,126± 0,012 | -2,63± 0,35         | 198,8± 17,3               | 0,189± 0,023 | -3,57± 0,54         |
| <b>1:10</b>         | 371,7± 65,9               | 0,373± 0,089 | -3,75± 0,97         | 553,6± 73,7               | 0,361± 0,126 | -5,97± 0,73         |
| <b>1:50</b>         | 421,13± 87,9              | 0,343± 0,120 | -5,37± 0,93         | 750,2± 69,8               | 0,220± 0,064 | -12,46± 1,02        |
| <b>1:100</b>        | 472,33± 89,0              | 0,279± 0,118 | -4,86± 0,79         | 921,6± 88,1               | 0,278± 0,085 | -12,70± 0,98        |
| <b>1:500</b>        | 488,43± 78,7              | 0,314± 0,098 | -5,98± 1,10         | 944,8± 83,9               | 0,352± 0,104 | -13,04± 1,37        |

\*IPD= Índice de Polidispersão  
(FONTE: Dados da pesquisa).

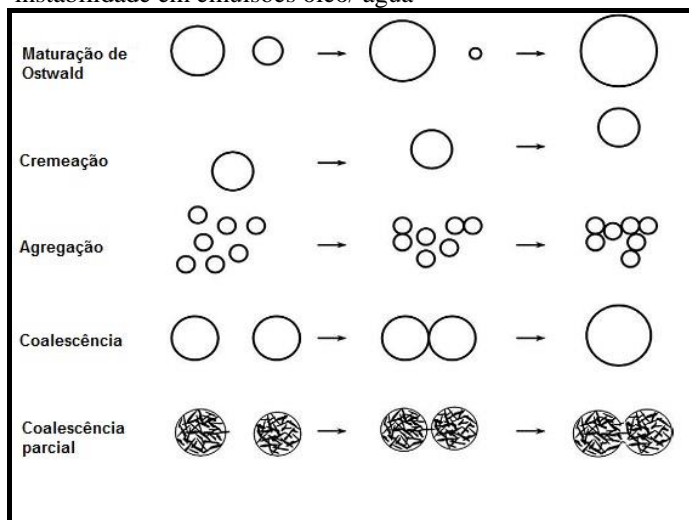
Uma discussão que tem se destacado nos últimos anos é a distinção de sistemas micro (ME) e nanoemulsionados (NE), onde foi recentemente revisado (ANTON, VANDAMME, 2011), e hoje se sabe que diferem entre si muito além da terminologia.

A principal diferença está relacionada a estabilidade termodinâmica destes sistemas. As ME são consideradas termodinamicamente estáveis (FANUN, 2010, 2012; LANGEVIN, 1988), em contrapartida, as NE são instáveis termodinamicamente, porém apresentam uma desestabilização lenta (aproximadamente meses) sendo consideradas cineticamente estáveis, devido ao seu baixo tamanho de gotículas que impede a interação entre elas (BRUXEL et al., 2012). As ME (tipo de morfologia das estruturas e tamanho de gotículas) são fortemente afetadas e até mesmo destruídas por mudanças de temperatura e/ou diluições (BRUXEL et al., 2012), ao passo que as gotículas de NE permanecerá estável nestas condições de estresse (ANTON, VANDAMME, 2011).

ME quando diluídas perdem sua estabilidade termodinâmica, pois a concentração de tensoativos é insuficiente para manter a tensão interfacial baixa (SOLE` et al., 2012), por isso ocorre mudanças drásticas no tamanho das gotículas (SHARMA et al, 2010; DJEKIC, PRIMORAC, 2008; CONSTANTINIDES et al., 1995), como observado em nossos resultados (Tabela 7). Nota-se um aumento proporcional do tamanho das gotículas com o aumento da diluição, ou seja, quanto maior o volume do meio dispersante, maior o tamanho da gotícula.

A maturação de Ostwald, conhecida também como envelhecimento de Ostwald, é o processo o qual surge da polidispersão e da diferença de solubilidade da quantidade de óleo contido em cada gotícula (FREDRICK, WALSTRA, DEWETTINCK, 2010) e/ou dos potenciais químicos entre as gotículas de tamanhos pequenos e grandes (KOURNIATIS et al., 2010). Este fenômeno coloidal envolve o transporte por difusão de moléculas da fase dispersa a partir de gotículas pequenas para maiores, devido as diferenças de pressão de Laplace. O resultado é que a solubilidade da fase dispersa na fase contínua é maior para gotículas menores do que para as maiores, daí, as gotículas pequenas tendem a diminuir com tendência a desaparecer e gotículas grandes aumentar de diâmetro (FREDRICK, WALSTRA, DEWETTINCK, 2010; TAYLOR, 1998). O mecanismo está representado na Figura 20.

**Figura 20-** Representação esquemática dos mecanismos de instabilidade em emulsões óleo/ água



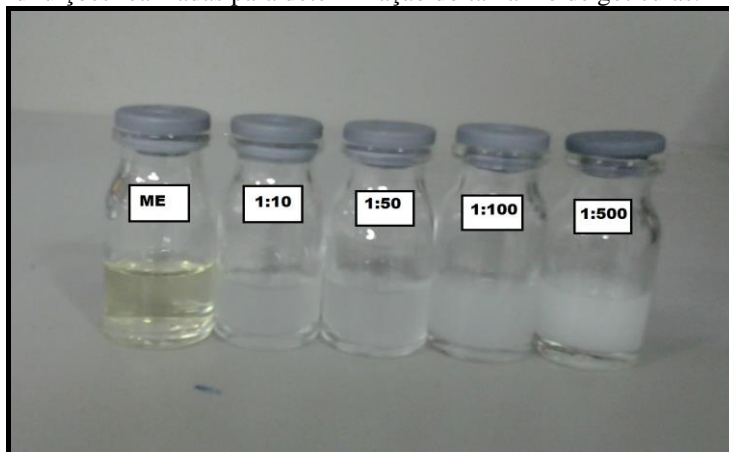
(FONTE: WALSTRA, 2003).

A maturação de Ostwald contrariamente a coalescência, não requer a aproximação das gotas, desde que o processo ocorra por transporte de matéria dissolvida (gotículas) através do meio de dispersão (fase externa aquosa), sendo assim é um fenômeno frequente para sistemas dispersos de fase externa de grande volume como é o caso das ME desenvolvidas neste estudo. Essa afirmação, bem como essas observações podem ser explicadas e corroboradas pelos estudos encontrados na literatura (FREDRICK, WALSTRA, DEWETTINCK, 2010; WALSTRA, 2003) quando eles afirmaram que este fenômeno apresentam maiores chances de ocorrerem quando se utiliza óleos vegetais como fase dispersa, como é o caso do óleo de copaíba.

Outros estudos mostraram resultados semelhantes, onde gotículas na faixa de 20-80nm foram obtidas diluindo ME O/A e o mecanismo predominante foi a maturação de Ostwald (LI et al, 2012; SOLÈ et al, 2012; TAYLOR, 1998; TAYLOR, OTTEWILL, 1994).

Assim sendo, essas mudanças no sistema com o aumento do tamanho das gotículas foram investigadas para as ME deste trabalho, na qual foi observado visualmente com a turvação das mesmas a cada diluição, onde observa-se, a partir dos dados da Figura 21, que desde a menor diluição (1:10) o sistema passou de transparente (ME) para um sistema turvo.

**Figura 21-** Aspecto visual da microemulsão bruta e das sucessivas diluições realizadas para determinação do tamanho de gotículas.

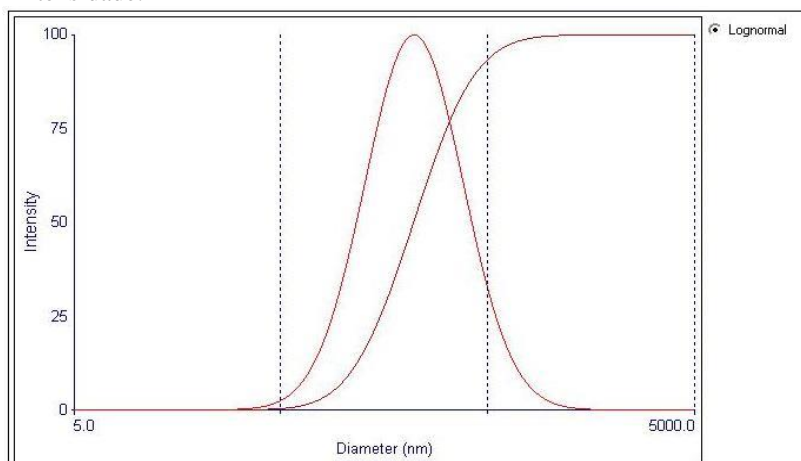


(FONTE: Dados da pesquisa)

Devido a instabilidade das ME quando diluídas, a técnica DSL descrita anteriormente, torna imprópria uma diluição da amostra, a fim de se evitar mudanças no sistema. Desta forma, deve-se realizar a análise com a amostra bruta. Sendo assim, o tamanho médio das gotículas dos sistemas avaliados foram de  $165,3 \pm 12,1 \text{ nm}$  e  $192,8 \pm 17,3 \text{ nm}$ , para as ME-F2 e ME-F6, respectivamente, apresentando uma distribuição monomodal e com baixa polidispersão ( $< 0,2$ ) (Figuras 22 e 23). Assim como a diluição pode aumentar o tamanho das gotículas no caso de ME, a desidratação pode reduzir. Como discutido anteriormente, o MET pode não descrever exatamente o tamanho das gotículas, devido ao seu processo de secagem prévia a análise da amostra. Isto foi observado em nossos resultados, desta forma utilizaremos os resultados do DLS como os valores mais próximos a realidade.

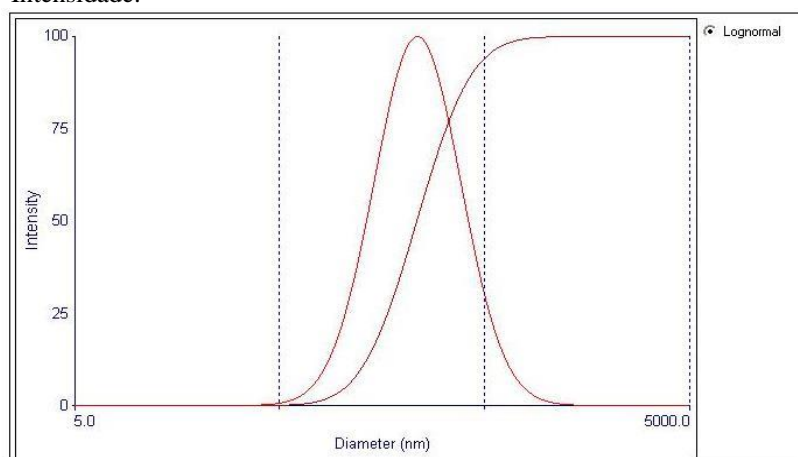
Desta forma, como o diâmetro das gotículas foram menores que 200nm, estas formulações são consideradas viáveis para aplicação por via tópica (LUNDBERG; MORTIMER, 1996). A literatura descreve que sistemas que apresentam gotículas pequenas após a sua aplicação tópica podem ser utilizados como sistemas de liberação prolongada (GHOSH et al., 2013).

**Figura 22-** Espalhamento de luz dinâmico ME-F2. Diâmetro *versus* Intensidade.



(FONTE: Dados da pesquisa)

**Figura 23-** Espalhamento de luz dinâmico ME-F6. Diâmetro *versus* Intensidade.



(FONTE: Dados da pesquisa)

Além dos ensaios anteriores de caracterização das ME, foi realizado também o estudo do potencial zeta destas dispersões coloidais. O potencial zeta é a carga total que uma partícula/gotícula adquire em meio específico, o qual é influenciado pelas mudanças na interface com o meio dispersante (SCHAFFAZICK et al., 2003).

Gotículas dispersas em um meio líquido podem ser carregadas devido à adsorção de íons provenientes da solução ou à ionização de grupamentos, tais como carboxila (COOH), que se encontram situados na superfície das gotículas. A presença de carga leva a um aumento na concentração de contra-íons próximo à superfície, formando assim a dupla camada elétrica. Essa dupla camada elétrica é constituída de uma região interna, que inclui íons fortemente ligados à superfície, e uma região externa, onde a distribuição dos íons é determinada pelo equilíbrio entre forças eletrostáticas e movimento térmico. O potencial zeta é a medida do potencial elétrico localizado no plano de cisalhamento da dupla camada até o interior do

líquido. Em outras palavras, o potencial zeta é a diferença de potencial entre o meio dispersante e a camada estacionária do líquido ligada à gotícula dispersa (SIQUEIRA, 2008).

Sendo assim, o potencial zeta não depende somente da superfície da gotícula, mas também do dispersante e condutividade entre suas cargas, concentração dos componentes da formulação, inclusive do princípio ativo e pela força iônica do meio. Podendo assim assumir um valor positivo ou negativo (SIQUEIRA, 2008).

Se o potencial for relativamente elevado em módulo (maior de 25 mV) as forças repulsivas do sistema superam as forças de London que atraem as gotículas entre si, caracterizando um sistema defloculado (ROLAND et al., 2003). Partículas com potencial zeta maior que 30 mV são requeridas para uma excelente estabilização eletrostática. A diminuição desse potencial e, conseqüentemente, na repulsão eletrostática, facilita a agregação das gotículas, sendo por isto utilizado como indicativo da estabilidade de uma dispersão (MARCATO, 2009). Entretanto, um efeito de estabilização estérica também tem sido observado em dispersões coloidais estabilizadas com tensoativos não- iônicos (CAPÉK, 2004).

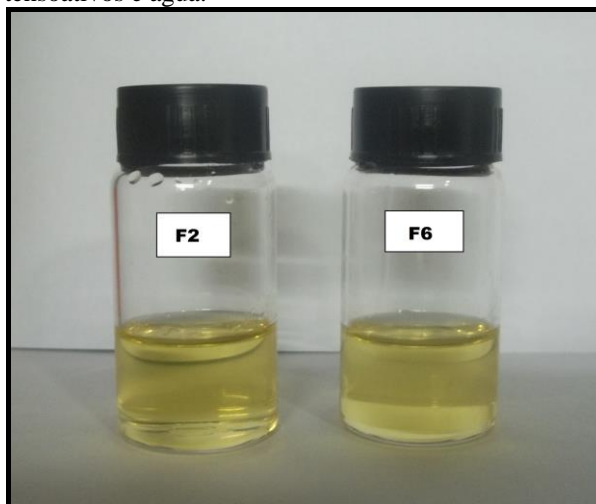
Ambas as formulações (ME-F2 e ME-F6) apresentaram valores de potencial zeta negativos -2,63 e -3,57, respectivamente. Essa negatividade pode ser atribuída à possível presença de grupos ácido carboxílico principalmente dos tensoativos (Labrasol<sup>®</sup> e Plurol oleique<sup>®</sup>) na superfície das gotículas, as quais ionizam formando gotículas carregadas negativamente (AUTON, 2005), cuja ionização desses grupos dependem do pH do sistema, quanto maior este parâmetro, mais negativo o potencial zeta. O baixo valor absoluto das cargas está relacionado ao uso de tensoativos não-iônicos nestes sistemas (GHOSH, MUKHERJEE, CHANDRASEKARAN, 2013; MCCLEMENTS, 2012).

Ademais, foi observado também que os sistemas diluídos, apresentaram valores de potencial zeta negativos. Porém, os mesmos apresentaram desvios-padrão mais elevados, mostrando diferenças maiores de cargas entre as gotículas pequenas e grandes, favorecendo assim a nossa hipótese de que ocorreu maturação de Ostwald nas ME estudadas fato este que esta em concordância com os estudos de Kourniatis e colaboradores (2010).

Por fim, além de todos esses testes de caracterização, foi realizado também um teste de avaliação da ordem de adição (pré-formulação) dos componentes da formulação para confirmação ou não se tratava de ME. O método de preparo consistiu na mistura do óleo de copaíba e tensoativos e posteriormente, da água. No entanto, foi avaliado também quando homogeneizado os tensoativos juntamente com a água e adicionado, posteriormente, o óleo de copaíba, ambos os sistemas apresentaram características visuais como coloração e

transparência semelhantes. Desta forma, este teste prediz a natureza da dispersão obtida, pois no caso das nanoemulsões são formadas apenas no caso dos tensoativos serem primeiro misturados com a fase oleosa conforme relata Anton e Vandamme (2011). Estes autores relatam ainda que quando misturados inicialmente com a água antes de adicionar a fase oleosa, uma emulsão será formada. Já as ME, por outro lado, será formada de forma idêntica seja qual for a ordem que os componentes são adicionados e, claro, após o equilíbrio do sistema coloidal. . A Figura 24 mostra as duas formulações (ME-F2 e ME-F6) quando adicionado o óleo de copaíba à mistura de tensoativos e água, apresentando a mesma aparência das formulações inicialmente desenvolvidas (límpidas, transparentes e amareladas), caracterizando assim como ME.

**Figura 24-** Formulações ME-F2 e ME-F6 quando preparadas adicionando o óleo de copaíba à mistura de tensoativos e água.



(FONTE: Dados da pesquisa)

## 5.6 DOSEAMENTO DO MARCADOR DO ÓLEO DE COPAÍBA (B- CARIOFILENO)

Os óleos de copaíba são geralmente compostos por uma quantidade elevada de hidrocarbonetos sesquiterpênicos, contribuindo com cerca de 90% da composição total do óleo, seguindo-se de uma pequena quantidade de diterpenos (SOUSA et al., 2011). Mesmo com uma grande variação entre as espécies *Copaifera* e até mesmo na mesma espécie, geralmente o  $\beta$ -cariofileno é o componente majoritário do óleo, sendo considerado o marcador químico deste (CASCON, GILBERT, 2000). Várias atividades biológicas são atribuídas ao  $\beta$ -cariofileno, principalmente antimicrobiana (GOREN et al., 2011; CHENG et al., 2004) e anti-inflamatória (CHAVAN, WAKTE, SHINDE, 2010; TUNG et al., 2008). No entanto, não só este componente é o responsável por estas atividades farmacológicas, pois



pode ocorrer um sinergismo com os outros componentes na promoção da atividade observada (LEANDRO et al., 2012). Porém, como este componente é encontrado em altas concentrações (muitas vezes superiores a 50%), principalmente na espécie *Copaifera multijuga*, estas atividades estão diretamente relacionadas a quantidade deste componente no óleo (FERNANDES et al., 2007; YOUNG et al., 2007).

A cromatografia gasosa é a técnica utilizada para quantificação de componentes de óleos essenciais. No entanto, os produtos naturais necessitam de um preparo prévio antes de ser injetado no CG, pois é necessário que a substância seja volátil e apolar para que seja arrastada pela fase móvel, caso contrário, ficará retida na coluna do equipamento. No caso do óleo de copaíba, os sesquiterpenos já possuem volatilidade e característica apolar adequada à análise, porém os diterpenos, que representam a fração resinosa do óleo são polares. Cascon e Gilbert (2000) validaram um método para quantificação de terpenos em três diferentes espécies de copaíba por CG-MS, onde o óleo resina foi esterificado com diazometano em éter, tornando a fração resinosa volátil e apolar e posteriormente analisada no cromatógrafo.

Recentemente foi validado outro método para quantificação do  $\beta$ -cariofileno,  $\alpha$ -copaeno e  $\alpha$ -humuleno da *Copaifera langsdorffii* (SOUSA et al., 2011). O óleo foi submetido a um processo de hidrodestilação utilizando um aparato tipo clewenger e posteriormente, a fração orgânica (volátil) do óleo dissolvida em hexano e injetada no CG-MS.

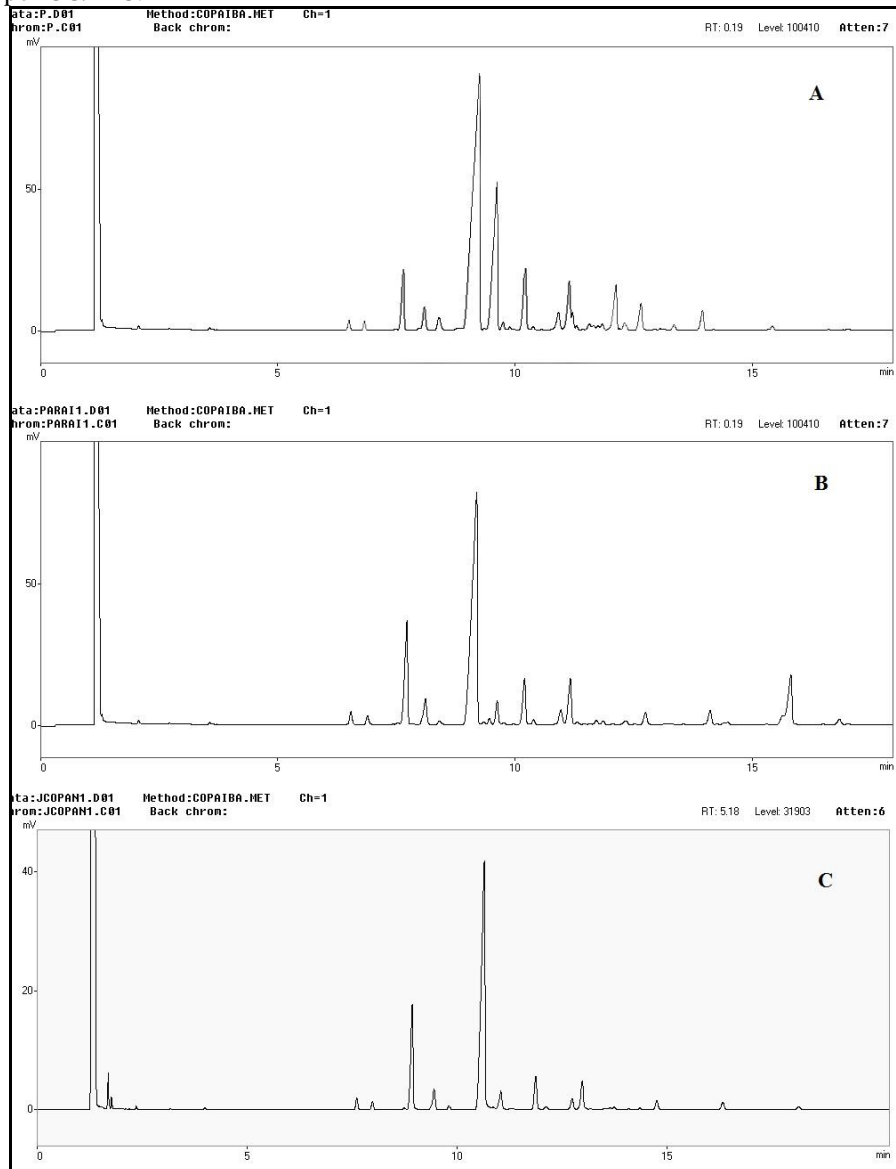
O primeiro método para doseamento do  $\beta$ -cariofileno em ME encontrado na literatura foi desenvolvido por Dias e colaboradores (2012). Este método consistiu na extração da fração volátil do óleo de copaíba (*C. Multijuga*) contido na ME por microextração em fase sólida (*headspace*) e posteriormente a quantificação do marcador por CG- FID.

Em nosso estudo, foi utilizada a metodologia desenvolvida pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Farmacognosia- NUDATEF (Núcleo de Desenvolvimento Analítico e Tecnológico) baseada no processo de hidrodestilação descrito por Sousa et al (2011). A metodologia foi previamente validada. Neste caso, o óleo de copaíba foi destilado e a fração volátil dissolvida em diclorometano e posteriormente injetada em CG- FID para determinação do teor de fração volátil e quantificação do marcador  $\beta$ -cariofileno utilizando como padrão interno o *trans* (-)-cariofileno. O mesmo processo foi realizado com a ME contendo o óleo de copaíba, pois neste caso torna-se inviável a injeção direta da ME no CG, pela possibilidade de interferências na análise (por exemplo, problemas de detecção e possíveis danos à fase estacionária) e a presença de agentes tensoativos pode comprometer a utilização da extração com solventes líquidos tradicionais, devido a emulsificação (DIAS et al., 2012).

Para a análise do óleo de copaíba puro foi utilizado uma massa de 9,81g, cuja densidade foi determinada e obteve-se como resultado  $0,981 \pm 0,003 \text{g.mL}^{-1}$  (0,20%), expressos como média  $\pm$  desvio padrão (coeficiente de variação). O valor da densidade encontrado está dentro da faixa descrita na literatura para óleo resina (DEUS et al., 2009; SHANLEY et al., 1998), esta propriedade foi usada para a conversão de volume em massa. A partir da hidrodestilação, foi obtida a fração volátil do óleo transparente e límpida, cujo rendimento médio foi de  $24,81 \pm 0,12\%$  (0,48%), calculado pelo equipamento através da técnica de normalização interna. Esta técnica considera o somatório das áreas de todos os picos do cromatograma 100%, podendo assim determinar a área (concentração) de cada pico e posteriormente a massa da fração volátil. Neste caso, da massa total de 9,81g do óleo resina, 2,4338g correspondeu à fração volátil. Este rendimento sugere que o procedimento além de simples, é de baixo custo para preparação de amostras, podendo ser adotado na rotina analítica com facilidade e eficácia.

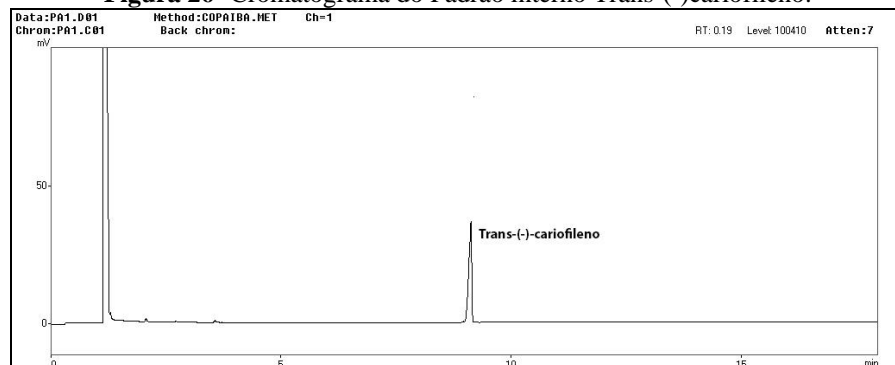
No cromatograma do óleo (Figura 2-A), observa-se um pico maior próximo a zero minutos correspondente ao diclorometano  $75,19 \pm 0,89\%$  (1,18%). Na fração volátil do óleo observa-se um pico majoritário correspondente ao  $\beta$ -cariofileno, confirmado através da comparação do tempo de retenção do padrão *trans* (-)-cariofileno (9,180 minutos). A partir dos cálculos realizados com os resultados de padronização externa foi possível inferir que a concentração de  $\beta$ -cariofileno na fração volátil do óleo de copaíba obtido através de hidrodestilação foi igual a  $46,979 \pm 0,241\%$  (0,51%). Logo, a concentração de  $\beta$ -cariofileno no óleo de copaíba puro foi de  $114,33 \text{mg.mL}^{-1}$ .

**Figura 25-** Perfil cromatográfico da fração volátil do óleo-resina de copaíba, obtido por CG/DIC.



LEGENDA: (A) Óleo de copaíba; (B) ME-F2; (C) ME-F6.  
(FONTE: Dados da pesquisa)

**Figura 26-** Cromatograma do Padrão interno Trans(-)-cariofileno.



(FONTE: Dados da pesquisa)

No caso da ME-F2 utilizou-se uma massa de 10,87g, cuja quantidade de óleo correspondia a 10,6% em massa (1,152g). A densidade foi determinada e obteve-se como resultado  $1,087 \pm 0,008 \text{ g.mL}^{-1}$  (0,74%). Utilizando-se a técnica de normalização foi verificado uma porcentagem de  $24\% \pm 0,25\%$  (1,04%) da fração volátil presente na amostra, correspondendo a 0,2765g. A partir dos cálculos realizados com os resultados de padronização externa foi possível inferir que a concentração de  $\beta$ -cariofileno foi correspondente a  $12,9 \text{ mg.mL}^{-1}$  na ME.

Com a ME-F6 foi utilizada uma massa de 12,038g de ME contendo 0,7343g de óleo (6,1%). A densidade foi de  $1,2038 \pm 0,022 \text{ g.mL}^{-1}$  (1,83%) e a porcentagem da fração volátil de  $7,932 \pm 0,081\%$  (1,02%). A concentração de  $\beta$ -cariofileno determinada foi de  $8,382 \text{ mg.mL}^{-1}$ .

O método foi capaz de recuperar 99,12% da fração volátil presente nas ME para a quantificação do marcador.

## 5.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E DETERMINAÇÃO DA CIM

Dentre as inúmeras atividades atribuídas ao óleo de copaíba, sejam popularmente e/ou cientificamente comprovadas, a atividade antimicrobiana está relacionada principalmente ao componente sesquiterpênico  $\beta$ -cariofileno. Porém como discutido anteriormente, onde outros componentes químicos do óleo encontrados em menor quantidade atuam em sinergismo com o  $\beta$ -cariofileno para esta atividade (SANTOS et al, 2008; VALDEVITE, 2007; PACHECO, BARATA, DUARTE, 2006). Desta forma, foi avaliada esta atividade do óleo de copaíba puro bem como das ME-F2 e ME-F6. No caso das ME foi determinada duas Concentração inibitória mínima (CIM), a primeira baseando-se na quantidade de óleo de copaíba contido nas formulações e outra a partir da concentração do marcador  $\beta$ -cariofileno (Tabela 8).

Em relação à atividade antibacteriana pode-se observar atividade para as três cepas testadas tanto para o óleo de copaíba *in natura* como para ambas ME desenvolvidas. Os valores de CIM correspondentes às diluições estão representados na Tabela 7.

**Tabela 7-** Concentração inibitória mínima (CIM) em relação às diluições (%) das substâncias testadas frente a cepas bacterianas.

| Substância testada | <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>Escherichia coli</i> | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
|--------------------|------------------------------|-------------------------|-------------------------------|
| ME-F2              | CIM (0,78%)                  | CIM (50%)               | CIM (50%)                     |
| ME-F6              | CIM (0,78%)                  | CIM (50%)               | CIM (25%)                     |
| Óleo de copaíba    | CIM (0,78%)                  | CIM (50%)               | CIM (25%)                     |

(FONTE: Dados da pesquisa)

**Tabela 8-** Concentração inibitória mínima (CIM) do óleo de copaíba *in natura* e das ME-F2 e ME-F6 frente a cepas bacterianas.

| Substância testada | <i>Staphylococcus aureus</i>    |  | <i>Escherichia coli</i>         |  | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>   |  |
|--------------------|---------------------------------|--|---------------------------------|--|---------------------------------|--|
|                    | CIM óleo (mg.mL <sup>-1</sup> ) | CIM cariofileno (mg.mL <sup>-1</sup> ) | CIM óleo (mg.mL <sup>-1</sup> ) | CIM cariofileno (mg.mL <sup>-1</sup> ) | CIM Óleo (mg.mL <sup>-1</sup> ) | CIM cariofileno (mg.mL <sup>-1</sup> ) |
| ME-F2              | 0,82                            | 0,10                                   | 53,0                            | 6,45                                   | 53,0                            | 6,45                                   |
| ME-F6              | 0,28                            | 0,03                                   | 18,35                           | 6,45                                   | 9,17                            | 1,04                                   |
| Óleo de copaíba    | -                               | 0,89                                   | -                               | 57,16                                  | -                               | 26,5                                   |

(FONTE: Dados da pesquisa)

Atividade foi verificada para cepas de *Staphylococcus aureus* tanto das ME como do óleo de copaíba *in natura* apresentando a atividade até a diluição de 0,78%. Onde a ME-F2 apresentou CIM de 0,82mg.mL<sup>-1</sup> em relação a concentração do óleo nesta formulação, correspondente a uma CIM de  $\beta$ -cariofileno de 0,10mg.mL<sup>-1</sup> sendo considerada uma atividade antimicrobiana alta (CIM entre 0,05 e 0,5mg/mL). A ME-F6 apresentou CIM de 0,28mg/mL para o óleo e 0,03mg.mL<sup>-1</sup> para o  $\beta$ -cariofileno. Quanto ao óleo de copaíba puro apresentou CIM de 0,89mg.mL<sup>-1</sup> de  $\beta$ -cariofileno, apresentando uma atividade moderada (CIM entre 0,6 e 1,5mg/mL). Estes resultados demonstram que mesmo com concentrações relativamente baixas de óleo de copaíba nas ME, foi o suficiente para promover atividade para *Staphylococcus aureus*. Os tensoativos testados isoladamente não apresentaram atividade, confirmando assim que a CIM encontrada para esta cepa está relacionada apenas ao óleo contido nas gotículas das ME.

As bactérias responsáveis por graves infecções pós-cirúrgicas são predominantemente Gram-positivas (OKDAKOWSKA-JEDYNAK et al., 2003). O *Staphylococcus aureus* é a principal causa de infecções comunitárias e hospitalares adquiridas. É responsável pelas infecções da pele ou dos tecidos moles, do trato urinário, abscessos gastrointestinais, peritonite, infecções do trato respiratório, osteomielite, miosite tropical, endocardite e bacteremia (FUNG et al., 2001). *S. aureus* tem uma capacidade formidável para adquirir rapidamente resistência a qualquer antibiótico. A resistência de bactérias Gram-positivas aos agentes antimicrobianos está aumentando a uma taxa alarmante para muitas classes comumente prescritos de agentes antimicrobianos, incluindo as penicilinas penicilinase-

resistentes, outros  $\beta$ -lactâmicos, fluoroquinolonas, e macrolídeos (ZETOLA et al., 2005). O aumento da resistência das bactérias aos antibióticos convencionais tem encorajado esforços intensivos para o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos que são eficazes contra as bactérias resistentes, principalmente de origem natural. Neste caso, como o óleo de copaíba e as ME testadas mostraram uma ótima atividade frente a este microrganismo podem ser considerados agentes promissores para o tratamento de tais infecções.

Foi verificada também fraca atividade (CIM acima de 1,5mg/mL) para o óleo e para as ME para cepas de *Escherichia coli* até a diluição de 50%, com CIM de óleo e  $\beta$ -cariofileno de (53,0mg.mL<sup>-1</sup> e 6,45mg.mL<sup>-1</sup>) para ME-F2 e (18,35mg.mL<sup>-1</sup> e 2,09mg.mL<sup>-1</sup>) para ME-F6. A CIM determinada para o óleo foi de 57,16mg.mL<sup>-1</sup>. No caso das cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, a ME-F6 (CIM 9,17mg.mL<sup>-1</sup> e 1,04mg.mL<sup>-1</sup>) e o óleo puro (CIM 26,5mg.mL<sup>-1</sup>) apresentaram a mesma diluição (25%), no entanto, a ME-F2 (53,0mg.mL<sup>-1</sup> e 6,45mg.mL<sup>-1</sup>) apresentou atividade até a concentração de 50%. Neste caso, observa-se que a ME-F2 apesar de conter maior concentração de óleo de copaíba em sua composição, apresentou uma CIM maior comparada a ME-F6. Este resultado pode estar relacionado ao fato da ME-F2 possuir uma porcentagem menor de tensoativo hidrofílico Labrasol<sup>®</sup> (33,84%) comparada com a ME-F6 (36,60%). Essa diferença na quantidade deste tensoativo nas formulações pode ter influenciado em uma melhor solubilização do óleo contido nas gotículas no meio (caldo Muller Hinton), melhorando a atividade da ME-F6.

Atividade para as três cepas bacterianas foi verificada para a mesma espécie do óleo de copaíba *in natura*, utilizando a mesma técnica de microdiluição (BLOISE, 2003) e a técnica de difusão em disco (MENDONÇA, ONOFRE, 2009).

Piere e colaboradores (2011) verificaram atividade do óleo de copaíba de duas espécies (*Copaifera officinalis* e *C. langsdorffii*) sobre isolados de *Escherichia coli* obtidos de leite mastítico. Em estudos posteriores avaliaram as mesmas espécies contra outras cepas de *Shigella flexneri*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Citrobacter freundii*, *Staphylococcus aureus*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* e *Haemophilus parasuis*. Foi verificada atividade sobre *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa* para ambas as espécies avaliadas (PIERE et al., 2012).

Contrariamente aos nossos resultados, em outras pesquisas não foi observada atividade do óleo de copaíba para cepas de bactérias Gram negativas. Como foi o caso de Pacheco, Barata e Duarte (2006) que avaliaram pela técnica de microdiluição a atividade de 11 óleos resinas (*Copaifera spp.*) contra *S. aureus*, *E. coli*, *Bacillus subtilis* e *P. aeruginosa*, porém estes óleos apresentaram atividade apenas para *S. aureus* e *Bacillus subtilis*. Santos e

colaboradores (2008) também testaram 8 diferentes espécies de óleo de copaíba, onde as espécies (*Copaifera reticulata*, *Copaifera martii* e *Copaifera officinalis*) mostraram-se ativas para *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis* e *Enterococcus faecalis*. Desta forma, os autores observaram atividade apenas para os Gram positivos, relacionando a uma provável ação do óleo na parede celular bacteriana, visto que observaram alterações morfológicas e ultra-estruturais quando o óleo foi testado, como o rompimento da parede bacteriana e liberação do conteúdo citoplasmático. Cowan (1999) sugeriu que o mecanismo de ação de terpenos possivelmente envolva o rompimento da parede bacteriana por estes compostos lipofílicos. No entanto, Piere et al. (2012), sugeriu em sua pesquisa que a atividade antimicrobiana do óleo de copaíba envolve outros mecanismos além do dano a parede celular, por verificar sua atividade contra bactérias gram negativas.

Quanto ao ensaio antifúngico, tanto o óleo como as ME foram inativos para *Candida parapsilosis*, *Candida albicans* e *Candida tropicalis*, confirmando os resultados obtidos por Santos et al. (2008), que também não verificou atividade para leveduras. Contrariamente, alguns autores verificaram atividade do óleo de copaíba (*C. Multijuga* Hayne) e suas frações para os gêneros *Aspegillus* e *Candida* (DEUS et al., 2009; DEUS, ARRUDA, 2011).

Para a cepa de *Cryptococcus neoformans* o óleo de copaíba *in natura* e as microemulsões F2 e F6 apresentaram atividade até a concentração de 0,78%, com valores de CIM ( $0,82\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  e  $0,10\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) para ME-F2, CIM ( $0,28\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  e  $0,03\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) para ME-F6 e CIM de  $0,89\text{mg}/\text{mL}$  para o óleo de copaíba puro. Nenhum trabalho foi encontrado na literatura avaliando-se a atividade do óleo de copaíba para este fungo. O *Cryptococcus neoformans* é uma levedura encapsulada fato que o torna único entre os fungos patogênicos (REOLON, PEREZ, MEZZARI, 2004; ELLIS, PFEIFFER, 1992). A cápsula é composta por polissacarídeos que lhe confere antigenicidade (PERFECT, 1998). É de grande importância na micologia médica por ser agente etiológico da criptococose uma micose oportunista grave que tem tido uma crescente importância nas últimas décadas (KON et al., 2008; MITCHELL, PERFECT, 1995). Pacientes infectados com o HIV, pacientes com câncer, diabéticos, pacientes submetidos a transplantes ou procedimentos invasivos, ou a pessoas que os corticosteróides são especialmente suscetíveis à doença. Infecção criptocócica começa principalmente nos pulmões e geralmente dissemina para vários órgãos (BARBOSA et al., 2006). No entanto, a levedura mostra tropismo para o sistema nervoso central, onde ele sobrevive e prolifera, causando meningite e meningoencefalite, ambos os quais podem ser fatais se não forem tratadas adequadamente (CHEN et al., 2003). A criptococose é tratada com anfotericina B / azóis como a principal opção terapêutica (VAN DER HORST et al.,

1997). No entanto, a taxa de letalidade elevada entre pacientes imunocomprometidos indica que novas opções terapêuticas são necessárias (MEDEIROS et al., 2010). Desta forma, a potente atividade do óleo de copaíba e das microemulsões testadas pode se tornar uma opção terapêutica para esta doença. No entanto, pela ausência de estudos na literatura para este microrganismo, remete-se a pesquisas posteriores para confirmação desta atividade, como também a avaliação do mecanismo de ação do óleo de copaíba para esta levedura. Neste caso, sugere-se avaliar a sua ação frente a cápsula polissacarídea, visto a inatividade a leveduras não encapsuladas testadas (*Candida*).

Algumas explicações podem ser sugeridas para estas discordâncias de atividades antimicrobianas atribuídas ao óleo de copaíba encontradas na literatura. Um fato importante a se destacar são as técnicas utilizadas para determinar esta atividade, pois é possível verificar uma variedade de metodologias para determinação da atividade antimicrobiana em óleos essenciais *in vitro*, o que torna a comparação entre esses estudos problemática (NASCIMENTO et al., 2007). Os resultados obtidos por cada um desses métodos podem diferir devido a fatores como as variações entre os testes, a exemplo do crescimento microbiano, exposição de microrganismos ao óleo, a solubilidade do óleo ou de seus componentes e o uso e quantidade de emulsificador (OPALCHENOVA; OBRESHKOVA, 2003; LAMBERT et al., 2001).

As substâncias normalmente testadas pelos métodos propostos pelo NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*) têm natureza hidrófila e os testes são padronizados para esta condição. Nos ensaios com óleos essenciais, deve-se considerar que os óleos são voláteis, insolúveis em água, viscosos e complexos. Além disso, podem formar uma suspensão turva que impede a determinação visual da eficácia antimicrobiana do óleo, devido à interferência da dissolução insuficiente dos componentes testados, sendo assim, a falta de padronização dos testes de susceptibilidade antimicrobiana tem sido um dos empecilhos encontrados para a realização desse tipo de estudo (HOOD et al., 2003). Desta forma, foram encontrados diferentes técnicas (difusão em disco e microdiluição) e diferentes resultados de atividade para o óleo de copaíba.

Outro fator é a variação química entre as espécies e até mesmo entre indivíduos da mesma espécie (Cascon, Gilbert, 2000). Algumas pesquisas em relação à sua composição, mostra que mesmo sem variação genética de espécies de plantas pode alterar a percentagem de componente ativo presente no óleo. Além disso, outros fatores como o clima, temporização do solo, e os métodos de plantio, fertilização, uso de agrotóxicos, irrigação e condições ambientais, técnicas de extração, colheita, fontes botânicas e variações de padrões geográficos



(latitudes e longitudes) pode afetar a composição química do óleo, provocando mudanças na atividade antimicrobiana (NASCIMENTO et al., 2007). Por exemplo, óleo-resinas de *C. reticulata* coletadas no Acre e Pará apresentaram diferenças na atividade contra bactérias devido a diferenças na composição química (SANTOS et al., 2008).

Sendo assim, todas estas condições de coleta, tempo de coleta, armazenamento devem ser padronizadas. O uso deste óleo, bem como a produção de produtos que utilizam tal componente devem seguir um rigoroso controle de qualidade, para garantia do efeito farmacológico esperado para o óleo de copaíba.

## 5.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

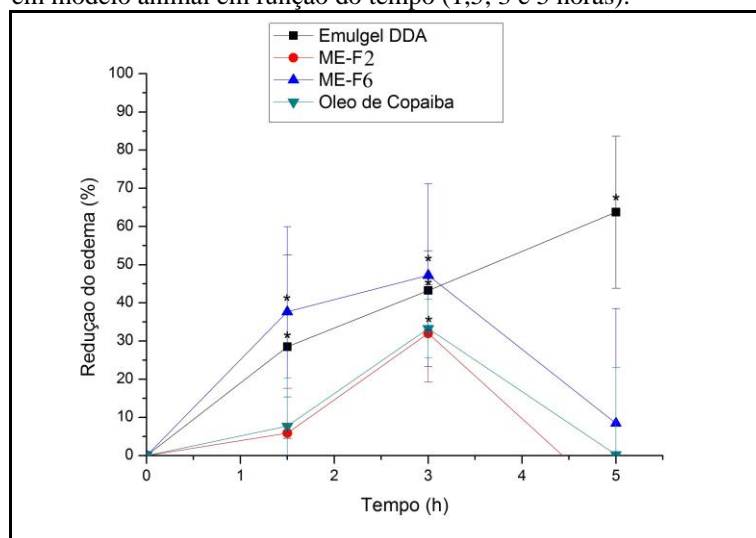
O processo inflamatório envolve uma série de eventos que pode ser desencadeado por vários e diferentes estímulos, por exemplo, agentes infecciosos, isquemia, interação antígeno-anticorpo, agentes químicos, estímulo térmico, até mesmo lesão mecânica. A resposta inflamatória apresenta três diferentes fases, cada uma aparentemente mediada por mecanismos distintos: uma fase aguda caracterizada por vasodilatação local e aumento da permeabilidade capilar, uma fase subaguda caracterizada por infiltração de leucócitos e células fagocíticas e uma crônica proliferativa na qual ocorre uma degeneração do tecido e fibrose (COLLINS, 2000).

A reação inflamatória aguda é de curta duração, de alguns minutos, horas ou um a dois dias, dependendo do estímulo causal. De maneira geral, esta fase se manifesta uniformemente, padronizada ou estereotipada, qualquer que seja a natureza do estímulo lesivo. Nesta fase, muitos mediadores químicos participam do processo inflamatório, tais como: cininas, prostaglandinas, histamina, fator de agregação plaquetário (PAF), fragmentos do sistema complemento (C5a), LTB<sub>4</sub> (leucotrienos) e citocinas. A extensão da contribuição de cada mediador dependerá essencialmente do processo inflamatório (BECHARA, SZABÓ, 2005).

Potenciais agentes inflamatórios são avaliados na indústria farmacêutica e modelos animais são extensivamente usados no teste destes anti-inflamatórios. A carragenina é um agente flogístico amplamente utilizado na investigação do processo inflamatório gerado, sendo ele um polissacarídeo de caráter irritante extraído de algas (OH-ISHI, 2000).

A inflamação induzida pela carragenina leva a ativação de gelatinases e collagenases (NAGAKAWA, SAKATA, 1996). Turner (1965) e Di Rosa et al. (1971) relataram que o processo inflamatório induzido pela carragenina em ratos envolve 3 fases: a primeira com liberação inicial de histamina e serotonina (primeira 1,5h), uma segunda fase mediada por cininas (1,5h após a fase 1) e a última mediada por prostaglandinas. 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 27.

**Figura 27-** Avaliação da redução do edema induzido por carragenina em modelo animal em função do tempo (1,5; 3 e 5 horas).



\*Estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ).  
(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, FRANÇA, 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  $\beta$ -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  $\beta$ -cariofileno. Pode-se observar que para a redução do edema não é necessária uma concentração alta de  $\beta$ -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  $\beta$ -cariofileno na pele e potencializando o efeito farmacológico.

No caso do óleo de copaíba puro, mesmo apresentando concentração superior de  $\beta$ -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 (DAS, BHATTACHARYA, GHOSAL, 2006). Contudo, para avaliação da cinética de liberação e permeação das ME, torna-se necessária realização dos testes *ex vivo* utilizando a célula de Franz, para confirmação das hipóteses sugeridas.

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.

O primeiro estudo com o objetivo de demonstrar a atividade anti-inflamatória de óleo-resina de copaíba foi realizada por Basile et al. (1988). A atividade encontrada foi

relacionada com o efeito anti-edematogênico observado em ratos induzido por carragenina, e foi posteriormente confirmado por Veiga Jr. et al. (2001). Este estudo também mostrou que a atividade varia com óleos de copaíba provenientes de diferentes espécies, e utilizando-se diferentes agentes flogísticos. Todos esses estudos foram realizados com óleo-resinas comerciais de copaíba, mas sem a identificação das espécies. Outros autores também utilizaram esta mesma metodologia do edema de pata induzido por carragenina para avaliação da atividade anti-inflamatória de óleos de copaíba de algumas espécies como a *C. Multijuga Hayne* (VEIGA JÚNIOR et al., 2006), *C. Dwyer* (CARVALHO et al., 2005), apresentando resultados satisfatórios para estas espécies.

Para avaliação da atividade anti-inflamatória do óleo de copaíba também foram encontrados na literatura alguns estudos *in vitro*. Baylac e Racine (2003) mostraram que o óleo-resina de *C. officinalis* provoca a inibição *in vitro* de 5-lipoxigenases, uma enzima importante do processo inflamatório. Os mesmos autores (2004) mostraram que o óleo-resina não foi capaz de causar a inibição *in vitro* de HLE (elastase de leucócitos humanos), uma das principais proteases as quais desempenham um papel importante na patogênese de várias desordens inflamatórias. Veiga Júnior e colaboradores (2007) avaliaram a atividade anti-inflamatória de três diferentes óleo-resinas de copaíba (*C. multijuga Hayne*, *C. cearensis Huber ex Ducke* e *C. reticulata Ducke*), e demonstraram que apesar de semelhantes na composição, eles mostraram diferentes atividades. O ensaio *in vitro* foi realizado medindo-se a produção de NO por macrófagos. O óleo-resina de *C. multijuga Hayne* foi o mais potente, inibindo a produção de NO a uma concentração baixa ( $5 \text{ mg.mL}^{-1}$ ). Os óleo-resinas de *C. cearensis* e *C. reticulata* apresentaram semelhante atividades, mas com menor intensidade ( $50 \text{ ug.mL}^{-1}$  e  $500 \text{ ug.mL}^{-1}$ , respectivamente).

Desta forma, o ensaio anti-edematogênico em nosso estudo mostrou-se bastante relevante para confirmação dos resultados já encontrados na literatura para a *C. multijuga*, a fim de valorizar o uso desta espécie para estes fins terapêuticos. Como também, o sistema microemulsionado permitiu a utilização de uma pequena concentração do óleo suficiente para promoção do efeito, desta forma, racionalizando seu uso.

*Conclusões*

---

## 6 CONCLUSÕES

Com a análise dos resultados obtidos pode-se concluir que:

- A ferramenta do diagrama de fases pseudoternários mostrou-se simples e reprodutível para o preparo de ME contendo o óleo de copaíba;
- Os resultados dos estudos de condutividade elétrica e DSC sugeriram que consistiam de sistemas O/A;
- A confirmação dos sistemas microemulsionados foi obtida com as técnicas de microscopia eletrônica de transmissão, microscopia de luz polarizada, reologia e potencial zeta;
- A técnica de Espalhamento de luz dinâmico (DLS) mostrou um aumento no tamanho das gotículas quando o sistema era submetido a diluições sucessivas, caracterizando uma instabilidade deste frente à diluição, o que é característico de ME. Esta instabilidade observada foi relacionada e atribuída ao mecanismo de maturação de Ostwald;
- As ME-F2 e ME-F6 apresentaram atividade para as cepas bacterianas *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. coli* e para o fungo *Criptococcus neoformans*;
- Em relação 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 e comparável ao óleo puro. Estes resultados confirmam a atividade anti-inflamatória presente na literatura para esta espécie, bem como torna estes sistemas microemulsionados uma possível alternativa terapêutica para inflamações agudas.
- Desta forma, vale 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 antimicrobiana e anti-inflamatória, valorizando o uso desta espécie para estes fins terapêuticos. Desta forma, deve-se realizar estudos posteriores de atividade farmacológica e mecanismo de ação do óleo, bem como de mutagenicidade, toxicidade, irritabilidade cutânea e estudos de estabilidade, a fim de garantir o controle de qualidade do produto, podendo ser desenvolvido futuramente em escala industrial, diferentemente das formas artesanais existentes atualmente no mercado brasileiro.

- É importante destacar 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.

## REFERÊNCIAS

- ACHARYA, D.P., HARTLEY, P.G. Progress in microemulsion characterization. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v.17, p.274–280, 2012.
- ADAMSON, A.W. A model for micellar emulsions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 29, n. 2, p. 261-267, 1969.
- ADAMSON, A.W. **Physical chemistry of surfaces**, 3. ed. New York: John Wiley and Sons LTD, 1976.
- ALENCAR, J. Estudos silviculturais de uma população natural de *Copaifera multijuga Hayne - Leguminosae*, na Amazônia central. 2 – produção de óleo resina. **Acta Amazônica**, v.12, n.1, p.79-82, 1982.
- ANTON, N., VANDAMME, T.F. Nano-emulsions and Micro-emulsions: Clarifications of the Critical Differences. **Pharm Res**, v.28, p.978–985, 2012.
- ARAUJO, F.A., KELMANN, R.G., ARAUJO, B.V., FINATTO, R.B., TEIXEIRA, H.F., KOESTER, L.S. Development and characterization of parenteral nanoemulsions containing thalidomide. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v.42, p.238–245, 2011.
- AUTON, M. E. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**. 2. ed., Artmed, Porto Alegre, 677p., 2005.
- BACHHAV, Y.G., PATRAVALE, V.B. Microemulsion based vaginal gel of fluconazole: Formulation, *in vitro* and *in vivo* evaluation. **Int J Pharm**, v.365, p.175-179, 2009.
- BAGWE, R.P., KANICKY, J.R., PALLA, B.J, PATANJALI, P.K., SHAH, D.O. Improved drug delivery using microemulsions: Rationale, recent progress, and new horizons. **Crit Rev Ther Drug Carrier Syst**, V.18, n.1, p.77-140, 2001.
- BARATA, L. E. S.; MENDONÇA, C. **Copaíba: propriedades farmacológicas, etnofarmacológicas, usos**. Rio de Janeiro: GEF/Instituto pró-natura, 1997. 31p. (Relatório1).
- BASILE, A.C., SERTIÉ, J.A., FREITAS, P.C.D., ZANINI, A.C.. Anti-inflammatory activity of oleoresin from *Brazilian copaifera*. **J Ethnopharmacol**, v.22, p.101-109, 1988.
- BERTHOD, A. Mise au point: structures physico-chimiques des mileux disperses, micelles, emulsions et microemulsiones. **Journal de Chimie Physique**, v. 30, p. 407-424, 1983.
- BHARGAVA, H. N.; NARURKAR, A.; LIEB, L. M. Using microemulsions for drug delivery. **Pharmaceutical Technology**, Duluth, v. 3, p. 46-54, 1987.
- BILLANY, G. Suspensões e Emulsões. In: AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. cap.23, p. 353-356.
- BLOISE, M.I. Óleos vegetais e especialidades da floresta Amazônica. **Cosmetics & Toiletries**, v.15, p.46-49, 2003.



BIRUSS, B., KAHLIG, H., VALENTA, C. Evolution of an eucalyptus oil containing topical drug delivery system for selected steroid hormones. **Int J Pharm**, v.328, n.2, p.142-151, 2007.

BRINON, L.; GEIGER, S.; ALARD, V.; DOUCET, J.; TRANCHANT, J-T., COUARRAZE, G. Percutaneous absorption of sunscreens form liquid crystalline phases. **J. Control. Rel.**, v.60, p.67-76, 1999.

BRITO, M. V. H. et al. Copaiba oil effect on urea and creatinine serum levels in rats submitted to kidney ischemia and reperfusion syndrome. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.20, n.3, p.243-6, 2005.

BRITO, N. M .B. et al. Aspectos morfológicos e morfométricos do colo uterino de ratas ooforectomizadas após aplicação de óleo de copaíba. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v.22, n.8, p.489-93, 2000.

BRUXEL, F.; LAUX, M.; WILD, L.B.; FRAGA, M.; KOESTER, L. S.; Teixeira, H. F.; Nanoemulsões como sistemas de liberação parenteral de fármacos. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 35, n. 9, 2012.

BRUXEL, F.; LAUX, M.; WILD, L.B.; FRAGA, M.; KOESTER, L.S.; TEIXEIRA, H.F. Nanoemulsões como sistemas de liberação parenteral de fármacos. **Química Nova**, v35, n.9, p.1827-40, 2012.

BUMAJDAD, A.; EASTOE, J. Conductivity of water in oil microemulsions stabilized by mixed surfactants. **Journal Colloids Interface Sciences**, v. 274, n. 1, p. 268- 76, 2004.

BURNIE, D.; COOLING, G.; **Dicionário Escolar do Corpo Humano**. Porto: Civilização Editora, 160 p., 1995.

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.

CAPEK, I. Degradation of kinetically-stable o/w emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v.107, p. 125–155, 2004.

CASCON, V. Copaíba - *Copaifera spp.*. In: CARVALHO, J.C.T. **Fitoterápicos antiinflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**. Ribeirão Preto: Tecmedd, 2004. 480p.

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.773-8, 2000.

CHEN, H., CHANG, X., DU, D., LI, J., XU, H., YANG, X. Microemulsion-based hydrogel formulation of ibuprofen for topical delivery. **Int J Pharm**, v.315, n.1-2, p.52-58, 2006.

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.

CORREA, M.A.; SCARPA, M.V.; FRANZINI, M.C.; OLIVEIRA, A.G. On the incorporation of the non-steroidal anti-inflammatory naproxen into cationic O/W microemulsions. **Coll. Surf. B**, v.43, p.106-112, 2005.

COWAN, M.M. Plant Products as Antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v.12, n.4, p.564-582, 1999.

CREVECOEUR, J.J.; COOLEGEM, J.F.; NELISSEN, L.; LEMSTRA, P.J. Water expandable polystyrene (WEPS). Part 3. Expansion behaviour. **Polymer**, v. 40, n. 13, p. 3697-3702, 1999.

CRUZ, O.J.D.; UCKUN, E.M. Gel-microemulsions as vaginal spermicides and intravaginal drug delivery vehicles. **Contraception**, v. 64, n. 2, p. 113-123, 2001.

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.

DANTAS NETO, A.A.; DANTAS, T.N.C.; MOURA, M.C.P.A.; BARROS NETO, E.L.; DUARTE, L.J.N. Study of Microemulsions Systems Applied to Mineral Flotation. **Industrial and Engineering Chemical Research**, v. 42, n. 9, p. 1994-1997, 2003.

DAVIES, J.T, RIDEAL, E.K. **Interfacial Phenomena**. 2. ed. New York: Academic Press, 1963.

DAVIES, J.T. A quantitative kinetic theory of the emulsion type 1. Physical Chemistry of the Emulsifying agent, gas/liquid and liquid/liquid interface. In: SHULMAN, J.H. **Proceeding of the Second International Congress of Surface Activity**, v. 1, p. 426-438, London: Butterworths, 1957.

DESAI, J.D.; BANAT, I.M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, n. 1, p. 47-64, 1997.

DIAS, D.O., COLOMBO, M., KELMAN, R.G., SOUSA, T.P., BASSANI, V.L., TEIXEIRA, H.F., VEIGA-JÚNIOR, V.F., LIMBERGER, R.P., KOESTER, L.S. Optimization of headspace solid-phase microextraction for analysis of  $\alpha$ -caryophyllene in a nanoemulsion dosage form prepared with copaiba (*Copaifera multijuga* Hayne) oil. **Analytica Chimica Acta**, v.721, p.79– 84, 2012.

DJEKIC, L.; PRIMORAC, M. The influence of cosurfactants and oils on the formation of pharmaceutical microemulsions based on PEG-8 caprylic/capric glycerides. **International Journal of Pharmaceutics**, v.352, p.231-39, 2008.

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

ELACHOURI, M.; HAJJI, M.S.; KERTIT, S.; ESSASSI, E.M.; SALEM, M.; COUDERT, R. Some surfactants in the series of 2-(alkyldimethylammonio) alkanol bromides as inhibitors of the corrosion of iron in acid chloride solution. **Corrosion Science**, v. 37, n. 3, p. 381-389, 1995.

EPAND, R. M., BACH, D.; BOROCHOV, N., WACHTEL, E. Cholesterol Crystalline Polymorphism and the Solubility of Cholesterol in Phosphatidylserine. **Biophys. J.**, v.78, p.866-873, 2000.

EPAND, R. M., BACH, D.; EPAND, R.F. ; BOROCHOV, N., WACHTEL, E. A New High-Temperature Transition of Crystalline Cholesterol in Mixtures with Phosphatidylserine. **Biophys. J.**, v.81, p.1511-1520, 2001.

EZRAHI, S.; ASERIN, A.; GARTI, N. Aggregation behavior in one-phase (Winsor IV) microemulsion systems. In: KUMAR, P.; MITTAL, K.L., ed. **Handbook of Microemulsion Science and Technology**. New York: Marcel Dekker, 1999. cap.7, p.195-240.

FANUN, M, PAPADIMITRIOU, V, XENAKIS, A. Characterization of cephalexin 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.

FANUN, M. Microemulsions as delivery systems. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 17, p.306-313, 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.

FLORENCE AT, ATTWOOD D. **Princípios Físico-Químicos em Farmácia**. 3 ed. São Paulo: USP; 2003. p. 732.

FORMARIZ, T. P. **Incorporação da doxorrubicina em microemulsões estabilizadas por fosfatidilcolina de soja e estudo da atividade antiproliferativa in vitro através de culturas de células**. 2004. 199f. Dissertação de Mestrado. Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, São Paulo.

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

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, p.301-313, 2005.

FORMARIZ, T.P.; CHIAVACCI, L.A.; SARMENTO, V.H.S.; FRANZINI, C.M.; SILVA-JÚNIOR, A.A.; SCARPA, M.V.; SANTILLI, C.V.; EGITO, E.S.T.; OLIVEIRA, A.G. Structural changes of biocompatible neutral microemulsions stabilized by mixed surfactant containing soya phosphatidylcholine and its relationship with doxorubicin release. **Coll. Surf. B-Biointerf.**, v.63, p.287-295, 2008.

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.

FRANCISCO, S. G. Uso do óleo de copaíba (*Copaifera officinalis*) em inflamação ginecológica. **Femina**, v.33, n.2, p.89-93, 2005.

FREDRICK, E., WASTRA, P., DWETTINCK, K. Factors governing partial coalescence in oil-in-water emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v.153, p.30-42, 2010.

FREIRE, D. B. et al. Efeito dos óleos vegetais de andiroba (*Carapa sp.*) e copaíba (*Copaifera sp.*) sobre forídeos, pragas de colméias, (Díptera: Phoridae) na Amazônia central. **Acta Amazônica**, v.36, n.3, p.365-8, 2006.

FRIEDRICH, H., FREDERIK, P.M., DE WITH, G., SOMMERDIJK, N.A. Imaging of selfassembled structures: interpretation of TEM and cryo-TEM images. **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.** 49, 7850-7858, 2010.

FRONZA, T.; CAMPOS, A.; TEIXEIRA, H. Nanoemulsões como sistemas de liberação para fármacos oftálmicos. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v. 23, n. 4, p. 558-566, 2004.

GANTA, S., AMIJI, M. Coadministration of Paclitaxel and curcumin in nanoemulsion formulations to overcome multidrug resistance in tumor cells. **Mol. Pharm.**, v.6, p.928-939, 2009.

GARTI, N., ASERIM, A., TIUNOVA, I., FANUN, M.A. DSC study of water behavior in water-in-oil microemulsions stabilized by sucrose esters and butanol. **Colloids Surf A**, v.170, p.1-18, 2000.

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.

GOSH, V., SARANYA, S., MUKHERJEE, A., CHANDRASEKARAN, N. Antibacterial microemulsion prevents sepsis and triggers healing of wound in wistar rats. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.105, p.152–157, 2013.

GRAMPUROHIT, N., RAVIKUMAR, P., MALLYA, R. Microemulsions For Topical Use– A Review. **Ind J Pharm Edu Res**, v.45, n.1, 2011.

GRIEVE, M. **A modern herbal**. London: Tiger books international, 1995. 221p.

HARRIS, M. I. N. C. **Pele: estrutura, propriedades e envelhecimento**. Ed. Senac, 3 ed., SP, 2009.

HATANAKA, J., CHIKAMORI H., SATO, H., UCHIDA, S., DEBARI, K., ONOUE, S., YAMADA, S. Physicochemical and pharmacological characterization of alpha-tocopherolloaded nano-emulsion system. **Int. J. Pharm.** V.396, p.188–193, 2010.

HAYAT, M.A. **Principles and Techniques of Electron Microscopy: Biological Applications**. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 2011.

HERNANDEZ, M.; MERCIER-FRESNEL, M. **Manual de Cosmetologia**. 3. ed. Rio de Janeiro, RJ: Revinter, 1999.

HEUSCHKEL,S., WOHLRAB,J., NEUBERT, R.H.H. Dermal and transdermal targeting of dihydroavenanthramide D using enhancer molecules and novel microemulsions. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 72, p.552–560, 2009.

HIELSHER, T. Ultrasonic production of nano-size dispersions and Emulsions. In: PROCEEDINGS OF EUROPEAN NANOSYSTEMS CONFERENCE ENS'05, Paris, France, december, 2005. 14-16 p.

HYDE, S.T. Identification of lyotropic liquid crystalline mesophases. In: HOLMBERG, K., ed. **Handbook of Applied Surface and Colloid Chemistry**. New York: John Wiley & Sons, 2001. cap.16, p.299-332.

HO, H.; HSIAO, C.C.; SHEU, M.T. Preparation of microemulsions using polyglycerol fatty acid esters as surfactant for the delivery of protein drugs. **J of Pharm Science**, v. 85, n. 2, p. 138-143, 1996.

HOAR, T.P., SCHULMAN J.H. Transparent water-in-oil dispersions: the oleopathic hydromicelle. **Nat.**, v.152, p.102-105, 1943.

HOLMBERG, K.; Organic reactions in microemulsion. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 8, n. 2, p. 187-196, 2003.

HUNTER, R. J. **Introduction to Modern Colloid Science**. New York: Oxford University Press, 1992.

JOSHI, M.; BHATTACHARYYA, A.; WAZED ALI, S. Characterization techniques for nanotechnology applications in textiles. **Indian Journal of Fibre & Textile Research**, v. 33, p.304-317, 2008.

JUNYAPRASERT, V.B., BOOME, P., SONGKRO, S., KRALEL, K., RADES, T. Transdermal delivery of hydrophobic and hydrophilic local anesthetics from o/w and w/o Brij 97-based microemulsions. **J Pharm Pharmaceut Sci.** V.10, n.3, p. 288-298, 2007.

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.

KLANG, V., HATSKO, N.B., VALENTA, C., HOFER, F. Electron microscopy of nanoemulsions: An essential tool for characterisation and stability assessment. **Micron**, v.43, p.85–103, 2012.

KOURNIATIS, L.R., SPINELI, L.S., MANSUR, C.R.E., GONZÁLEZ, G. Nanoemulsões óleo de laranja/água preparadas em homogeneizador de alta pressão. **Quím. Nova**, v.33, n.2, 2010.

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

KUNTSCHKE, J., HORST, J.C., BUNJES, H. Cryogenic transmission electron microscopy (cryo-TEM) for studying the morphology of colloidal drug delivery systems. **Int. J. Pharm.**, 2011.

LAMEIRA, O. S.; MARTINS-DA-SILVA, R. C. V.; ZOGHBI, M. G. B.; OLIVEIRA, E. C. P. Seasonal variation in the volatiles of *Copaifera duckei* Dwyer growing wild in the state of Pará – Brazil. *J. Essent. Oil Res.* 2009, 21, 105–107.

LANGVIN, D. Microemulsions. **Acc Chem Res**, v.21, n.7, p. 255-60, 1988.

LAWRENCE, M.J; REES, D.G. Microemulsions-based as novel drug delivery systems. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v.45, p.89-121, 2000.

LEANDRO, L. M.; VARGAS F.S.; BARBOSA, P. C. S., NEVES, J. K. O.; SILVA, J. A.; VEIGA JR V. F.; Chemistry and Biological Activities of Terpenoids from Copaiba (*Copaifera* spp.) Oleoresins. **Molecules**, v.17, p.3866-3889, 2012.

LEE, J., LEZ, Y, KIM, J., YOON, M., CHOI, Y.W. Formulation of microemulsion systems for transdermal delivery of Aceclofenac. **Arc of Pharm Res**, v.28, n.9, p.1097-1102, 2005.

LEONARDI, Gislaine Ricci. **Cosmetologia Aplicada**. São Paulo, SP : Med Farma , 1ª ed, 2004.

LIMA NETO, J. S.; GRAMOSIA, N. V.; SILVEIRA, E. R. Constituintes químicos do fruto de *Copaifera langsdorffii* Desf. **Química Nova**, v.31, n.5, p.1078-80, 2008.

LIU, C.H., YU, S.Y.. Cationic nanoemulsions as non-viral vectors for plasmid DNA delivery. **Colloids Surf. B Biointerfaces**, v.79, p.509–515, 2010.

LIU, C-H, CHANG, F-Y, HUNG, D-K. Terpene microemulsions for transdermal curcumin delivery: Effects of terpenes and cosurfactants. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 82, p.63–70, 2011.

LLOYD, J. U. **Copaifera officinalis**. Chicago: The Western Druggist, 1898. 13p.

LOOMIS, C.R.; SHIPLEY, G.G.; SMALL, D.M. The phase behavior of hydrated cholesterol. **J. Lip. Res.**, v.20, p.525–535, 1979.

LUO, H.; GUAN, Y.C.; HAN, K.N. Corrosion inhibition of a mild steel by aniline and alkylamines in acidic solutions. **Corrosion**, v. 54, n. 9, p. 721-731. 1998.

MA, JINGJING, WU, BOLIN. Effect of surfactants on preparation of nanoscale  $\alpha$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> powders by oil-in-water Microemulsion, **Advanced Powder Technology**, 2012.

MACIEL, M. A. et al. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v.25, n.3, p.429-38, 2002.

MAGHARY, G.M. Self-microemulsifying and microemulsion systems for transdermal delivery of indomethacin: Effect of phase transition. **Colloids and surfaces B: Biointerfaces**, v.75, n.2, p.555-600, 2010.

MAGHRABY, G.M. Transdermal delivery of hydrocortisone from eucalyptus oil microemulsion: Effects of cosurfactants. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 355, p. 285–292, 2008.

MANISSO, N. Ambientes micelares em química analítica. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 87-93, 2001.

MARCATO, P. D. Preparação, caracterização e aplicações em fármacos e cosméticos de nanopartículas lipídicas sólidas. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. VI (2), p.01-37, 2009.

MARGULIS-GOSMEN, K, MAGDASSI, S. Organic nanoparticles from microemulsions: Formation and applications. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v.17, p.290–296, 2012.

MASSOVER, W.H. On the experimental use of light metal salts for negative staining. **Microsc. Microanal.**, v.14, p.126–137, 2008.

MATTA, A. A. **Flora medica braziliense**. Manaus: Imprensa Oficial, 1913. 318p.

MCCLECENTS, D.J. Crystals and crystallization in oil-in-water emulsions: Implications for emulsion-based delivery systems. **Advances in Colloid and Interface Science**, v.174, p.1–30, 2012.

MENDONÇA, D.E., ONOFRE, S.B. Antimicrobial activity of the oil-resin produced by copaiba *Copaifera multijuga* Hayne (Leguminosae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, n.28, 2009.

MITCHELL, D.J.; NINHAM, B.W. Micelles, vesicles and microemulsions. **J. Chem. Soc.**, v.2, p.601-629, 1981.

MORAIS, G.G. **Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de emulsões O/A com cristais líquidos acrescidos de xantina para o tratamento da hidrolipodistrofia ginóide (celulite)**. 2006. 158p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

NISTSCHKE, M.; PASTORE, G.M. Biosurfactants: propriedades e aplicações. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 772-776, 2002.

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. **Quím. Nova**, v.27, n.1, 2004.

OLIVEIRA, E. C. P. et al. Identificação da época de coleta do óleo-resina de copaíba (*Copaifera spp.*) no município de Moju-PA. **Revista Brasileira de Plantas medicinais**, v.8, n.3, p.14-23, 2006.

OLIVEIRA, U. D. et al. Avaliação do ciclo celular de *Aspergillus nidulans* exposto ao extrato da planta *Copaifera officinalis* L. **Revista Saúde e Biologia**, v.1, n.2, p.42-7, 2005.

OPÇÃO FÊNIX. **Óleo de copaíba** - Literatura técnica, Insumo Cosmético. Disponível em: <<http://www.opcaofenix.com.br/v02/literaturas.php>> Acesso em : jan 2013.

OZGUNEY, I.S., KARASUNU, H.Y., KANTARCI,G., SOZER, S., GUNERIT,T, ERTAN,G. Transdermal Delivery of Diclofenac Sodium Through Rat Skin From Various Formulations. **AAPS PharmSciTech**, v.7, n.4, 2006.

PACHECO, T. A .R. C.; BARATA, L. E. S.; DUARTE, M. C. T. Antimicrobial activity of copaíba (*Copaifera spp*) balsams. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, Botucatu, v.8, n.esp., p. 123-124,2006.

PATHAN, I.B., SETTY, C.M.. Enhancement of transdermal delivery of tamoxifen citrate using nanoemulsion vehicle. **Int. J. Pharm. Tech. Res.**, v.3, p.287–297, 2011.

PIERE, F.A., MUSSI, M.C., FIORINI, J.E., SCHNEEDORF, J.M. Efeitos clínicos e microbiológicos do óleo de copaíba (*Copaifera officinalis*) sobre bactérias formadoras de placa dental em cães. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.62, n.3, p.578-585, 2010.

PIERE, F.A., SOUSA, C.F., COSTA, J.C.M., BARRERO, M.A.O., ESPESCHIT, I.F., SILVA, V.O., MOREIRA, M.A.S. Inhibition of *Escherichia coli* from mastitic milk by copaiba oil. **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, suplemento 1, p. 1929-1934, 2011

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

PLOWDEN, C. Notes on economic plants. **Economic Botany**, v.58, n.4, p. 729-739, 2004.



PODLOGAR, F., ROGAC, M.B., GASPERLIN, M. The effect of internal structure of selected water-Tween 40-Imwitor 308-IPM microemulsions on ketoprofene release. **Int J Pharm**, v.302, p.68-77, 2005.

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.

RESENDE, D. M.; BACHION, M. M.; ARAÚJO, L. A. O. Integridade da pele prejudicada em idosos: estudo de ocorrência numa comunidade atendida pelo Programa de Saúde da família. **Acta paulista de Enfermagem**, São Paulo, v. 19, n. 2, abr/ jun. 2006.

RHEE, Y.S, CHOI,J.G., PARK, E.S, CHI,S.C. Transdermal delivery of Ketoprofen using microemulsions. **Int J Pharm**, v.228, n.1-2, p.161-170, 2001.

RIGAMONTE AZEVEDO, O. C. et al. *Copaíba*: ecologia e produção de óleo-resina. Rio Branco: EMBRAPA, MAPA, 2004. 28p.

RIGAMONTE AZEVEDO, O. C. et al. Potencial de produção de óleo-resina de copaíba (*Copaifera sp.*) de populações naturais do sudoeste da Amazônia. **Revista Árvore**, v.30, n.4, p.583-91, 2006.

RODRIGUES, R. M. **A flora da Amazônia**. Belém: Editora Cejup, 1989. 463p.

ROLAND, I.; PIEL, G.; DELATTRE, L.; EVRARD, B. Systematic characterization of oil-in-water emulsions for formulation design. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 263, p. 85-94, 2003.

ROSANO, H.L. Microemulsions. **J Soc Cosmet Chem**, V.25, n.11, p.609-619, 1974.

ROSEN, M.J. **Surfactants and Interfacial Phenomena**. 3. ed. New York: Wiley-Interscience, 2004.

ROSSETI, F. C. **Microemulsões como sistema de liberação cutânea para zinco ftalocianina tetrassulfonada na terapia fotodinâmica do câncer de pele**. 2006. 104f. Dissertação de Mestrado. Departamento Ciências Farmacêuticas, Universidade São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo.

SACHETTI,C.G., FASCINELI,M.L., SAMPAIO,J.A.,LAMEIRA,O.A., CALDAS,E.D. Avaliação da toxicidade aguda e potencial neurotóxico do óleo-resina de copaíba (*Copaifera reticulata* Ducke, Fabaceae). **Revista Bras Farmacognosia**, v.19, n.4, 2009.

SAHLE, F.F.; METZ, H.; WOHLRAB, J.; NEUBERT, R.H.H. Polyglycerol fatty acid ester surfactant-based microemulsions for targeted delivery of ceramide AP into the stratum corneum: Formulation, characterisation, in vitro release and penetration investigation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.82, n.1, p.139-50, 2012.

SAMPAIO, P.T.B. Copaíba. In: CLAY, W; SAMPAIO,P.T.; CLEMENT, C.R. **Biodiversidade amazônica: exemplos e estratégias de utilização**, por Manaus : [INPA], 2000. p. 207-215, 2000.

SANTOS, A.O., UEDA-NAKAMURA, T., DIAS FILHO, B.P., VEIGA JÚNIOR, V.F.,PINTO, A.C., NAKAMURA, C.V. Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.103, n.3, 2008.

SCHAFFAZICK S. R.; GUTERRES S. S. Caracterização e estabilidade físicoquímica de sistemas poliméricos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p.726-737, 2003.

SCHALBART, P., KAWAJI, M., FUMOTO, K. Formation of tetradecane nanoemulsion by low-energy emulsification methods. **Int. J. Refrigeration**, v.33, p.1612–1624, 2010.

SCHREIER, S.; MALHEIROS, S.V.P.; DE PAULA, E. Surface active drugs: selfassociation and interaction and biological aspects. Physicochemical and Biological aspects. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1508, n. 1/2, p. 210-234, 2000.

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.

SHARMA, G.; WILSON, K.; VAN DERWALLE, C.F.;SATTAR, N.; PETRIE, J.R.; KUMAR, R.M.N. Ravi Kumar. Microemulsions for oral delivery of insulin: design, development and evaluation in streptozotocin induced diabetic rats, **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.76, p.159-69, 2010.

SHUKLA, A., NEUBERT, R.H.H. Diffusion behavior of pharmaceutical O/W 950 microemulsions studied by dynamic light scattering, **Colloid Polym. Sci.**, 2006.

A. SHUKLA, H. GRAENER, R.H.H. NEUBERT. Observation of two diffusive relaxation modes in microemulsions by dynamic light scattering. **Langmuir**, v.20, 2004.

SILVA, A.P., NUNES, B.R., DE OLIVEIRA, M.C., KOESTER, L.S., MAYORGA, P., BASSANI, V.L., TEIXEIRA, H.F. Development of topical nanoemulsions containing the isoflavone genistein. **Pharmazie**, v.64, 3p.2–35, 2009.

SILVA, F. H. et al. Estudo do óleo essencial e extrato hidrometanólico de *Copaifera langsdorffii* Desf (*Caesalpinaceae*) do cerrado e mata atlântica. In: REUNIÃO NACIONAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 29., 2006. Águas de Lindóia. *Anais eletrônicos...* São Paulo: Instituto de Química da USP, 2006.

SIMÕES, C.A.C.G. **Patente Brasileira no PI0404266-2**. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Propriedade Industrial, 2004.

SINTOV, A. C.; SHAPIRO, L. New microemulsion vehicle facilitates percutaneous penetration in vitro and cutaneous drug bioavailability *in vivo*. **Journal Controlled Release**, v. 95, n. 2, p. 173-183, 2004.

SINTOV, A.C., LEY, H.V., BOTNER, S. Systemic delivery of insulin via the nasal route using a new microemulsion system: In vitro and in vivo studies. **Journal of Controlled Release**, v.148, p.168–176, 2010.

SIQUEIRA, N. M. **Desenvolvimento tecnológico e avaliação da penetração cutânea de benzofenona-3 a partir de nanocápsulas revestidas com quitosana**. Dissertação de Mestrado - UFRGS, Porto Alegre – RS, 2008.

SOLÈ, I.; SOLANS, C.; MAESTRO, A.; GONZÁLEZ, C.; GUTIÉRREZ, J.M. Study of nano-emulsion formation by dilution of microemulsions. Study of nano-emulsion formation by dilution of microemulsions. Study of nano-emulsion formation by dilution of microemulsions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.376, p.133–39, 2012.

SOUSA, J.P.B., BRANCALION, A.P.S., SOUSA, A.B., TURATTI, I.C.C, AMBRÓSIO, S.R., FURTADO, N.A.J.C., LOPES, N.F., BASTOS, J.K. Validation of a gas chromatographic method to quantify sesquiterpenes in copaiba oils. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.54, p.653–659, 2011.

STIDDER, B.; FRAGNETO, G.; ROSER, S.J. Effect of low amounts of cholesterol on the swelling behavior of floating bilayers. **Lang.**, v.21, p.9187 – 9193, 2005.

SUBRAMANIAN, N., GHOSAL, S.K., MOULIK, S.P. Topical delivery of celecoxib using microemulsion. **Acta Pol Pharm.** v.61, n.5, p. 335-341, 2004.

TAKARADA K, KIMIZUKA R, TAKAHASHI N, HONMA K, OKUDA K, KATO T. A comparison of the antibacterial efficacies of essential oils against oral pathogens. **Oral Microbiol Immunol**, v.19, p. 61-64, 2004.

TAYLOR, P. Ostwald ripening in emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science* 75 \_1998. 107]163 Walstra P. *Physical chemistry of foods*. New York: Marcel Decker; 2003 P. Taylor, R.H. Ottewill, **Colloids Surf.** 88 \_1994. 303.

TENJARLA, S. Microemulsions: An overview and pharmaceutical applications. **Crit Rev Ther Drug**, v.16, n.5, p.461-521, 1999.

THAYSEN, G. Applications of Solutol HS 15. In: BASF Aktiengesellschaft, Fine Chemicals, **Product Development Pharma**, 67056 Ludwigshafen, Germany.

TROTTA, M.; PATTARINO, F.; IGNONI, T. Stability of drug-carrier emulsions containing phosphatidylCOline mixtures. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v.53, p.2063-208, 2002.

VALDEVITE, L.M. **Estudo do efeito in vitro de extrato e óleo-resina de copaíba sobre fatores de virulência de Streptococcus mutans, relacionados à cárie dental**. 2007. 128f. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

VANDAMME, T.F. Microemulsions as ocular drug delivery systems: recent developments and future challenges. **Prog. Retin. Eye Res.**, v.21, p.15-34, 2002.

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

*Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne-A comparative study. **J. Ethnopharmacol.**, v.112, p.248–254, 2007.

VEIGA JÚNIOR, V. F.; PATITUCCI, M. L.; PINTO, A. C. Controle de autenticidade de óleos de copaíba comerciais por cromatografia gasosa de alta resolução. **Química Nova**, v.20, p.612-615, 1997.

VEIGA JÚNIOR, V. F.; PATITUCCI, M. L.; PINTO, A. C. Controle de autenticidade de óleos de copaíba comerciais por cromatografia gasosa de alta resolução. **Química Nova**, São Paulo, v. 20, n. 6, Dec. 1997 .

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C. O Gênero *Copaifera* L. **Química nova**, v.25, n.2, p.273-86, 2002.

VEIGA JÚNIOR, V.F. et al. Plantas medicinais: cura segura? **Química nova**, v.28, n.3, p.519-28, 2005.

VERMA, D. D.; VERMA, S.; BLUME, G.; FAHR, A. Particle size of liposomes influences termal delivery of substances into skin. **Int J of Pharm**, v. 258, p. 141 – 151, 2003.

YU, W. et al. A novel-approach to the preparation of injectable emulsions a spontaneous emulsiofication process. **Int J. Pharm**, v. 89, p. 139- 146, 1993.

XAVIER JÚNIOR, F.H.. **Emulsões de óleo de copaíba: Determinação do equilíbrio hidrófilo-lipófilo crítico (EHLc), propriedades e estabilidade físico-químicas..** 2011. 67f. Dissertação de Mestrado. Departamento Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte.

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.

ZHU,W., YU,A., WANG,W., DONG,R., WU,J., ZHAI,G. Formulation design of microemulsion for dermal delivery of penciclovir. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 360, p. 184–190, 2008.

ZLOTOGORSKI, A. Distribution of skin surface pH on the forehead and cheek of adults. **Journal Investigative Dermatology**, v. 279, p. 398–401, 1987.

ZIELINSKA, K., WILK, K.A., JEZIEWSKI, A., JESIONOWSKI, T. Microstructure and structural transition in microemulsions stabilized by aldonamide-type surfactants. **J. Colloid Interface Sci.**, v. 321, p.408–417, 2008.

ZOGHBI, M. G .B.; LAMEIRA, O. S.; OLIVEIRA, E. C. P. Seasonal variation of oleoresin and volatiles from *Copaifera martii* Hayne growing wild in the state of Pará, Brazil. **J. Essent. Oil Res.** 2007, 19, 504–506.

ZOGHBI, M.G.B.; MARTINS-DA-SILVA, R.C.V.; Trigo, J.R. Volatiles of oleoresins of *Copaifera paupera* (Herzog) Dwyer, *C. piresii* Dwyer and *C. pubiflora* Benth. (Leguminosae). **J. Essent. Oil Res.** 2009, 21, 403–404.

WARISNOICHAROEN, W.; LANSLEY, A. B.; LAWRENCE, M. J. Nonionic oil-in-water microemulsions: the effect of oil type on phase behaviour. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 198, n. 1, p. 7-27, 2000.

## ANEXO I- Parecer do Comitê de Ética em 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: 0030/12/03/2013

CIAEP/CONCEA N°: 01.001.2012

APROVADO EM 26/03/2013

**1. Pesquisador Responsável:**

José Alessandro 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 copaíba 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  
Medicina Veterinária CRMV - 0830



## ANEXO II- Artigo completo publicado em periódico

*Molecules* **2012**, *17*, 3866-3889; doi:10.3390/molecules17043866

OPEN ACCESS

*molecules*

ISSN 1420-3049

www.mdpi.com/journal/molecules

Review

## Chemistry and Biological Activities of Terpenoids from Copaiba (*Copaifera* spp.) Oleoresins

Lidiam Maia Leandro <sup>1</sup>, Fabiano de Sousa Vargas <sup>1</sup>, Paula Cristina Souza Barbosa <sup>1</sup>,  
Jamilly Kelly Oliveira Neves <sup>2</sup>, José Alessandro da Silva <sup>2</sup> and Valdir Florêncio da Veiga-Junior <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Chemistry Department, Amazonas Federal University, Av. Gal. Rodrigo Octávio, 6.200, Japiim,  
Manaus-AM, 69080-900, Brazil

<sup>2</sup> Graduate Program on Pharmaceutical Sciences, Paraíba State University,  
Rua Baraúnas, 351, Bairro Universitário, Campina Grande-PB, 58429-500, Brazil

\* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: valdirveiga@ufam.edu.br;  
Tel.: +55-92-9903-6771.

Received: 12 December 2011; in revised form: 18 March 2012 / Accepted: 22 March 2012 /  
Published: 30 March 2012

---

**Abstract:** Copaiba oleoresins are exuded from the trunks of trees of the *Copaifera* species (Leguminosae-Caesalpinioideae). This oleoresin is a solution of diterpenoids, especially, mono- and di-acids, solubilized by sesquiterpene hydrocarbons. The sesquiterpenes and diterpenes (labdane, clerodane and kaurane skeletons) are different for each *Copaifera* species and have been linked to several reported biological activities, ranging from anti-tumoral to embriotoxic effects. This review presents all the substances already described in this oleoresin, together with structures and activities of its main terpenoids.

**Keywords:** copaiba oil; oleoresin; sesquiterpenes; diterpenes; pharmacological activities

---

### 1. Introduction

The Copaiba oleoresin is obtained from the trunk of several *Copaifera* L. species (Leguminosae-Caesalpinioideae). These trees are native to the tropical regions of Latin America and Western Africa. There are more than twenty species occurring in the Brazilian territory, the most abundant being *C. officinalis* L., *C. guianensis* Desf., *C. reticulata* Ducke, *C. multijuga* Hayne, *C. confertiflora* Bth., *C. langsdorffii* Desf., *C. coriacea* Mart. and *C. cearensis* Huber ex Ducke [1–3].

Copaiba oleoresin is widely used as a popular medicine, through topical and oral administration. It has various ethnopharmacological indications, including: gonorrhoea, bronchitis, pains in general, back pain, injury, blennorrhagia, leucorrhoea, psoriasis, “catarro da bexiga”, wounds, asthma, as an antiseptic for wounds, skin ulcers, aching joints, ovarian cysts, uterine myoma, weak uterus, vaginal discharge, ovarian problem, ulcers, sore throat, uterine infections, general inflammations, as a tonic and to treat ulcers and other digestive diseases, and cancer, and leishmanioses [4–12].

Many studies have been performed in order to confirm these properties scientifically, and validate the widespread use of this oleoresin and its various pharmacological activities. Despite the many published papers, some of the data on the chemical composition and pharmacological activity of copaiba oleoresin remains contradictory. This study aims to expand knowledge about the chemical composition, biological activities and pharmacological actions of copaiba oleoresin and its major constituents.

## 2. Biological Studies with Crude Copaiba Oleoresins

Although many species of *Copaifera* have been described, only nine of those have some biological study in the literature that evaluates the traditional uses. In some cases, these studies do not discriminate among the *Copaifera* species being studied, sometimes using commercial copaiba oleoresins. Table 1 shows all the biological and pharmacological activities that have been already tested for *Copaifera* oleoresins.

**Table 1.** Biological activities tested in different species of *Copaifera* oleoresins.

| Species                            | Biological activity evaluated  | Ref.       |
|------------------------------------|--|------------|
| <i>C. cearensis</i> Huber ex Ducke | Antimicrobial  | [13]       |
|                                    | Anti-inflammatory  | [14]       |
|                                    | Antileishmanial  | [15]       |
| <i>C. duckei</i> Dwyer             | antiproliferative  | [16]       |
|                                    | Antimutagenic  | [17]       |
|                                    | Embriotoxicity   | [18]       |
|                                    | Anti-inflammatory  | [19]       |
|                                    | Analgesic  | [19]       |
| <i>C. langsdorffii</i> Desf.       | Antimicrobial  | [13,20–23] |
|                                    | Attenuation of ischemia/reperfusion-induced intestinal               | [24]       |
|                                    | Gastroprotective effect on experimental gastric ulcer models in rats | [25]       |
| <i>C. langsdorffii</i> Desf.       | Ischemia-Reperfusion of Randomized Skin Flaps                        | [26]       |
|                                    | Antileishmanial  | [15]       |
|                                    | Wound Healing  | [27–29]    |
|                                    | Antioxidant  | [30]       |
|                                    | Insecticide  | [31]       |
|                                    | Anti-inflammatory  | [32,33]    |
| Antimutagenic                      | [34]   |            |



Table 1. Cont.

| Species                                       | Biological activity evaluated           | Ref.             |
|---|---|------------------|
| <i>C. lucens</i> Dwyer                        | Antimicrobial                           | [13]             |
|   | Antileishmanial                         | [15]             |
| <i>C. martii</i> Hayne                        | Antimicrobial                           | [13]             |
|   | Antileishmanial                         | [15,35]          |
| <i>C. multijuga</i> Hayne                     | Anti-inflammatory                       | [14,36–38]       |
|   | Antimicrobial                           | [13,39–42]       |
|   | Antitumor                               | [43,44]          |
|   | Antinociceptive                         | [36,45]          |
|   | Antileishmanial                         | [15]             |
|   | Healing                                 | [46]             |
| <i>C. officinalis</i> (Jacq.) L.              | Antimicrobial                           | [13,22,23,47,48] |
|   | Antischematic                           | [49]             |
|   | Anti-inflammatory                       | [50]             |
|   | Antileishmanial                         | [15]             |
|   | Inhibition of human leukocyte elastase  | [51]             |
|   | Effect Antitumor (Walker 256 carcinoma) | [52]             |
| <i>C. paupera</i> (Herzog) Dwyer              | Antimicrobial                           | [13]             |
|   | Antileishmanial                         | [15,53]          |
| <i>C. reticulata</i> Ducke                    | Antiinflammatory                        | [14]             |
|   | Antimicrobial                           | [13,54]          |
|   | Insecticide                             | [55–58]          |
|   | Antinociceptive                         | [45]             |
|   | Teratogenicity and embriotoxicity       | [59]             |
|   | Toxicity                                | [60]             |
|   | Antileishmanial                         | [15,61]          |
|   | Wound Healing                           | [62,63]          |
| Anxiolytic                                    | [64]                                    |                  |
| <i>C. sp.</i> (commercial copaiba oleoresins) | Antimicrobial                           | [40]             |
|   | Anti-inflammatory                       | [65,66]          |
|   | Skin perfusion                          | [67]             |
|   | Insecticide                             | [68–71]          |

Of the various ethnopharmacological indications of copaiba oleoresins, some, such as anti-inflammatory, wound healing, antimicrobial, antileishmanial, larvicidal, antineoplastic and antinociceptive activities have been confirmed by pharmacological studies, as will be detailed below.

The very first study aiming to demonstrate the anti-inflammatory activity of copaiba oleoresin was performed by Basile *et al.* [65]. The activity found was related to the anti-oedematogenic effect observed in carragenin induced rat paw oedema, and was later confirmed by Veiga, Jr. *et al.* [66]. This later study also showed that the activity varies with copaiba oleoresins from different species, and using different flogistic agents. All these studies were performed with commercial copaiba oleoresins, but without identifying the individual species. Baylac and Racine [50] showed that *C. officinalis* oleoresin causes *in vitro* inhibition of 5-lipoxygenases, an important enzyme of the inflammatory

cascade. The same authors [51] showed that the copaiba oleoresin obtained from *C. officinalis* was not capable of causing *in vitro* inhibition of HLE (Human leukocyte elastase), one of the main proteases in the neutrophils, which play an important role in the pathogenesis of many inflammatory disorders.

Veiga, Jr. *et al.* [14] evaluated the anti-inflammatory activity of three different copaiba oleoresins (*C. multijuga* Hayne, *C. cearensis* Huber ex Ducke and *C. reticulata* Ducke), and demonstrated that although similar in composition, they showed different activities. The assay was evaluated *in vitro* by measuring NO production by murine macrophages and *in vivo* using the zymosan induced pleurisy model in mice. The *C. multijuga* Hayne oleoresin was the most potent, inhibiting the NO production at a low concentration (5 µg/mL). The oleoresins from *C. cearensis* and *C. reticulata* presented similar activities but with less intensity (50 µg/mL and 500 µg/mL, respectively). Veiga, Jr. *et al.* [37] evaluated and affirmed that the crude *C. multijuga* Hayne oleoresin and its fractions (hexane, dichloromethane and methanolic) have anti-inflammatory properties against carrageenan- and bradykinin-induced oedema formation in the rat paw. Gomes *et al.* [36] suggest that *C. multijuga* Hayne oleoresin has anti-inflammatory activity by inhibiting histamine and the serotonin pathways. The *C. duckei* Dwyer oleoresin demonstrated anti-oedematogenic effect observed on carragenin induced rat paw oedema [19]. Araujo, Jr. *et al.* [49] studied the anti-inflammatory activity of *C. officinalis* oleoresin in aminotransferases in rats submitted to hepatic ischemic and reperfusion, and found that it presented no activity. In a similar study, Brito *et al.* [38] evaluated the effect of the oleoresin of *C. multijuga* on urea and creatinine serum levels in rats submitted to ischemia and reperfusion kidney. They observed a decrease in vascular permeability to proinflammatory agents caused by copaiba oleoresin, when in turn, decreased the migration of toxic agents to the renal parenchyma, thereby mitigating the damage of this organ. Nogueira Neto *et al.* [33] tested the *C. langsdorffii* oleoresin on endometriosis foci in female rats, and found significant histological changes, with a reduction in volume of the endometrioses.

The strong healing activity of copaiba oleoresins is one of the properties most frequently cited in ethnopharmacological studies. Despite this fact, the pharmacological studies are controversial. Brito *et al.* [62,63] observed that wounded rats treated with copaiba oleoresin obtained from *C. reticulata* took longer to heal and showed more inflammation than the control animals (saline). Similar results were obtained by Vieira *et al.* [28], who found that copaiba oleoresin from *C. langsdorffii* impairs the normal process of wound repair in the presence of a foreign body. Westphal *et al.* [46] observed an increase in tissue inflammation in rats treated by intrapleural injection of *C. multijuga* oleoresin. Also, according to Comelli, Jr *et al.* [29] the crude *C. langsdorffii* oleoresin has no effect on wound healing in intestinal mucosa of rats oil-treated orally. On the other hand, Paiva *et al.* [27] investigated the activity of wound healing in rats treated with copaiba oleoresin from *C. langsdorffii*, and obtained results that allowed them to affirm the benefits of this copaiba oleoresin, justifying its traditional use. These contradictory results may be due to the fact that oleoresins have different sources, because depending on environmental factors, plants produce different metabolites that can directly influence the activity [72].

Antimicrobial activity of oleoresin of copaiba is one of the most frequently studied properties, and various works have evaluated its antimicrobial activity against the following bacteria: *Escherichia coli* [21,39], *Staphylococcus aureus* [13,20,23,39,40,54], *Pseudomonas aeruginosa* [23,39], methicillin-resistant *S. aureus* [13], *Listeria monocytogenes* [21], *Staphylococcus epidermidis* [13],

*Bacillus subtilis* [13,20,40], *Streptococcus mutans* [47], *Streptococcus salivarius* [47], *Streptococcus pyogenes* [47], *Proteus mirabilis* [13,23], *Klebsiella pneumoniae* [13,23], *Shigella flexnerii* [13,23], *Enterobacter cloacae* [13], *Enterococcus faecalis* [13,47], *Citrobacter freundii* [23], *Actinobacillus pleuropneumoniae* [23], *Haemophilus parasuis* [23], *Paenibacillus alginolyticus* [48], *P. pabuli* [48], *P. azotofixans* [48], *P. borealis* [48], *P. gluconolyticus* [48], *P. validus* [48], *P. thiaminolyticus* [48] and *P. larvae* [48]; yeasts: *Candida albicans* [13], *C. parapsilosis* [13,41,42], *C. tropicalis* [13,41,42] and *C. guilliermondii* [41,42]; and fungi: *Aspergillus flavus* [41,42], *A. niger* [41,42], *A. tamari* [41,42], *A. terreus* [41,42], *Trichophyton rubrum* [13], *T. mentagrophytes* [13], *Microsporium canis* [13] and *M. gypseum* [13].

Copaiba oleoresin from *C. multijuga* showed antimicrobial activity against *E. coli*, *S. aureus* and *P. aeruginosa* [39]. However, Pacheco *et al.* [40] did not observe any activity of the copaiba oleoresin from *C. multijuga* against *S. aureus* (or against any other bacteria analyzed). The authors also mention that another copaiba oleoresin (species not identified) showed no activity against *B. subtilis* and *S. aureus*. The fungicidal activity of *C. multijuga* oleoresin *in natura*, and a volatile fraction obtained of the hydrodistillation of this oleoresin, were evaluated *in vitro* against filamentous fungi (*Aspergillus*) and yeast (*Candida*). Samples were compared with the antibiotic drug Miconazole nitrate (MIC = 0.1–0.5 µg/mL), the volatile fraction being more active (MIC = 0.08–0.5 µg/mL) [41,42].

Oleoresins obtained from the species *C. martii*, *C. officinalis* and *C. reticulata* showed *in vitro* bactericidal activity against *S. aureus*, methicillin-resistant *S. aureus*, *S. epidermidis*, *B. subtilis*, and *E. faecalis* with minimum inhibitory concentrations ranging from 31.3–62.5 µg/mL [13]. The oleoresin from *C. reticulata* showed high activity against *S. aureus* multidrug resistant (MIC = 2.5 µg/mL) and *S. aureus* ATCC strains (MIC = 5.0 µg/mL) [54]. Pieri *et al.* [47] showed the ability of the *C. officinalis* oleoresin to inhibit bacterial adhesion in dog's teeth by clinical and microbiological trials.

Antimicrobial activity of two solutions containing oleoresins of two different species of *Copaifera* was tested against 27 strains of *Escherichia coli* obtained from mastitic milk of animal origin. The solution of *C. langsdorffii* oleoresin inhibited the growth of eight strains and another solution containing *C. officinalis* inhibited the growth of seven isolates. The results of this study suggest that the copaiba oleoresin may be a potential source of new and selective antimicrobial agents [22]. Pieri *et al.* [21] found that *C. langsdorffii* oleoresin did not alter its antimicrobial activity against bacteria of the *Listeria monocytogenes* species after exposure to high temperatures in an autoclave. In another study, two copaiba oleoresins were evaluated for antibacterial activity against pathogenic species of interest to animal and human health. The *C. langsdorffii* and *C. officinalis* oleoresins showed activities against *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. flexneri* and *S. aureus* [23]. Santos *et al.* [48] demonstrated that the essential oil of *C. officinalis* presents high activity against *Paenibacillus* species. These results show that some copaiba oleoresins have antimicrobial activity, confirming the findings of the ethnopharmacological studies.

The studies of Paiva *et al.* [25] with *C. langsdorffii* copaiba oleoresin found a reduction in gastric wounds induced by ethanol, and a hypothermic restraint-stress in the indomethacin model mediated through its effect on mucus production and by its antiacid secretory properties. Later, Paiva *et al.* [24] demonstrated the protector activity of this oleoresin against ischemia/reperfusion-induced intestinal tissue damage.

The anticancer activity of copaiba oleoresins from some species has been studied using diverse models. The *C. multijuga* oleoresin and its (hexane and chloroform) fractions obtained by fractionation using KOH impregnated gel column chromatography demonstrated significant inhibitory effect on Erlich tumor-bearing mice [44], and found that it reduced the growth of melanoma cells on mice [43], both after oral administration, confirming its use by traditional medicine. However, Brito *et al.* [52] found that the species *C. officinalis* stimulated the tumor growth of Walker 256 carcinoma inoculated into the vagina and uterine cervix of rats.

Gomes *et al.* [45] observed a central and peripheral antinociceptive activity in two copaiba oleoresins (*C. multijuga* and *C. reticulata*), and suggest that fractions (hexane, chloroform and methanol) obtained from *C. multijuga* oleoresin after a KOH impregnated gel column chromatography have antinociceptive effect mediated by the opioid receptors [36]. Carvalho *et al.* [19] demonstrated the existence of analgesic activity from *C. duckei* Dwyer oleoresin by intraperitoneal administration of acetic acid solution in mice.

The mutagenic and cytotoxic activity of *C. langsdorffii* oleoresin were evaluated in erythrocytes of *Mus musculos* mice treated with crude oleoresin by oral administration, in which dose-dependant toxic capacity was found [34]. The mutagenic and cytotoxic activities of *C. duckei* oleoresin were evaluated in Wistar rats by dermal application, and was found to have no toxicity to the peripheral blood reticulocytes and bone marrow cells [17]. In another study, the acute toxic and neurotoxic effects of *C. reticulata* oleoresin administered orally to the Wistar rats species were evaluated, presenting low mortality and a very high toxic dose [60]. The same author evaluated the embryotoxicity of oleoresin from *C. reticulata* in pregnant rats. The oleoresin was toxic to the mother and embryotoxic, but not lethal at any dose level [59].

Lima *et al.* [18] performed a pre-clinical trial in Wistar rats (*Rattus norvegicus*) of a vaginal cream containing 2.5% of *C. duckei* oleoresin. This study demonstrated the absence of maternal toxicity, embryofetotoxicity and fetotoxicity at the dose administered (10 times that recommended in humans), and it was concluded that the vaginal cream is safe during pregnancy.

The anxiolytic activity was evaluated in an ethological study in rats treated with *C. reticulata* oleoresin. The studies demonstrated that copaiba oleoresin produced dose-dependent anxiolytic-like effects across all the dose ranges tested, within conventional and ethological parameters, without adversely affecting general activity [64].

Many studies still report insecticidal activity of great interest in popular knowledge, such as *C. reticulata* oleoresin tested for its insecticidal activities against the Japanese termite (*Reticulitermes speratus* Kolbe) using a fumigation bioassay, which did not demonstrate insecticidal activity [57].

A study evaluated the use of commercially available insect repellents used by military personnel in a jungle environment in the Amazon region. The repellent DEET (*N,N*-diethyl-3-methylbenzamide) was compared with natural oil-repellents containing *Copaifera spp.* oleoresin. The results showed a higher degree of perceived protection against damage caused by insects with the repellent containing copaiba oleoresin [68].

The acaricidal activity of oleoresinous extract from *C. reticulata* was investigated; larval mortality was tested after treatment with a solution containing the oleoresin, and the concentration was evaluated to determine lethal concentrations [58].

Larvicidal activity of *C. reticulata* oleoresin was observed for *Culex quinquefasciatus*, the main transmitter of *Bancroftian filariasis* [56]. Copaiba oleoresins from *C. langsdorffii* showed significant activities against *Aedes aegypti* ( $LC_{50} = 41 \mu\text{g/L}$ ) in the larvicidal assay [31]. Another study demonstrated the potential of *Copaifera spp.* oleoresin to inhibit *A. aegypti* proliferation, showing larvicidal activity at low concentrations ( $LC_{50} = 44\text{--}51 \text{ mg/mL}$ ), and a gradual reduction in activity was observed over several days [69]. Silva *et al.* [55] showed that the hexanic and methanolic fractions of oleoresin from *C. reticulata* exhibited high toxicity against *A. aegypti* larvae. Prophiro *et al.* [71] investigated the efficiency of solution prepared with *Copaifera spp.* oleoresin as a larvicide in wild populations of *A. aegypti* with resistance to organophosphate, showing larvicidal activity in all concentrations tested. The same author studied the start time of larvicidal activity, residual effect, and the effect of very low concentrations of this oleoresin on *A. aegypti*; the results demonstrated a lethal effect between the first 2 and 3 h of larval development, with the toxic effect remaining totally effective (100% mortality) until the sixth day for *Copaifera sp.* (90 mg/L) [70].

Santos *et al.* [15] screened eight different Brazilian copaiba oleoresins for antileishmanial activity, and observed a variable level of activity against *Leishmania amazonensis* ( $IC_{50} = 5.0$  to  $22 \mu\text{g/mL}$ ), with the oleoresin from *C. reticulata* showing the strongest antileishmanial activity ( $IC_{50} = 5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) for promastigote forms of *L. amazonensis* after 72 h of incubation. Kvist *et al.* [53] observed moderate leishmanicide activity for *C. paupera* oleoresin ( $IC_{50} = 17 \mu\text{g/mL}$ ), lower than that found by Santos *et al.* [15], that was  $IC_{50} = 11 \mu\text{g/mL}$ . The oral treatment with *C. martii* oleoresin showed a significant reduction in the average lesion size ( $1.1 \pm 0.4 \text{ mm}$ ) caused by *L. amazonensis* when compared with untreated mice ( $4.4 \pm 1.3 \text{ mm}$ ), and histopathological evaluation did not reveal any changes in the animals treated with copaiba oleoresin, compared with the control animals. In this study, morphological and ultrastructural analyses demonstrated notable changes in parasite cells treated with this oleoresin [35]. Significant antileishmanial activity of copaiba oleoresin from *C. reticulata* was demonstrated against axenic amastigote ( $IC_{50} = 15.0 \mu\text{g/mL}$ ) and intracellular amastigote ( $IC_{50} = 20.0 \mu\text{g/mL}$ ), forms of the parasite *L. amazonensis* [61].

Copaiba oleoresin is also used by the cosmetics and varnish industries [12]. Oliveira *et al.* [67] observed that copaiba oleoresin has potential for use in topical formulation, as a stimulant agent for the absorption of hydrophilic bioactive substances. Despite the high volume of published works on copaiba oleoresin and its biological activities, there are few references that identify the compounds responsible for its biological activity.

### 3. Chemical Composition of Copaiba Oleoresins

Copaiba oleoresin is a transparent liquid with variable colour and viscosity. It consists of a mixture of sesquiterpenes and diterpenes. The oldest chemical study with copaiba oleoresin dates back to the beginning of the 19th century, when Schweitzer, in 1829, described how copaiba oleoresin, when left standing, turned into a solid substance and crystallized. He called this substance copaivic acid [12]. It is difficult to say precisely what the structure of this substance was, due to the lack of information described, and the unavailability of identification techniques at that time.

A review article from 2002 listed the sesquiterpenes and diterpenes described in the literature on copaiba oleoresins [12]. New substances and other undescribed terpenoids have been published since

then. At least 38 other sesquiterpenes were identified. Of these, 35 were found in oleoresins of *C. duckei*, *C. paupera*, *C. piresii*, *C. pubiflora* and *C. reticulata*: cyclosativene [73–76], 7-episesquithujene [76], cyperene [76], *cis*- $\alpha$ -bergamotene [73,76], *trans*- $\alpha$ -bergamotene [73–76], (*Z*)- $\beta$ -farnesene [75,76], guaia-6,9-diene [76], *epi*- $\beta$ -santalene [73,76], (*E*)- $\beta$ -farnesene [73,76], sesquisabinene [76], 4,5-diepiaristolochene [76], germacrene A, [74], *trans*-cadin-1(6),4-diene [74],  $\beta$ -chamigrene [73,76], *cis*- $\beta$ -guaiene [76]; viridiflorene [76],  $\gamma$ -gurjunene [73],  $\gamma$ -curcumene [73], *epi*-cubebol [74], valencene [73,76], *trans*- $\beta$ -guaiene [76], (*E,E*)- $\alpha$ -farnesene [76], (*Z*)- $\alpha$ -bisabolene [73,75,76],  $\alpha$ -bulnesene [73],  $\beta$ -curcumene [73], (*Z*)- $\gamma$ -bisabolene [76], 7-*epi*- $\alpha$ -selinene, [74–76], *trans*-cadin-1(2),4-diene [74], (*E*)- $\gamma$ -bisabolene [73,75,76], globulol [74], humulene epoxide II [75], *epi*-cubenol [74], cubenol, [74], *epi*- $\alpha$ -muurolol [74] and *epi*- $\beta$ -bisabolol [73]. From hydrodistillation of the *C. langsdorffii* and *C. martii* oleoresins, a further identified three sesquiterpenes were identified: seline-3,7(11)-diene [77],  $\alpha$ -calacorene [78] and gleenol [78]. Even with the great variation that the chemical composition of these oleoresins usually presents,  $\beta$ -caryophyllene, considered a chemical marker of these oleoresins, is usually the major constituent [79]. However,  $\alpha$ -copaene was the major constituent of samples of *C. paupera* and *C. piresii* oleoresins collected in Acre and Rondônia, respectively [74], and was also the major constituent in the samples of *C. martii* oleoresins collected in Pará, subjected to hydrodistillation [78]. Meanwhile,  $\beta$ -bisabolene was the major constituent in several samples of *C. duckei* and *C. reticulata* collected in Pará [73,75].

As for the diterpenes, at least 15 other diterpenes not reported in the review article of 2002 were identified, including four with kaurane-type skeletons: *ent*-kaur-16-ene [80], *ent*-kaur-16-en-19-al [80], 19-*nor*-kaur-16-en-4 $\alpha$ -ol [80,81] and *ent*-kaur-16-en-19-ol [80]; three of clerodane-type skeleton: clerodan-15,18-dioic acid [82], 7 $\alpha$ -acetoxyhardwickiic acid [83] and 7 $\alpha$ -acetoxybacchotricuneatin D [84]; and eight with labdane-type skeletons: *ent*-4-*epi*-agathic acid [81], 3-hydroxycopallic acid [85], 3-acetoxy-copallic acid [79], 14, 15-dinorlabd-8(17)-en-13-one [86], (-)-3- $\beta$ -hydroxy-15,16-dinorlabd-8(17)-ene-13-one [84], (-)-15,16-dinorlabd-8(17)-en-3 $\beta$ ,13-diol [87], (-)-13(*R*)-14,15-dinorlabd-8(17)-ene-3,13-diol [88] and pauperol [86].

There are some doubts as to the exact structures of these two last diterpenes. The *ent*-dinorlabdane (-)-13(*R*)-14,15-dinorlabd-8(17)-ene-3,13-diol, was isolated from a commercial copaiba oleoresin [88]. This substance may have been degraded from 3-hydroxycopallic acid, since the oleoresin, without identification, would have been exposed to light and temperature conditions that could lead to loss of part of the side chain. The other is a C35 methyl ester, a substance produced by the coupling of a labdanoic diterpene and a sesquiterpene alcohol, giving the ester pauperol, isolated from *C. paupera* [86]. Indeed, this substance may not be originally present in the oleoresin, since the authors report that they performed esterification (diazomethane) prior to the isolation.

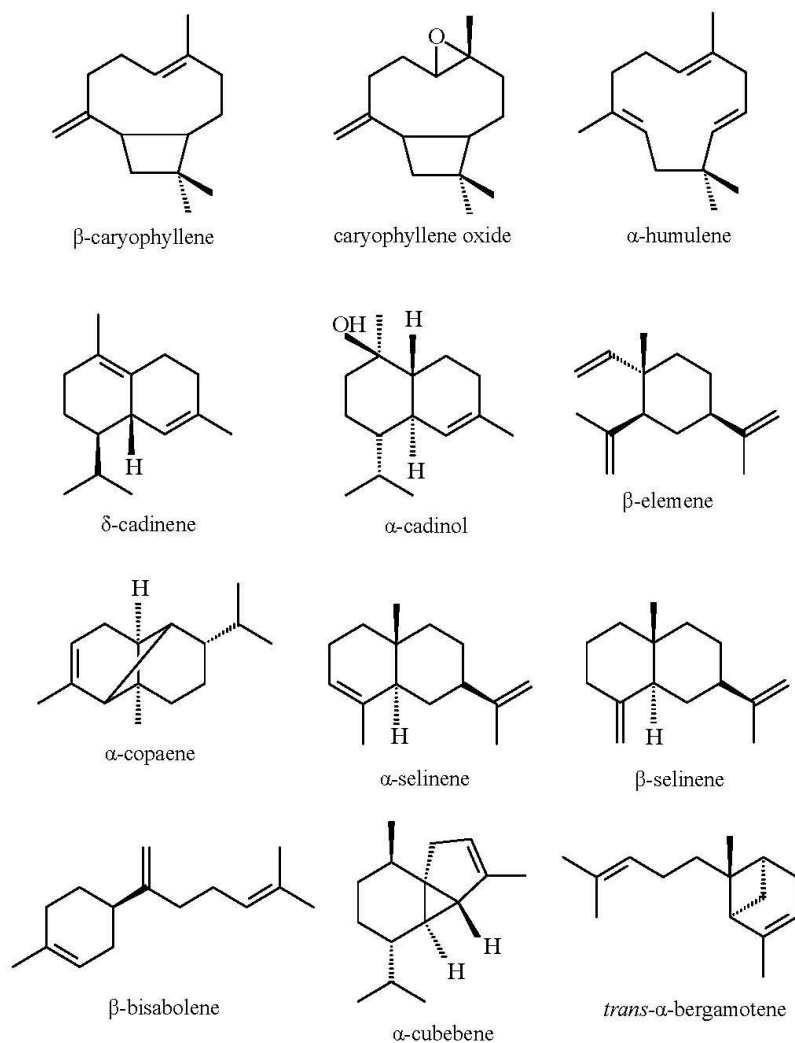
The perfume and cosmetics industries have shown great interest in the sesquiterpene fraction, which is responsible for the aroma of copaiba oleoresin. The commercial value of concentrates of sesquiterpenes of *Copaifera* is as much as six hundred times higher than that of the whole copaiba oleoresin. Sant'Anna *et al.* [89] evaluated the volatile fraction of *C. multijuga* oleoresin and indicated minor compounds such as  $\delta$ -cadinene,  $\delta$ -cadinol, (*Z*)- $\alpha$ -santalol, caryophyllene oxide,  $\alpha$ -cadinol and  $\tau$ -muurolol as the most intense compounds in the aroma of the copaiba oleoresin studied. Chiral GC-O-MS proved (+)- $\delta$  cadinene to be the only enantiomer present in the oleoresin, with a sweet, green, refreshing aroma.

### 3.1. Pharmacological Activities of the Main Sesquiterpenes from Copaiba Oleoresin

Many studies have shown that sesquiterpenes are the main substances present in copaiba oleoresins. Sometimes, these account for more than 90% of their composition. Because they are the major components, many of the pharmacological activities of copaiba oleoresins are attributed to the main sesquiterpenes from the oleoresin. However, the pharmacological effect of the oleoresin, cannot be attributed to just one constituent, because the constituents present in oleoresin may interact synergistically in the promotion of the activity observed.

The main sesquiterpenes found in copaiba oleoresins are:  $\beta$ -caryophyllene, caryophyllene oxide,  $\alpha$ -humulene,  $\delta$ -cadinene,  $\alpha$ -cadinol,  $\beta$ -elemene,  $\alpha$ -copaene,  $\alpha$ -selinene,  $\beta$ -selinene,  $\beta$ -bisabolene,  $\alpha$ -cubebene, and *trans*- $\alpha$ -bergamotene (Figure 1).

**Figure 1.** Main sesquiterpenes detected in copaiba oleoresin.





Some of the sesquiterpenes are major components in the oleoresin and others, although present in minor proportions, are often detected. Some studies of the pharmacological activities of some of the main sesquiterpenes found in the copaiba oleoresin are described below.

The sesquiterpenes  $\beta$ -caryophyllene and its oxide are both commonly found in copaiba oleoresins and in many other plant species [90,91]. Cascon *et al.* [79] suggested that caryophyllene oxide is possibly an oxidative artefact produced during storage of oleoresin. Several biological activities are attributed to  $\beta$ -caryophyllene, such as insecticidal [92,93], antimicrobial [94,95], local anaesthetic [96], anticarcinogenic [97–101], and anti-inflammatory [90,91] activities.

Rodilla *et al.* [92] isolated  $\beta$ -caryophyllene and its oxide from *Laurus novocanariensis* leaves essential oil and they showed that both were strong antifeedants to *Leptinotarsa decemlineata* and *Spodoptera littoralis*. Another study demonstrated the repellent effect of caryophyllene oxide against *Anopheles gambiae* [93]. The sesquiterpenes  $\beta$ -caryophyllene and caryophyllene oxide, isolated from the oil of *Calocedrus formosana* leaves, presented antitermitic activity and antifungal activity against *L. sulphureus* [95]. Goren *et al.* [94] reported that  $\beta$ -caryophyllene presented antimicrobial activity against *E. coli*, *S. aureus*, *K. pneumonia*, *P. aeruginosa* and *C. albicans*, and caryophyllene oxide showed activity only for *C. albicans*. Ghelardini *et al.* [96] demonstrated that  $\beta$ -caryophyllene has a strong local anaesthetic action.

Many authors have reported the anticarcinogenic properties of  $\beta$ -caryophyllene. According to Silva *et al.* [97] and Kubo *et al.* [98], this sesquiterpene exhibits cytotoxic activity against several solid tumor cell lines. A previous study showed that  $\beta$ -caryophyllene exhibited antiproliferative activity in human renal adenocarcinoma and amelanotic melanoma cells [102]. Furthermore,  $\beta$ -caryophyllene has also been reported to increase the anticancer activity of  $\alpha$ -humulene, isocaryophyllene and paclitaxel against tumour cell lines [101]. In study by Zheng *et al.* [99], the compounds:  $\beta$ -caryophyllene,  $\beta$ -caryophyllene oxide, and  $\alpha$ -humulene (all present in the copaiba oleoresins) showed significant activity as inducers of the detoxifying enzyme glutathione S-transferase in mouse liver and small intestine. Finally, antimutagenic activity of the  $\beta$ -caryophyllene was observed by Di Sotto *et al.* [100]. According to the authors, this sesquiterpene was able to protect human lymphocytes cultivated with genotoxic damage induced by ethylic methanesulfonate and colcemid.

Many studies have also confirmed the anti-inflammatory activity of  $\beta$ -caryophyllene and/or caryophyllene oxide. Tung *et al.* [90] studied anti-inflammatory activities of essential oil from *Cinnamomum osmophloeum* twigs and its main constituents. In this study, the sesquiterpenes  $\beta$ -caryophyllene and its oxide exhibited excellent anti-inflammatory activities in suppressing nitric oxide production by LPS-stimulated macrophages. In other studies, caryophyllene oxide showed significant central as well as peripheral analgesic, along with anti-inflammatory, activity [91] and showed inhibitory effect on histamine-induced contraction in guinea pig ileum [103]. Cho *et al.* [104] demonstrated the ameliorative effect of oral administration of  $\beta$ -caryophyllene in mice on experimental colitis induced by dextran sulfate sodium.

The sesquiterpenes  $\beta$ -caryophyllene and  $\alpha$ -humulene, isolated from *Cordia verbenacea* leaves essential oil, showed systemic anti-inflammatory activity in rat paw oedema induced by carageenin, bradykinin, P Substance, histamin and plaquetary activating factor (PAF), and also oedema induced by *Apis mellifera* venom or ovalbumin in sensitized rats. In the same paper, a decreasing in TNF level was observed, without this affecting the production of interleukin-1 [105]. The link between isolated



$\alpha$ -humulene and  $\beta$ -caryophyllene and the release of inflammatory mediators, such as bradykinin, FAP, histamine, interleukin-1 $\beta$ , TNF and prostaglandins, was observed, together with COX-2 inhibition NF-KB [106].

Likewise, a solution of  $\alpha$ -humulene and  $\beta$ -caryophyllene showed action against allergy-related inflammation in an experimental model in which this solution was used to treat mice sensitized with oral or nasal administration.  $\alpha$ -Humulene showed activity even in therapeutic or preventive treatments, reducing the eotaxin and interleukin-5 levels of the mediastine lymph nodes (*in vitro*), a result not shown for  $\beta$ -caryophyllene.  $\alpha$ -Humulene also reduced the nuclear transcription factor (NF-KB), P-selectin expression in the lung tissue and mucus secretion from the lungs, results that suggest its potential use for the treatment of asthma and allergy-related inflammatory diseases [107]. Furthermore,  $\alpha$ -humulene showed cytotoxicity activity against several solid tumor cell lines, including breast cancer adenocarcinoma, prostatic adenocarcinoma, lung carcinoma, colon adenocarcinoma lines, and human melanoma cell line, besides mouse colon cell line. The authors suggested that the cytotoxicity of  $\alpha$ -humulene resulted in cellular glutathione depletion and reactive oxygen species production [108].

Other common sesquiterpenes in the copaiba oleoresin are  $\delta$ -cadinene and  $\alpha$ -cadinol.  $\delta$ -Cadinene inhibited the growth of *Streptococcus mutans* (one of the most important cariogenic bacteria) and *Propionibacterium acnes* (one of the bacteria responsible for acne) [109]. Pérez-Lopez *et al.* [110] performed a bioassay-guided fractionation of the essential oil obtained from the fruit of *Schinus molle* against *S. pneumonia* resistant to conventional antibiotics, which led to the identification of  $\delta$ -cadinene as the principal active constituent (MIC of 31.25  $\mu$ g/mL) from the oil.

Previous studies have reported that  $\alpha$ -cadinol showed antitermitic activity [95], insecticidal activity against yellow fever mosquito larvae, and was selectively cytotoxic against human colon adeno-carcinoma [111]. Furthermore, it exhibited antifungal activity against *C. versicolor* [112] and *L. sulphureus* [95,112].

Elemene is mainly composed of  $\beta$ - and  $\delta$ - and  $\gamma$ -elemene, with  $\beta$ -elemene accounting for 60%–72% of all three isoforms [113].  $\beta$ -Elemene is a broad-spectrum antitumor agent. It has been shown that this sesquiterpene is an effective treatment for various types of cancer, including gastric [114], lung [115], laryngeal [116], ovarian [117], brain [118], prostate [119] cancer, and leukemia [120].

Liu *et al.* [114] investigated the anti-tumor effect of  $\beta$ -elemene on human gastric cancer cells, and the molecular mechanism involved. The data provides the first evidence that  $\beta$ -elemene induces protective autophagy and prevents human gastric cancer cells from undergoing apoptosis. Wang *et al.* [115] indicated that human lung carcinoma cells were more sensitive to  $\beta$ -elemene than the others.

The inhibitory effects and mechanism of elemene were also investigated in the growth of laryngeal cancer cells *in vitro* and *in vivo*, transplanting cell subcutaneously to BALB/c nude mice to produce solid tumors. Increased apoptosis was observed in elemene administered cells. *In vivo*, the growth of HEp-2 cell-transplanted tumors in nude mice was inhibited by intraperitoneal injection of elemene [116].

Li *et al.* [117] showed that  $\beta$ -elemene inhibited the proliferation of cisplatin resistant human ovarian cancer cells and their parental cells, but had only a marginal effect in human ovary cells, indicating differential inhibitory effects on cell growth when comparing ovarian cancer cells with normal ovary cells. It was also demonstrated for the first time that  $\beta$ -elemene markedly enhanced cisplatin induced growth inhibition in resistant cells compared to sensitive cells.

$\beta$ -Elemene induced the formation of apoptotic bodies and DNA ladder on K562 leukemia cells, an effect that was dose- and time-dependent in  $\beta$ -elemene treated cells as compared with the untreated control cells [120]. Moreover,  $\beta$ -elemene has been shown to antagonize glioblastoma (the most prevalent type of primary brain tumor in adults) cells by inducing apoptosis disrupting the formation of a key step in maintaining the conformation stability of Hsp90/Raf-1 complex [118].

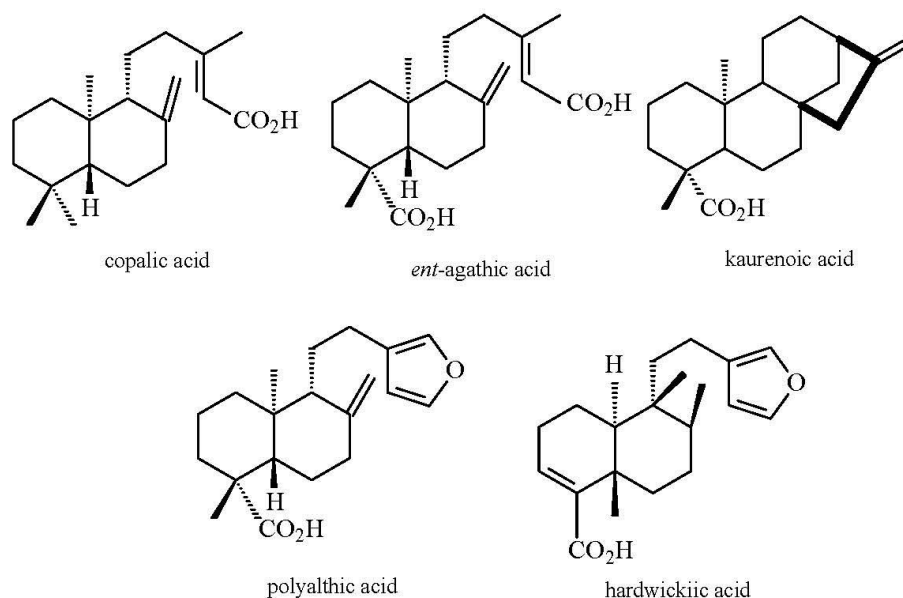
Another study was performed to assess the effect of  $\beta$ -elemene on prostate cancer cells, as well as other types of tumour cells, and to determine whether the effect of  $\beta$ -elemene on prostate cancer cell death was mediated through the induction of apoptosis. It was demonstrated that  $\beta$ -elemene suppresses the growth and proliferation of prostate cancer cells and other types of tumour cells *in vitro* [119].

Inhibition of cell proliferation [121] and induction of apoptosis [122] have been proposed as the underlying mechanism of the anti-tumor effects of  $\beta$ -elemene. Furthermore, several studies have indicated that  $\beta$ -elemene enhances the cytotoxic effect of radiation *in vitro* and *in vivo*. Li *et al.* [123] suggested that  $\beta$ -elemene can enhance lung (A549) cell radiosensitivity through the enhancement of DNA damage and the suppression of DNA repair.

### 3.2. Pharmacological Activities of the Main Diterpenes from *Copaiba Oleoresin*

The diterpenes most commonly found in copaiba oleoresins are copalic, polyalthic, hardwickiic, kaurenoic and *ent*-kaurenoic acids, together with their derivatives 3-hydroxy-copalic, 3-acetoxy-copalic, and *ent*-agathic (Figure 2).

**Figure 2.** Main diterpenes detected in copaiba oleoresin.



Copalic acid was first described by Nakano and Djerassi [124], who isolated it from *Hymenaea courbaril* resin samples. This diterpene is considered a biomarker for this genus *Copaifera* and some

studies have been performed to evaluate the antibacterial activities of this substance. It has been demonstrated to have significant antimicrobial activity against *B. subtilis*, *S. aureus*, and *S. epidermidis* [86]. Recently, Souza *et al.* [125] investigated the antimicrobial activity of four labdane-type diterpenes [(*-*)-copalic acid, (*-*)-acetoxycopalic acid, (*-*)-hydroxycopalic acid and (*-*)-agathic acid] isolated from the copaiba oleoresin from *C. langsdorffii* against a representative panel of microorganisms responsible for periodontitis. Copalic acid was the most active diterpene, displaying a very promising MIC value ( $3.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) against the key pathogen (*Porphyromonas gingivalis*) involved in this infectious disease. Moreover, it did not exhibit cytotoxicity when tested in human fibroblasts. In another paper, Souza *et al.* [126] reported that copalic acid was active against the main microorganisms responsible for dental caries: *Streptococcus salivarius*, *S. sobrinus*, *S. mutans*, *S. mitis*, *S. sanguinis* and *Lactobacillus casei*.

Hardwickiic acid is another diterpene that is very common in copaiba oleoresins, being detected in about 42% of them [127]. Some studies have been performed with this diterpene to determine its antibacterial activity [128]. It has shown significant qualitative antibacterial activity against *B. subtilis*, *S. aureus* and *Mycobacterium smegmatis*. Moreover, hardwickiic acid, isolated from the stem bark of *Irvingia gabonensis*, inhibited the growth of several bacteria and fungus species using dilution methods [129]. However, in a recent study, when it was assayed against a collection of Gram-negative multidrug-resistant bacteria, the diterpene was inactive [130].

Kaurenoic acid (*ent*-kaur-16-en-19-oic acid) was first described in 1971 by Ferrari *et al.* [131]. However, this acid was only detected in copaiba oleoresins in 1998 by Braga *et al.* [132] who isolated it from *C. cearensis* using ion-exchange chromatography. Although this diterpene is present in about 30% of copaiba oleoresins [124], it sometimes cannot be detected by GC because its retention time is similar to with that of copalic acid, resulting in co-elution. Therefore, it was not possible to distinguish the kaurenoic (or the copalic) acid [133]. Several pharmacological studies were performed with kauran acid, to determine its uterine muscle relaxant [134], anti-inflammatory [135], bactericidal [86], and cytotoxicity [136] effects, activity against *Trypanosoma cruzi* tripomastigotes [137], genotoxicity induction [138], and vasodilatory effects [139].

The uterine relaxant effects of kaurenoic acid were reported by Cunha *et al.* [134], who isolated this diterpene from *C. langsdorffii* oleoresin. According to these authors, kaurenoic acid exerts this relaxant effect principally through calcium blockade and in part, by the opening of ATP-sensitive potassium channels. Another study investigated the mechanisms involved in the vasorelaxant action of kaurenoic acid in isolated aortic rings in rats [139].

According to Cavalcanti *et al.* [138], kaurenoic acid has DNA damaging activity in cultured Chinese hamster fibroblasts (V79 cells) under the conditions of the Comet assays. Costa-Lotufo *et al.* [136] indicated the potential cytotoxicity of kaurenoic acid by the destruction of sea urchin embryos, the inhibition of tumor cell growth and the hemolysis of mouse and human erythrocytes.

Anti-inflammatory activity was reported by Paiva *et al.* [135] who isolated the kaurenoic acid from oleoresin of *C. langsdorffii* Desf. In this study, it was observed that kaurenoic acid prevented tissue damage in the rat model of acetic acid colitis, an effect which the authors verified through macroscopic, histological and biochemical changes.

It has been reported also that kaurenoic acid, isolated from *C. paupera* oleoresin, showed antibacterial activity against *B. subtilis*, *S. aureus*, *S. epidermidis* [86]. In other study, kaurenoic acid,

and some of its derivatives, showed *in vitro* activity against trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi* [137], with kaurenoic acid derivatives presenting less side effects than the acid.

Souza *et al.* [140] showed that kaurenoic and polyalthic acids (the latter less active) were capable of promoting inhibition of rhodamine 6G efflux in *Saccharomyces cerevisiae* with Pdr5p enzyme (protein that confers multiple drug resistance).

Another diterpene detected in copaiba oleoresin, 3 $\alpha$ -hydroxy-kaurenoic acid presented higher fungitoxic activity against *Botrytis cinerea* (a phytopathogenic fungus that attacks the flowers, fruits, leaves, and stems of several plants). The authors suggest that the diterpene probably acts by inhibiting germination and mycelium growth this fungus [141].

Larvicidal activity has also been reported against *A. aegypti* larvae, of two labdane diterpenes isolated from *C. reticulata* oleoresin: (-)-3 $\beta$ -hydroxylabd-8(17)-13-dien-15-oic acid and 3- $\beta$ -acetoxy-labd-8(17)-13-dien-15-oic acid [142]. In another study, this latter diterpene was reported to cause death of the *A. aegypti* larvae by cell destruction in the midgut [143]. Also, another diterpene present in copaiba oleoresin, kovalenol, showed potent antitumor activity against IMC carcinoma (murine tumor) in mice [144].

#### 4. Conclusions

Although many papers have been published on the chemical composition of copaiba oleoresins, several questions remain unsolved, such as the fingerprint of the chemical composition of the different species and the presence of biomarkers, probably a combination of sesquiterpenes and diterpeneic acids. Ethnopharmacological studies indicate many activities that are still not fully understood through pharmacological experiments. Also, the activities of the isolated compounds do not explain the strong activities of crude oleoresins. Indeed, several substances have been described, and new biological studies have been published that go some way to unraveling the action mechanism of the isolated sesquiterpenes and diterpenes. All these topics still require further investigation, as copaiba oil is a resource on which there is still much work to be done.

#### Acknowledgments

This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), FAPEAM, FACEPE and CAPES.

#### Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

#### References

1. Dwyer, J.D. The Central American, West Indian and South American species of *Copaifera* (Caesalpinaceae). *Brittonia* **1951**, *7*, 143–172.
2. Martins-da-Silva, R.C.V.; Pereira, J.F.; Lima, H.C. O gênero *Copaifera* (Leguminosae-Caesalpinioideae) na Amazônia Brasileira. *Rodriguesia* **2008**, *455–476*.

3. Pio Corrêa, M. *Dicionário das Plantas Úteis do Brasil*; Ministério da Agricultura: Rio de Janeiro, Brazil, 1931; p. 370.
4. Albuquerque, U.P.; Medeiros, P.M.; Almeida, A.L.S.; Monteiro, J.M.; Lins Neto, E.M.F.; Melo, J.G.; Santos, J.P. Medicinal plants of the *caatinga* (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. *J. Ethnopharmacol.* **2007**, *114*, 325–354.
5. Brandão, M.G.L.; Zanetti, N.N.S.; Oliveira, P.; Grael, C.F.F.; Santos, A.C.P.; Monte-Mór, R.L.M. Brazilian medicinal plants described by 19th century European naturalists and in the Official Pharmacopoeia. *J. Ethnopharmacol.* **2008**, *120*, 141–148.
6. Sanz-Biset, J.; Campos-de-la-Cruz, J.; Epiquién-Rivera, M.A.; Canigüeral, S. A first survey on the medicinal plants of the Chazuta valley (Peruvian Amazon). *J. Ethnopharmacol.* **2009**, *122*, 333–362.
7. Coelho-Ferreira, M. Medicinal knowledge and plant utilization in an Amazonian coastal community of Marudá, Pará State (Brazil). *J. Ethnopharmacol.* **2009**, *126*, 159–175.
8. Desmarchelier, C.; Gurni, A.; Ciccía, G.; Giulietti, A.M. Ritual and medicinal plants of the Ese'ejas of the Amazonian rainforest (Madre de Dios, Perú). *J. Ethnopharmacol.* **1996**, *52*, 45–51.
9. Sanz-Biset, J.; Canigüeral, S. Plant use in the medicinal practices known as “strict diets” in Chazuta valley (Peruvian Amazon). *J. Ethnopharmacol.* **2011**, *137*, 271–288.
10. Mello, J.F. Plants in traditional medicine en Brazil. *J. Ethnopharmacol.* **1980**, *2*, 49–55.
11. Calderon, L.A.; Silva-Jardim, I.; Zuliani, J.P.; Silva, A.A.; Ciancaglini, P.; Silva, L.H.P.; Stábeli, R.G. Amazonian biodiversity: A view of drug development for Leishmaniasis and malaria. *J. Braz. Chem. Soc.* **2009**, *20*, 1011–1023.
12. Veiga, V.F., Jr.; Pinto, A.C. O Gênero *Copaifera* L. *Quim. Nova* **2002**, *25*, 273–286.
13. Santos, A.O.; Ueda-Nakamura, T.; Dias Filho, B.P.; Veiga, V.F., Jr.; Pinto, A.C.; Nakamura, C.V. Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2008**, *103*, 277–281.
14. Veiga, V.F., Jr.; Rosas, E.C.; Carvalho, M.V.; Henriques, M.G.M.O.; Pinto, A.C. Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne-A comparative study. *J. Ethnopharmacol.* **2007**, *112*, 248–254.
15. Santos, A.O.; Ueda-Nakamura, T.; Dias Filho, B.P.; Veiga, V.F., Jr.; Pinto, A.C.; Nakamura, C.V. Effect of Brazilian copaiba oils on *Leishmania amazonensis*. *J. Ethnopharmacol.* **2008**, *120*, 204–208.
16. Castro-e-Silva, O., Jr.; Zucoloto, S.; Ramalho, F.S.; Ramalho, L.N.Z.; Reis, J.M.C.; Bastos, A.A.C.; Brito, M.V.H. Antiproliferative activity of *Copaifera duckei* oleoresin on liver regeneration in rats. *Phytother. Res.* **2004**, *18*, 92–94.
17. Maistro, E.L.; Carvalho, J.C.T.; Cascon, V.; Kaplan, M.A.C. *In vivo* evaluation of the mutagenic potential and phytochemical characterization of oleoresin from *Copaifera duckei* Dwyer. *Genet. Mol. Biol.* **2005**, *28*, 833–838.
18. Lima, C.S.; Medeiros, B.J.L.; Favacho, H.A.S.; Santos, K.C.; Oliveira, B.R.; Taglialegna, J.C.; Costa, E.V.M.; Campos, K.J.; Carvalho, J.C.T. Pré-clinical validation of a vaginal cream containing copaiba oil (reproductive toxicology study). *Phytomedicine* **2011**, *18*, 1013–1023.

19. Carvalho, J.C.T.; Cascon, V.; Possebon, L.S.; Morimoto, M.S.S.; Cardoso, L.G.V.; Kaplan, M.A.C.; Gilbert, B. Topical antiinflammatory and analgesic activities of *Copaifera duckei* Dwyer. *Phytother. Res.* **2005**, *19*, 946–950.
20. Oliveira, D.F.; Pereira, A.C.; Figueiredo, H.C.P.; Carvalho, D.A.; Silva, G.; Nunes, A.S.; Alves, D.S.; Carvalho, H.W.P. Antibacterial activity of plant extracts from Brazilian southeast region. *Fitoterapia* **2007**, *78*, 142–145.
21. Pieri, F.A.; José, R.M.; Galvão, N.N.; Nero, L.A.; Moreira, M.A.S. Antimicrobial activity of autoclaved and non autoclaved copaiba oil on *Listeria monocytogenes*. *Cienc. Rural* **2010**, *40*, 1797–1801.
22. Pieri, F.A.; Souza, C.F.; Costa, J.C.M.; Barrero, M.A.O.; Espeschit, I.F.; Silva, V.O.; Moreira, M.A.S. Inhibition of *Escherichia coli* from mastitic milk by copaiba oil. *Semin. Ciências Agrárias* **2011**, *32*, 1929–1934.
23. Pieri, F.A.; Costa, J.C.M.; Souza, C.F.; Santos, L.; Moreira, M.A.S. Antimicrobial Profile Screening of Two Oils of *Copaifera* Genus. In *Proceeding of the 37th CONBRAVET*, Brazilian Congress of Veterinary Medicine (CONBRAVET): Rio de Janeiro, Brazil, July 2010.
24. Paiva, L.A.F.; Gurgel, L.A.; Campos, A.R.; Silveira, E.R.; Rao, V.S.N. Attenuation of ischemia/reperfusion-induced intestinal injury by oleo-resin from *Copaifera langsdorffii* in rats. *Life Sci.* **2004**, *75*, 1979–1987.
25. Paiva, L.A.F.; Rao, V.S.N.; Gramosa, N.V.; Silveira, E.R. Gastroprotective effect of *Copaifera langsdorffii* oleo- resin on experimental gastric ulcer models in rats. *J. Ethnopharmacol.* **1998**, *62*, 73–78.
26. Silva, J.J.L.; Guimarães, S.B.; Silveira, E.R.; Vasconcelos, P.R.L.; Lima, G.G.; Torres, S.M.; Vasconcelos, R.C. Effects of *Copaifera langsdorffii* Desf. on ischemia-reperfusion of randomized skin flaps in rats. *Aesthet. Plast. Surg.* **2009**, *33*, 104–109.
27. Paiva, L.A.F.; Cunha, K.M.A.; Santos, F.A.; Gramosa, N.V.; Silveira, E.R.; Rao, V.S.N. Investigation on the wound healing activity of oleo-resin from *Copaifera langsdorffii* in rats. *Phytother. Res.* **2002**, *16*, 737–739.
28. Vieira, R.C.; Bombardiere, E.; Oliveira, J.J.; Lino-Júnior, R.S.; Brito, L.A.B.; Junqueira-Kipnis, A.P. Influência do óleo de *Copaifera langsdorffii* no reparo de ferida cirúrgica em presença de corpo estranho. *Pesq. Vet. Bras.* **2008**, *28*, 358–366.
29. Comelli-Júnior, E.; Skinovski, J.; Sigwalt, M.F.; Branco, A.B.; Luz, S.R.; Baulé, C.P. Rupture point analysis of intestinal anastomotic healing in rats under the action of pure Copaiba (*Copaifera langsdorffii*) oil. *Acta Cir. Bras.* **2010**, *25*, 362–367.
30. Maciel, H.P.F.; Gouvêa, C.M.C.P.; Toyama, M.; Smolka, M.; Marangoni, S.; Pastore, G.M. Extraction, purification and biochemical characterization of a peroxidase from *Copaifera langsdorffii* leaves. *Quim. Nova* **2007**, *30*, 1067–1071.
31. Mendonça, F.A.C.; Silva, K.F.S.; Santos, K.K.; Ribeiro, K.A.L., Jr.; Sant’Ana, A.E.G. Activities of some Brazilian plants against larvae of the mosquito *Aedes aegypti*. *Fitoterapia* **2005**, *76*, 629–636.
32. Paiva, L.A.F.; Gurgel, L.A.; Sousa, E.T.; Silveira, E.R.; Silva, R.M.; Santos, F.A.; Rao, V.S.N. Protective effect of *Copaifera langsdorffii* oleo-resin against acetic acid-induced colitis in rats. *J. Ethnopharmacol.* **2004**, *93*, 51–56.

33. Nogueira-Neto, J.; Lindoso, M.J.S.; Coelho, L.F.; Carvalho, R.A.F.; Rodrigues, T.G.P.M.; Araújo, A.G.P.; Girão, M.J.B.C.; Schor, E. Changes in the volume and histology of endometriosis foci in rats treated with copaiba oil (*Copaifera langsdorffii*). *Acta Cir. Bras.* **2011**, *26*, 20–24.
34. Chen-Chen, L.; Sena, M.A. Atividade toxica e mutagênica do óleo de copaiba (*Copaifera langsdorffii* Desfon) em camundongos. *Rev. Bras. Plant Med.* **2002**, *5*, 37–40.
35. Santos, A.O.; Costa, M.A.; Ueda-Nakamura, T.; Dias-Filho, B.P.; Veiga, V.F., Jr.; Lima, M.M.S.; Nakamura, C.V. *Leishmania amazonensis*: Effects of oral treatment with copaiba oil in mice. *Experim. Parasitol.* **2011**, *129*, 145–151.
36. 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.* **2010**, *128*, 177–183.
37. Veiga, V.F., Jr.; Zunino, L.; Patitucci, M.L.; Pinto, A.C.; Calixto, J.B. The inhibition of paw oedema formation caused by the oil of *Copaifera multijuga* Hayne and its fractions. *J. Pharm. Pharmacol.* **2006**, *58*, 1405–1410.
38. Brito, M.V.H.; Moreira, R.J.; Tavares, M.L.C.; Carballo, M.C.S.; Carneiro, T.X.; Santos, A.A.S. Efeito do óleo de copaiba nos níveis séricos de uréia e creatinina em ratos submetidos à síndrome de isquemia e reperfusão renal. *Acta Cir. Bras.* **2005**, *20*, 243–246.
39. Mendonça, D.E.; Onofre, S.B. Atividade antimicrobiana do óleo-resina produzido pela copaiba – *Copaifera multijuga* Hayne (Leguminosae). *Rev. Bras. Farmacogn.* **2009**, *19*, 577–581.
40. Pacheco, T.A.R.C.; Barata, L.E.S.; Duarte, M.C.T. Antimicrobial activity of copaiba (*Copaifera* spp.) balsams. *Rev. Bras. Pl. Med.* **2006**, *8*, 123–124.
41. Deus, R.J.A.; Carvalho, A.S.C.; Banna, D.A.D.S.; Arruda, M.S.P.; Alves, C.N.; Santos, A.S. Efeito fungitóxico *in vitro* do óleo resina e do óleo essencial de copaiba (*Copaifera multijuga* Hayne). *Rev. Bras. Pl. Med.* **2009**, *11*, 347–353.
42. Deus, R.J.A.; Alves, C.N.; Arruda, M.S.P. Avaliação do efeito antifúngico do óleo resina e do óleo essencial de copaiba (*Copaifera multijuga* Hayne). *Rev. Bras. Pl. Med.* **2011**, *13*, 1–7.
43. Lima, S.R.M.; Veiga, V.F., Jr.; Christo, H.B.; Pinto, A.C.; Fernandes, P.D. *In vivo* and *in vitro* studies on the anticancer activity of *Copaifera multijuga* Hayne and its fractions. *Phytother. Res.* **2003**, *17*, 1048–1053.
44. Gomes, N.M.; Rezende, C.M.; Fontes, S.P.; Hovell, A.M.C.; Landgraf, R.G.; Matheus, M.E.; Pinto, A.C.; Fernandes, P.D. Antineoplastic activity of *Copaifera multijuga* oil and fractions against ascitic and solid ehrlich tumor. *J. Ethnopharmacol.* **2008**, *119*, 179–184.
45. Gomes, N.M.; Rezende, C.M.; Fontes, S.P.; Matheus, M.E.; Fernandes, P.D. Antinociceptive activity of Amazonian copaiba oils. *J. Ethnopharmacol.* **2007**, *109*, 486–492.
46. Westphal, F.L.; Lima, L.C.; Guimarães, R.A.; Souza, R.F.S.; Couto, S.B.; Nakajima, S.R. Avaliação das alterações pleuropulmonares após a injeção de óleo de resina de copaiba, extrato aquoso de crajiru e polivinilpirrolidona iodado (PVPI) na pleura e parênquima pulmonar de ratos. *Rev. Col. Bras. Cir.* **2007**, *34*, 170–176.
47. Pieri, F.A.; Mussi, M.C.; Fiorini, J.E.; Schneedorf, J.M. Efeitos clínicos e microbiológicos do óleo de copaiba (*Copaifera officinalis*) sobre bactérias formadoras de placa dental em cães. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* **2010**, *62*, 578–585.



48. Santos, R.C.V.; Alves, C.F.S.; Schneider, T.; Lopes, L.Q.S.; Aurich, C.; Giongo, J.L.; Brandelli, A.; Vaucher, R.A. Antimicrobial activity of Amazonian oils against paenibacillus species. *J. Invertebr. Pathol.* **2012**, *109*, 265–268.
49. Araújo, F.A., Jr.; Braz, M.N.; Rocha Neto, O.G.; Costa, F.D.; Brito, M.V.H. Efeito do óleo de copaíba nas aminotransferases de ratos submetidos à isquemia e reperfusão hepática com e sem pré-condicionamento isquêmico. *Acta Cir. Bras.* **2005**, *20*, 93–99.
50. Baylac, S.; Racine, P. Inhibition of 5-lipoxygenase by essential oils and other natural fragrant extracts. *Int. J. Aromather.* **2003**, *13*, 138–142.
51. Baylac, S.; Racine, P. Inhibition of human leukocyte elastase by natural fragrant extracts of aromatic plants. *Int. J. Aromather.* **2004**, *14*, 179–182.
52. Brito, N.M.B.; Brito, M.V.H.; Carvalho, R.K.V.; Matos, L.T.M.B.; Lobato, R.C.; Correa, S.C.; Brito, R.B. The effect of copaiba balsam on Walker 256 carcinoma inoculated into the vagina and uterine cervix of female rats. *Acta Cir. Bras.* **2010**, *25*, 176–180.
53. Kvist, L.P.; Christensen, S.B.; Rasmussen, H.B.; Mejia, K.; Gonzalez, A. Identification and evaluation of Peruvian plants used to treat malaria and leishmaniasis. *J. Ethnopharmacol.* **2006**, *106*, 390–402.
54. Correia, A.F.; Segovia, J.F.O.; Gonçalves, M.C.A.; Oliveira, V.L.; Silveira, D.; Carvalho, J.C.T.; Kanzaki, L.I.B. Amazonian plant crude extract screening for activity against multidrug-resistant bacteria. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **2008**, *12*, 369–380.
55. Silva, H.H.G.; Geris, R.; Rodrigues-Filho, E.; Rocha, C.; Silva, I.G. Larvicidal activity of oil-resin fractions from the Brazilian medicinal plant *Copaifera reticulata* Ducke (Leguminosae-Caesalpinioideae) against *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **2007**, *40*, 264–267.
56. Silva, I.G.; Zanon, V.O.M.; Silva, H.H.G. Larvicidal activity of *Copaifera reticulata* Ducke oil-resin against *Culex quinquefasciatus* say (Diptera: Culicidae). *Neotrop. Entomol.* **2003**, *32*, 729–732.
57. Seo, S.M.; Kim, J.; Lee, S.G.; Hoonshin, C.H.; Shin, S.C.; Park, I.K. Fumigant antitermitic activity of plant essential oils and components from ajowan (*Trachyspermum ammi*), allspice (*Pimenta dioica*), caraway (*Carum carvi*), dill (*Anethum graveolens*), geranium (*Pelargonium graveolens*), and litsea (*Litsea cubeba*) oils against Japanese termite (*Reticulitermes speratus* Kolbe). *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 6596–6602.
58. Fernandes, F.F.; Freitas, E.P.S. Acaricidal activity of an oleoresinous extract from *Copaifera reticulata* (Leguminosae: Caesalpinioideae) against larvae of the southern cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Vet. Parasitol.* **2007**, *147*, 150–154.
59. Sachetti, C.G.; Carvalho, R.R.; Paumgarten, F.J.R.; Lameira, O.A.; Caldas, E.D. Developmental toxicity of copaiba tree (*Copaifera reticulata* Ducke, Fabaceae) oleoresin in rat. *Food Chem. Toxicol.* **2011**, *49*, 1080–1085.
60. Sachetti, C.G.; Fascineli, M.L.; Sampaio, J.A.; Lameira, O.A.; Caldas, E.D. Avaliação da toxicidade aguda e potencial neurotóxico do óleo-resina de copaíba (*Copaifera reticulata* Ducke, Fabaceae). *Braz. J. Pharmacog.* **2009**, *19*, 937–941.



61. Santos, A.O.; Ueda-Nakamura, T.; Dias Filho, B.P.; Veiga-Junior, V.F.; Nakamura, C.V. Copaiba oil: An alternative to development of new drugs against leishmaniasis. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* **2012**, *2012*, 1–7.
62. Brito, N.M.B.; Simões, M.J.; Pessoa, A.F.; Melo, M.C.F. Efeitos do óleo de copaíba na cicatrização de feridas cutâneas abertas de ratos. *Rev. Para. Med.* **1998**, *12*, 28–32.
63. Brito, N.M.B.; Simões, M.J.; Gomes, P.O.; Pessoa, A.F.; Melo, M.C.F. Aspecto microscópicos da cicatrização de feridas cutâneas abertas tratadas com óleo de copaíba em ratos. *Rev. Para. Med.* **1999**, *13*, 12–17.
64. Curio, M.; Jacone, H.; Perrut, J.; Pinto, A.C.; Veiga-Filho, V.F.; Silva, R.C.B. Acute effect of *Copaifera reticulata* Ducke copaiba oil in rats tested in the elevated plus-maze: An ethological analysis. *J. Pharm. Pharmacol.* **2009**, *61*, 1105–1110.
65. Basile, A.C.; Sertie, J.A.A.; Freitas, P.C.D.; Zanini, A.C. Anti-inflammatory activity of oleoresin from Brazilian *copaifera*. *J. Ethnopharmacol.* **1988**, *22*, 101–109.
66. Veiga, V.F., Jr.; Zunino, L.; Calixto, J.B.; Patitucci, M.L.; Pinto, A.C. Phytochemical and antioedematogenic studies of commercial copaiba oils available in Brazil. *Phytother. Res.* **2001**, *15*, 476–480.
67. Oliveira, R.V.M.; Ohara, M.T.; Vila, M.M.D.C.; Gonçalves, M.M. *In vitro* evaluation of copaiba oil as a kojic acid skin enhancer. *Braz. J. Pharm. Sci.* **2010**, *46*, 363–370.
68. Ribas, J.; Carreño, A.M. Avaliação do uso de repelentes contra picada de mosquitos em militares na Bacia Amazônica. *An. Bras. Dermatol.* **2010**, *85*, 33–38.
69. Kanis, L.A.; Prophiro, J.S.; Vieira, E.S.; Nascimento, M.P.; Zepon, K.M.; Kulkamp-Guerreiro, I.C.; Silva, O.S. Larvicida activity of *Copaifera* spp. (Leguminosae) oleoresin microcapsules against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae. *Parasitol. Res.* **2012**, *110*, 1173–1178.
70. Prophiro, J.S.; Silva, M.A.N.; Kanis, L.; Silva, B.M.; Duque-Luna, J.E.; Silva, O.S. Evaluation of time toxicity, residual effect, and growth-inhibiting property of *Carapa guianensis* and *Copaifera* sp. in *Aedes aegypti*. *Parasitol. Res.* **2012**, *110*, 713–719.
71. Prophiro, J.S.; Silva, M.A.N.; Kanis, L.; Rocha, L.C.B.P.; Duque-Luna, J.E.; Silva, O.S. First report on susceptibility of wild *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) using *Carapa guianensis* (Meliaceae) and *Copaifera* spp. (Leguminosae). *Parasitol. Res.* **2012**, *110*, 699–705.
72. Gobbo-Neto, L.; Lopes, N.P. Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Quim. Nova* **2007**, *30*, 374–381.
73. Lameira, O.S.; Martins-da-Silva, R.C.V.; Zoghbi, M.G.B.; Oliveira, E.C.P. Seasonal variation in the volatiles of *Copaifera duckei* Dwyer growing wild in the state of Pará – Brazil. *J. Essent. Oil Res.* **2009**, *21*, 105–107.
74. Zoghbi, M.G.B.; Martins-da-Silva, R.C.V.; Trigo, J.R. Volatiles of oleoresins of *Copaifera paupera* (Herzog) Dwyer, *C. piresii* Dwyer and *C. pubiflora* Benth. (Leguminosae). *J. Essent. Oil Res.* **2009**, *21*, 403–404.
75. Zoghbi, M.G.B.; Andrade, E.H.A.; Martins-da-Silva, R.C.V.; Trigo, J.R. Chemical variation in the volatiles of *Copaifera reticulata* Ducke (Leguminosae) growing wild in the states of Pará and Amapá, Brazil. *J. Essent. Oil Res.* **2009**, *21*, 501–503.
76. Herrero-Jáuregui, C.; Casado, M.A.; Zoghbi, M.G.B.; Martins-da-Silva, R.C.V. Chemical variability of *Copaifera reticulata* Ducke oleoresin. *Chem. Biodivers.* **2011**, *8*, 674–685.

77. Gramosa, N.V.; Silveira, E.R. Volatiles constituents of *Copaifera langsdorffii* from the Brazilian Northeast. *J. Essent. Oil Res.* **2005**, *17*, 130–132.
78. Zoghbi, M.G.B.; Lameira, O.S.; Oliveira, E.C.P. Seasonal variation of oleoresin and volatiles from *Copaifera martii* Hayne growing wild in the state of Pará, Brazil. *J. Essent. Oil Res.* **2007**, *19*, 504–506.
79. Cascon, V.; Gilbert, B. Characterization of the chemical composition of oleoresins of *Copaifera guianensis* Desf., *Copaifera duckei* Dwyer and *Copaifera multijuga* Hayne. *Phytochemistry* **2000**, *55*, 773–778.
80. Gramosa, N.V. Estudo Químico-Farmacológico de *Copaifera langsdorffii* Desf. Doctoral Thesis in Chemistry. Federal University of Ceará, Ceará, Brasil, 2001.
81. Gramosa, N.V.; Silveira, E.R.; Cavalcanti, B.C.; Ferreira, J.R.O.; Almeida, F.S.; Rao, V.S.; Costa-Lotufu, L.V.; Odorico-de-Moraes, M.; Pessoa, C. Chemistry and pharmacology of *Copaifera langsdorffii* Desf.: An overview. *Rec. Prog. Med. Plants* **2010**, *27*, 235–260.
82. Pinto, A.C.; Braga, W.F.; Rezende, C.M.; Garrido, F.M.S.; Veiga, V.F., Jr.; Bergter, L.; Patitucci, M.L.; Antunes, O.A.C. Separation of Acid Diterpenes of *Copaifera cearensis* Huber ex ducke by flash chromatography using potassium hydroxide impregnated silica gel. *J. Braz. Chem. Soc.* **2000**, *11*, 355–360.
83. Spanevello, R.O.; Vila, A.J. 7- $\alpha$ -acetoxyhardwickiic acid: A furanoid clerodane. *Phytochemistry* **1994**, *35*, 537–538.
84. Monti, H.; Tiliacos, N.; Faure, R. Two diterpenoids from copaiba oil. *Phytochemistry* **1996**, *42*, 1653–1656.
85. Mahajan, J.R.; Ferreira, G.A.L. New diterpenoids from copaiba oil. *An. Acad. Bras. Cienc.* **1971**, *43*, 611–613.
86. Tincusi, B.M.; Jiménez, I.A.; Bazzocchi, I.L.; Moujir, L.M.; Mamani, Z.A.; Barroso, J.P.; Ravelo, A.G.; Hernández, B.V. Antimicrobial terpenoids from the oleoresin of the peruvian medicinal plant *Copaifera paupera*. *Planta Med.* **2002**, *68*, 808–812.
87. Monti, H.; Tiliacos, N.; Faure, R. Copaiba oil: Isolation and characterization of a new diterpenoid with the dinorlabdane skeleton. *Phytochemistry* **1999**, *51*, 1013–1015.
88. Romero, A.L.; Baptistella, L.H.B.; Imamura, P.M. Absolute configuration of some dinorlabdanes from the copaiba oil. *J. Braz. Chem. Soc.* **2009**, *20*, 1036–1040.
89. Sant'Anna, B.M.P.; Fontes, S.P.; Pinto, A.C.; Rezende, C.M. Characterization of woody odorant contributors in copaiba oil (*Copaifera multijuga* Hayne). *J. Braz. Chem. Soc.* **2007**, *18*, 984–989.
90. Tung, Y.T.; Chua, M.T.; Wang, S.Y.; Chang, S.T. Anti-inflammation activities of essential oil and its constituents from indigenous Cinnamon (*Cinnamomun osmophloeum*) twigs. *Bioresour. Technol.* **2008**, *99*, 3908–3913.
91. Chavan, M.J.; Wakte, P.S.; Shinde, D.B. Analgesic and anti-inflammatory activity of caryophyllene oxide from *Annona squamosa* L. bark. *Phytomedicine* **2010**, *17*, 149–151.
92. Rodilla, J.M.; Tinoco, M.T.; Morais, J.C.; Gimenez, C.; Cabrera, R.; Martín-Benito, D.; Castillo, L.; Gonzalez-Coloma, A. *Laurus novocanariensis* essential oil: Seasonal variation and valorization. *Biochem. Syst. Ecol.* **2008**, *36*, 167–176.
93. Omolo, M.O.; Okinyo, D.; Ndiege, I.O.; Lwande, W.L.; Hassanali, A. Repellency of essential oils of some Kenyan plants against *Anopheles gambiae*. *Phytochemistry* **2004**, *65*, 2797–2802.

94. Goren, A.C.; Piozzi, F.; Akcicek, E.; Kılıç, T.; Çarıklı, S.; Mozioglu, E.; Setzer, W.N. Essential oil composition of twenty-two *Stachys* species (mountain tea) and their biological activities. *Phytochem. Lett.* **2011**, *4*, 448–453.
95. Cheng, S.S.; Wu, C.L.; Chang, H.T.; Kao, Y.T.; Chang, S.T. Antitermitic and antifungal activities of essential oil of *Calocedrus formosana* leaf and its composition. *J. Chem. Ecol.* **2004**, *30*, 1957–1967.
96. Ghelardini, C.; Galeotti, N.; Mannelli, L.D.C.; Mazzanti, G.; Bartolini, A. Local anaesthetic activity of  $\beta$ -caryophyllene. *Il Farmaco* **2001**, *56*, 387–389.
97. Silva, S.L.; Figueiredo, P.M.S.; Yano, T. Chemotherapeutic potential of the volatile oils from *Zanthoxylum rhoifolium* Lam leaves. *Eur. J. Pharmacol.* **2007**, *576*, 180–188.
98. Kubo, I.; Chaudhuri, S.K.; Kubo, Y.; Sanchez, Y.; Ogura, T.; Saito, T.; Ishikawa, H.; Haraguchi, H. Cytotoxic and antioxidative sesquiterpenoids from *Heterotheca imuloides*. *Planta Med.* **1996**, *62*, 427–430.
99. Zheng, G.Q.; Kenney, P.M.; Lam, L.K.T. Sesquiterpenes from clove (*Eugenia caryophyllata*) as potential anticarcinogenic agents. *J. Nat. Prod.* **1992**, *55*, 999–1003.
100. Di Sotto, A.; Mazzanti, G.; Carbone, F.; Hrelia, P.; Maffei, F. Inhibition by  $\beta$ -caryophyllene of ethyl methanesulfonate-induced clastogenicity in cultured human lymphocytes. *Mutat. Res.* **2010**, *699*, 23–28.
101. Legault, J.; Pichette, A. Potentiating effect of  $\beta$ -caryophyllene on anticancer activity of  $\alpha$ -humulene, isocaryophyllene and paclitaxel. *J. Pharm. Pharmacol.* **2007**, *59*, 1643–1647.
102. Loizzo, M.R.; Tundis, R.; Menichini, F.; Saab, A.M.; Statti, G.A.; Menichini, F. Antiproliferative effects of essential oils and their major constituents in human renal adenocarcinoma and amelanotic melanoma cells. *Cell Prolif.* **2008**, *41*, 1002–1012.
103. Shimizu, M.; Shogawa, H.; Matsuzawa, T.; Yonezawa, S.; Hayashi, T.; Arisawa, M.; Suzuki, S.; Yoshizaki, M.; Morita, N.; Ferro, E.; *et al.* Anti-inflammatory effects of paraguayan crude drug “Alhucema” (*Lavandula latifolia* Vill). *Chem. Pharm. Bull.* **1990**, *38*, 2283–2284.
104. Cho, J.Y.; Chang, H.J.; Lee, S.K.; Kim, H.J.; Hwang, J.K.; Chun, H.S. Amelioration of dextran sulfate sodium-induced colitis in mice by oral administration of  $\beta$ -caryophyllene, a sesquiterpene. *Life Sci.* **2007**, *80*, 932–939.
105. Fernandes, E.S.; Passos, G.F.; Medeiros, R.; Cunha, F.M.; Ferreira, J.; Campos, M.M.; Pianowski, L.F.; Calixto, J.B. Anti-inflammatory effects of compounds  $\alpha$ -humulene and (-)-*trans*-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. *Eur. J. Pharmacol.* **2007**, *569*, 228–236.
106. Passos, G.F.; Fernandes, E.S.; Cunha, F.M.; Ferreira, J.; Pianowski, L.F.; Campos, M.M.; Calixto, J.B. Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. *J. Ethnopharmacol.* **2007**, *110*, 323–333.
107. Rogério, A.P.; Andrade, E.L.; Leite, D.F.P.; Figueiredo, C.P.; Calixto, J.B. Preventive and therapeutic anti-inflammatory properties of the sesquiterpene  $\alpha$ -humulene in experimental airways allergic inflammation. *Brit. J. Pharmacol.* **2009**, *158*, 1074–1087.
108. Legault, J.; Dahl, W.; Debiton, E.; Pichette, A.; Madelmont, J.-C. Antitumor activity of balsam fir oil: Production of reactive oxygen species induced by  $\alpha$ -humulene as possible mechanism of action. *Planta Med.* **2003**, *69*, 402–407.

109. Kubo, I.; Muroi, H.; Himejima, M. Antimicrobial activity of green tea flavor components and their combination effects. *J. Agric. Food Chem.* **1992**, *40*, 245–248.
110. Pérez-López, A.; Cirio, A.T.; Rivas-Galindo, V.M.; Aranda, R.S.; Torres, N.W. Activity against *Streptococcus pneumoniae* of the essential oil and  $\delta$ -cadinene isolated from *Schinus molle* fruit. *J. Essent. Oil Res.* **2011**, *23*, 25–28.
111. He, K.; Zeng, L.; Shi, G.; Zhao, G.X.; Kozlowski, J.F.; McLaughlin, J.L. Bioactive compounds from *Taiwania cryptomerioides*. *J. Nat. Prod.* **1997**, *60*, 38–40.
112. Chang, S.T.; Wang, S.Y.; Wu, C.L.; Chen, P.F.; Kuo, Y.H. Comparison of the antifungal activity of cadinane skeletal sesquiterpenoids from *Taiwania* (*Taiwania cryptomerioides* Hayata) heartwood. *Holzforschung* **2000**, *54*, 241–245.
113. Tan, W.; Lu, J.J.; Huang, M.; Li, Y.; Chen, M.; Wu, G.; Gon, J.; Zhong, Z.G.; Xu, Z.; Dang, Y.; et al. Anti-cancer natural products isolated from chinese medicinal herbs. *Chin. Med.* **2011**, *6*, 27:1–27:15.
114. Liu, J.; Zhang, Y.; Qu, J.; Xu, L.; Hou, K.; Zhang, J.; Qu, X.; Liu, Y.  $\beta$ -Elemene-induced autophagy protects human gastric cancer cells from undergoing apoptosis. *BMC Cancer* **2011**, *11*, 183:1–183:10.
115. Wang, G.; Li, X.; Huang, F.; Zhao, J.; Ding, H.; Cunningham, C.; Coad, J.E.; Flynn, D.C.; Reed, E.; Li, Q.Q. Antitumor effect of  $\beta$ -Elemene in non-small-cell lung cancer cells is mediated via induction of cell cycle arrest and apoptotic cell death. *Cell. Mol. Life Sci.* **2005**, *62*, 881–893.
116. Tao, L.; Zhou, L.; Zheng, L.; Yao, M. Elemene displays anti-cancer ability on laryngeal cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2006**, *58*, 24–34.
117. Li, X.; Wang, G.; Zhao, J.; Ding, H.; Cunningham, C.; Chen, F.; Flynn, D.C.; Reed, E.; Li, Q.Q. Antiproliferative effect of  $\beta$ -elemene in chemoresistant ovarian carcinoma cells is mediated through arrest of the cell cycle at the G2-M phase. *Cell. Mol. Life Sci.* **2005**, *62*, 894–904.
118. Zhao, Y.S.; Zhu, T.Z.; Chen, Y.W.; Yao, Y.Q.; Wu, C.M.; Wei, Z.Q.; Wang, W.; Xu, Y.H.  $\beta$ -Elemene inhibits Hsp90/Raf-1 molecular complex inducing apoptosis of glioblastoma cells. *J. Neurooncol.* **2011**, *107*, 307–314.
119. Li, Q.Q.; Wang, G.; Huang, F.; Banda, M.; Reed, E. Antineoplastic effect of  $\beta$ -elemene on prostate cancer cells and other types of solid tumour cells. *J. Pharm. Pharmacol.* **2010**, *62*, 1018–1027.
120. Zou, L.; Liu, W.; Yu, L.  $\beta$ -Elemene induces apoptosis of K562 leukemia cells. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* **2001**, *23*, 196–198.
121. Sun, Y.; Liu, G.; Zhang, Y.; Zhu, H.; Ren, Y.; Shen, Y.M. Synthesis and *in vitro* anti-proliferative activity of  $\beta$ -elemene monosubstituted derivatives in HeLa cells mediated through arrest of cell cycle at the G1 phase. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 1118–1124.
122. Yu, Z.; Wang, R.; Xu, L.; Dong, J.; Jing, Y. *N*-( $\beta$ -Elemene-13-yl)tryptophan methyl ester induces apoptosis in human leukemia cells and synergizes with arsenic trioxide through a hydrogen peroxide dependent pathway. *Cancer Lett.* **2008**, *269*, 165–173.
123. Li, L.J.; Zhong, L.F.; Jiang, L.P.; Geng, C.Y.; Zou, L.J.  $\beta$ -Elemene radiosensitizes lung cancer A549 cells by enhancing DNA damage and inhibiting DNA repair. *Phytother. Res.* **2011**, *25*, 1095–1097.
124. Nakano, T.; Djerassi, C. Terpenoids. XLVI. Copalic Acid. *J. Org. Chem.* **1961**, *26*, 167–173.

125. Souza, A.B.; Souza, M.G.M.; Moreira, M.A.; Moreira, M.R.; Furtado, N.A.J.C.; Martins, C.H.G.; Bastos, J.K.; Santos, R.A.; Heleno, V.C.G.; Ambrosio, S.R.; *et al.* Antimicrobial evaluation of diterpenes from *Copaifera langsdorffii* Oleoresin against periodontal anaerobic bacteria. *Molecules* **2011**, *16*, 9611–9619.
126. Souza, A.B.; Martins, C.H.G.; Souza, M.G.M.; Furtado, N.A.J.C.; Heleno, V.C.G.; Sousa, J.P.B.; Rocha, E.M.P.; Bastos, J.K.; Cunha, W.R.; Veneziani, R.C.S.; *et al.* Antimicrobial activity of terpenoids from *Copaifera langsdorffii* Desf. against cariogenic bacteria. *Phytother. Res.* **2011**, *25*, 215–220.
127. Veiga, V.F., Jr.; Patitucci, M.L.; Pinto, A.C. Controle de autenticidade de óleos de copaíba comerciais por cromatografia gasosa de alta resolução. *Quim. Nova* **1997**, *20*, 612–615.
128. Mechesneya, J.D.; Clark, A.M.; Silveira, E.R. Antimicrobial diterpenes of *Croton sonderzanus*, 1-Hardwickic and 3,4-secotrachylobanoic acids. *J. Nat. Prod.* **1991**, *54*, 1625–1633.
129. Kuete, V.; Wabo, G.F.; Ngameni, B.; Mbaveng, A.T.; Metuno, R.; Etoa, F.X.; Ngadjui, B.T.; Benga, V.P.; Meyer, J.J.M.; Lall, N. Antimicrobial activity of the methanolic extract, fractions and compounds from the stem bark of *Irvingia gabonensis* (Ixonanthaceae). *J. Ethnopharmacol.* **2007**, *114*, 54–60.
130. Kuete, V.; Franco, S.A.; Eyong, K.O.; Ngameni, B.; Folefoc, G.N.; Nguemeving, J.R.; Tangmouo, J.G.; Fotso, G.W.; Komguem, J.; Ouahouo, B.M.W.; *et al.* Antibacterial activity of some natural products against bacteria expressing a multidrug-resistant phenotype. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2011**, *37*, 156–161.
131. Ferrari, M.; Pagnoni, U.M.; Pelizzoni, F.; Ferreri, V.L.G. Leguminosae. Terpenoids from *copaifera langsdorffii*. *Phytochemistry* **1971**, *10*, 905–907.
132. Braga, W.F.; Rezende, C.M.; Antunes, O.A.C.; Pinto, A.C. Terpenoids from *Copaifera cearensis*. *Phytochemistry* **1998**, *49*, 263–264.
133. Veiga, V.F., Jr.; Pinto, A.C. A utilização do monitoramento seletivo de íons como ferramenta para a detecção de adulterações em óleos de copaíba. *Rev. Fitos* **2005**, *1*, 52–56.
134. Cunha, K.M.A.; Paiva L.A.; Santos, F.A.; Gramosa, N.V.; Silveira, E.R.; Rao, V.S. Smooth muscle relaxant effect of kaurenoic acid, a diterpene from *Copaifera langsdorffii* on rat uterus *in vitro*. *Phytother. Res.* **2003**, *17*, 320–324.
135. Paiva, L.A.F.; Gurgel, L.A.; Silva, R.M.; Tomé, A.R.; Gramosa, N.V.; Silveira, E.R.; Santos, F.A.; Rao, V.S.N. Anti-inflammatory effect of kaurenoic acid, a diterpene from *Copaifera langsdorffii* on acetic acid-induced colitis in rats. *Vascul. Pharmacol.* **2003**, *39*, 303–307.
136. Costa-Lotufo, L.V.; Cunha, G.M.A.; Farias, P.A.M.; Viana, G.S.B.; Cunha, K.M.A.; Pessoa, C.; Moraes, M.O.; Silveira, E.R.; Gramosa, N.V.; Rao, V.S.N. The cytotoxic and embryotoxic effects of kaurenoic acid, a diterpene isolated from *Copaifera langsdorffii* oleo-resin. *Toxicol.* **2002**, *40*, 1231–1234.
137. Vieira, H.S.; Takahashi, J.A.; Oliveira, A.B.; Chiari, E.; Boaventura, M.A.D. Novel derivatives of kaurenoic acid: Preparation and evaluation of their trypanocidal activity. *J. Braz. Chem. Soc.* **2002**, *13*, 151–157.

138. Cavalcanti, B.C.; Costa-Iotufo, L.V.; Moraes, M.O.; Burbano, R.R.; Silveira, E.R.; Cunha, K.M.A.; Rao, V.S.N.; Moura, D.J.; Rosa, R.M.; Henriques, J.A.P.; *et al.* Genotoxicity evaluation of kaurenoic acid, a bioactive diterpenoid present in Copaiba oil. *Food Chem. Toxicol.* **2006**, *44*, 388–392.
139. Tirapelli, C.R.; Ambrosio, S.R.; Costa, F.B.; Coutinho, S.T.; Oliveira, D.C.R.; Oliveira, A.M. Analysis of the mechanisms underlying the vasorelaxant action of kaurenoic acid in the isolated rat aorta. *Eur. J. Pharmacol.* **2004**, *492*, 233–241.
140. Souza, P.A.; Rangel, L.P.; Oigman, S.S.; Elias, M.M.; Ferreira-Pereira, A.; Lucasa, N.C.; Leitão, G.G. Isolation of two bioactive diterpenic acids from *Copaifera glycyarpa* oleoresin by high-speed counter-current chromatography. *Phytochem. Anal.* **2010**, *21*, 539–543.
141. Cotoras, M.; Folch, C.; Mendoza, L. Characterization of the antifungal activity on *Botrytis cinerea* of the natural diterpenoids kaurenoic acid and 3 $\beta$ -hydroxy-kaurenoic acid. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 2821–2826.
142. Geris, R.; Silva, I.G.; Silva, H.H.G.; Barison, A.; Rodrigues-Filho, E.; Ferreira, A.G. Diterpenoids from *Copaifera reticulata* Ducke with larvicidal activity against *Aedes aegypti* (L.) (Diptera, Culicidae) *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo* **2008**, *50*, 25–28.
143. Valotto, C.F.B.; Silva, H.H.G.; Cavaşin, G.; Geris, R.; Rodrigues-Filho, E.; Silva, I.G. Alterações ultraestruturais em larvas de *Aedes aegypti* submetidas ao diterpeno labdano, isolado de *Copaifera reticulata* (Leguminosae), e à uma fração rica em taninos de *Magonia pubescens* (Sapindaceae). *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **2011**, *44*, 194–200.
144. Ohsaki, A.; Lu, T.Y.; Ito, S.; Edatsugi, H.; Iwata, D.; Kmoda, Y. The isolation and *in vivo* potent antitumor activity of clerodane diterpenoid from the oleoresin of the Brazilian medicinal plant, *Copaifera langsdorffii* Desf. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, *4*, 2889–2892.