

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**Desenvolvimento tecnológico de nanoemulsões contendo Óleo de Copaíba
(*Copaifera multijuga* Hayne)**

DAIANE DE OLIVEIRA DIAS

PORTO ALEGRE, 2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Desenvolvimento tecnológico de nanoemulsões contendo Óleo de Copaíba
(*Copaifera multijuga* Hayne)**

Dissertação apresentada por **Daiane de
Oliveira Dias** para obtenção do GRAU
DE MESTRE em Ciências
Farmacêuticas.

Orientadora: Prof. Dra. Leticia Scherer Koester

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado – Produção e Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos – da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 29.03.2012 pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Elenara Maria Teixeira Lemos Senna
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Pedro Eduardo Fröhlich
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Ruy Carlos Ruver Beck
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

de Oliveira Dias, Daiane
Desenvolvimento tecnológico de nanoemulsões
contendo Óleo de Copaíba (Copaifera multijuga Hayne) /
Daiane de Oliveira Dias. -- 2012.
157 f.

Orientadora: Leticia Scherer Koester.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa
de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto
Alegre, BR-RS, 2012.

1. Óleo de Copaíba. 2. Nanoemulsões. 3.
Microextração em fase sólida. I. Scherer Koester,
Leticia, orient. II. Título.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Desenvolvimento Galênico (606) da Faculdade de Farmácia da UFRGS e no Laboratório de Toxicologia (605) da Faculdade de Farmácia da UFRGS, na cidade de Porto Alegre, com financiamento do CNPq. O autor recebeu bolsa de estudos do CNPq.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Vilson e Rosane, pela formação que me proporcionaram, pelo amor, exemplo, compreensão e apoio em todos os momentos. Aos meus irmãos Karine, André e Adriano, e a minha Cunhada Degiane pelo apoio incondicional, incentivo e compreensão.

À minha orientadora, Prof. Dra. Leticia Scherer Koester, pela oportunidade, profissionalismo, sabedoria e dedicação com que orientou esse trabalho.

Ao Prof. Dr. Valdir Florêncio da Veiga Júnior pela doação de matéria-prima e colaboração no trabalho.

À Prof. Renata Pereira Limberger e aos colegas do Laboratório de Tóxicologia por terem cedido o espaço em seu laboratório para a realização deste trabalho.

À minha colega e amiga Regina Kelmann, por toda a contribuição e auxílio na realização deste trabalho, pelas incansáveis horas me ouvindo e pela disposição em sempre me ajudar e pela amizade.

À minha bolsista Mariana Colombo pela disponibilidade e dedicação em todos os experimentos, pela amizade e companheirismo dentro e fora do laboratório.

Aos meus colegas do Laboratório de Desenvolvimento Galênico Juliana Bidone, Cristiane, Débora, Janice, Laura, Vinícius, Francini, Leandro, Samuel, Pedro, Simone, Vânia, Paula, Juliana Carini, Evelyn, Michelle, Fernanda, Renata, Liege, Luíza e Ueiler. Obrigada pelo companheirismo, amizade, risadas e pela ótima convivência desde a minha graduação.

Ao meu amigo Thiago Claudino, pelos ensinamentos durante minha iniciação científica e pela amizade. À minha amiga Mônica Duarte, pelo apoio, companheirismo e amizade. Mesmo estando longe, o seu auxílio sempre foi importante.

Ao CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, órgão financiador da bolsa de estudos recebida durante a realização deste trabalho.

A todos os meus amigos e familiares, obrigada por tudo.

RESUMO

O óleo de copaíba (OC) é amplamente empregado na medicina popular como anti-inflamatório. É extraído de árvores do gênero *Copaifera*, encontradas principalmente na região amazônica e no Cerrado brasileiro. Estudos têm mostrado que a atividade anti-inflamatória pode ser atribuída ao alto conteúdo de β -cariofileno, sesquiterpeno encontrado especialmente na espécie *Copaifera multijuga* Hayne. A baixa hidrossolubilidade do OC dificulta a sua incorporação em formas farmacêuticas de uso tópico. Neste contexto, as nanoemulsões aparecem como potencial sistema para administração tópica deste óleo. Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar a viabilidade de veiculação do OC nesses sistemas. Primeiramente, duas diferentes formulações foram preparadas, por homogeneização à alta pressão, e avaliadas quanto às suas propriedades físico-químicas e teor de β -cariofileno. O doseamento do β -cariofileno foi validado por HS-SPME-GC, onde as condições de extração foram otimizadas por um planejamento fatorial Box–Behnken 3^3 . Posteriormente, realizou-se um estudo de formulação utilizando planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} , onde foram avaliados o efeito da composição do núcleo oleoso e tensoativos sobre as propriedades físico-químicas das nanoemulsões produzidas pelos métodos de homogeneização à alta pressão e emulsificação espontânea. Também foi acompanhada a estabilidade das formulações durante 90 dias a 4 e 25 °C. Como resultado da otimização da extração de β -cariofileno obteve-se que os melhores níveis deste composto foram encontrados quando a extração foi feita sem adição de sal à temperatura de 45°C e após 20 minutos de exposição da fibra. O método de doseamento mostrou-se linear, preciso, exato e robusto. Observou-se também efeito parcialmente protetor das nanoemulsões sobre a degradação do β -cariofileno, no ensaio de degradação forçada realizado durante a validação. No que se refere ao estudo de formulação, o método de homogeneização à alta pressão mostrou ser mais adequado para a produção nanoemulsões com OC. A nanoemulsão que apresentou as melhores características foi aquela que continha 20% de OC, 10% de TCM, 3% Span 80[®] e 1% Tween 20[®]. Todas as formulações mantiveram-se estáveis a 4 °C durante 90 dias. O uso de TCM provou ser uma boa estratégia para fixar a fração volátil do óleo de copaíba em nanoemulsões.

Palavras-chave: óleo de copaíba, nanoemulsões, microextração em fase sólida

ABSTRACT

Copaiba oil (CO) has been widely employed in popular medicine because of its anti-inflammatory properties. The oil is extracted from trees of the genus *Copaifera*, which are found mainly in Brazilian regions of the Cerrado and Amazonian. Studies have shown that such anti-inflammatory activity is due to high contents of β -caryophyllene, the sesquiterpene found largely in *Copaifera multijuga* Hayne specie. As incorporation of CO into topical dosage forms is difficult due to its low hydrosolubility, nanoemulsions are a potential system for topical administration of the oil. Therefore, we aimed to study the feasibility of incorporating CO into nanoemulsions. Firstly, two different formulations were prepared by high-pressure homogenization method and then their physical-chemical properties and β -caryophyllene content were evaluated. The assay of β -caryophyllene was validated by HS-SPME-GC and extraction parameters were optimized by 3^3 Box–Behnken factorial design. A study was conducted by 2^{4-1} Fractional Factorial Design to evaluate the effects of oil core and surfactants composition on physical-chemical properties of nanoemulsions produced by high-pressure homogenization and spontaneous emulsification methods. We also evaluated the stability of formulations stored for 90 days at 4 °C and 25 °C. After optimization of β -caryophyllene extraction, higher levels of this compound were achieved when extraction was conducted without addition of salt at a temperature of 45°C and after 20 minutes of fiber exposition. The developed assay method has proven to be linear, precise, accurate and robust. The degradation process of β -caryophyllene was partly held back because of a protector effect of the nanoemulsion system. With respect to the formulation study, high-pressure homogenization method was shown to be the most efficient technique for obtaining CO nanoemulsions. The most suitable nanoemulsion composition was achieved by addition of 20% CO, 10% TCM, 3% Span 80[®] and 1% Tween 20[®]. Formulations showed lesser instability when stored at 4°C for 90 days. The use of TCM has proven to be a good strategy to fix volatile fractions of CO incorporated into nanoemulsions.

Keywords: copaiba oil, nanoemulsion, solid-phase microextraction

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1.	Árvores do gênero <i>Copaifera</i> spp.	15
Figura 2.	Estrutura química do β -cariofileno	17
Figura 3.	Representação do homogeneizador à alta pressão	29
Figura 4.	Dispositivo manual de SPME	34
Figura 5.	Principais modos empregados na microextração em fase sólida: extração direta (a) e extração via <i>headspace</i> (b)	35

CAPÍTULO II

Figura 1.	Chemical structure of β -caryophyllene	71
Figura 2.	Contour plot for the area of β -caryophyllene obtained by plotting: (A) the fiber exposure time versus temperature of extraction; (B) extraction temperature versus salt concentration, and (C) fiber exposure time versus NaCl concentration	81
Figura 3.	Chromatograms of (I) β -caryophyllene standard solution (II) Emulsion # 1 and (III) Emulsion # 2 submitted to: a) no stress condition, b) NaOH 1 M, c) 60 °C, d) 30 % H ₂ O ₂ , e) 48 h exposed to UV-A irradiation and f) HCl 1 M	85

CAPÍTULO III

Figura 1.	Influence of factors on the zeta potential (a), droplets size (b), polydispersity index (c) and β -caryophyllene contents (d) in the nanoemulsions produced by high-pressure homogenization	112
Figura 2.	Influence of factors on the zeta potential (a), droplets size (b), polydispersity index (c) and β -caryophyllene contents (d) in the nanoemulsions produced by spontaneous emulsification	112

Figura 3.	Significant interactions between A-C (a) and B-D (b) to zeta potential in the nanoemulsions produced by spontaneous emulsification	114
Figura 4.	Significant interactions between A-D (a) and B-D (b) to particle size in the nanoemulsions produced by high-pressure homogenization	116
Figura 5.	Significant interactions between A-B (a), A-D (b), B-C (c) and C-D (d) to β -caryophyllene content in the nanoemulsions produced by high-pressure homogenization	119
Figura 6.	Significant interactions between A-D (a) and B-C (b) to β -caryophyllene content in the nanoemulsions produced by spontaneous emulsification	120
Figura 7.	Transmission electron photomicrograph at 100K of the nanoemulsions VII and VIII produced by spontaneous emulsification (a and b) high-pressure homogenization (c and d)..	121

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Principais características das fibras utilizadas em SPME	36
--	----

CAPÍTULO II

Tabela 1. Components identified in the oleoresin of Copaiba oil (<i>Copaifera multijuga</i> Hayne).....	74
Tabela 2. Factor levels evaluated	77
Tabela 3. Main factors and interactions in the experimental design for total area of β -caryophyllene	82
Tabela 4. Recovery of β -caryophyllene added to nanoemulsion	83
Tabela 3. Results from the robustness of the method	84

CAPÍTULO III

Tabela 1. 2_{IV}^{4-1} fractional factorial design matrix for preparation of nanoemulsions with copaiba oil	105
Tabela 2. Levels of the factors used in the 2_{IV}^{4-1} fractional factorial design for preparation of nanoemulsions with copaiba oil	105
Tabela 3. Experimental results expressed as mean \pm S.D. for zeta potential, particle size (Z_{ave}), polydispersity index (PDI) and β -caryophyllene content obtained by the methods of high-pressure homogenization and spontaneous emulsification	108
Tabela 4. Table 4: Estimated effects and coefficients of the regression models for the nanoemulsions produced by high-pressure homogenization	110
Tabela 5. Estimated effects and coefficients of the regression models for the nanoemulsions produced by spontaneous emulsification	111

Tabela 6.	Stability studies: Zeta potential of nanoemulsions produced by high-pressure homogenization and spontaneous emulsification, after 30,60 and 90 days of storage at 4 and 25 °C (mean ± SD, n = 3)	124
Tabela 7.	Stability studies: particle size of nanoemulsions produced by high-pressure homogenization and spontaneous emulsification, after 30,60 and 90 days of storage at 4 and 25 °C (mean ± SD, n = 3)	125
Tabela 8.	Stability studies: polydispersity index of nanoemulsions produced by high-pressure homogenization and spontaneous emulsification, after 30,60 and 90 days of storage at 4 and 25 °C (mean ± SD, n = 3)	126
Tabela 9.	Stability studies: β-caryophyllene content of nanoemulsions produced by high-pressure homogenization and spontaneous emulsification, after 30,60 and 90 days of storage at 4 and 25 °C (mean ± SD, n = 3)	127

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS	7
CAPÍTULO I – Revisão da Literatura	11
Terapia anti-inflamatória	13
Óleo de Copaíba	15
Nanoemulsões	23
Microextração em Fase Sólida – SPME	33
Planejamento fatorial	38
Referências	41
CAPÍTULO II – Optimisation of headspace solid-phase microextraction for analysis of β-caryophyllene in a nanoemulsion dosage form prepared with copaiba (<i>Copaifera multijuga</i> Hayne) oil	61
CAPÍTULO III – Nanoemulsions loaded with copaiba oil: screening of composition using fractional factorial design and evaluation of different preparation methods	93
CONCLUSÕES GERAIS	137

A utilização de plantas medicinais para fins terapêuticos é descrita desde os primórdios da civilização. O conhecimento popular sobre o uso e a eficácia das plantas contribuiu, de forma decisiva, para a divulgação de seus efeitos medicinais, tornando freqüente a sua utilização, apesar de, por vezes, não se conhecer completamente seus constituintes químicos (MACIEL, 2002). Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), estima-se que cerca de 80% da população mundial, especialmente nos países subdesenvolvidos ou considerados em desenvolvimento, utilizam este tipo de medicamento devido à falta de acesso aos medicamentos sintéticos (CALIXTO, 2000; VEIGA-JÚNIOR et al., 2005).

Um exemplo de planta medicinal muito difundida no Brasil é a *Copaifera*, cujo óleo conhecido popularmente como óleo de copaíba possui atividade anti-inflamatória comprovada (VEIGA-JÚNIOR et al., 2007; GOMES et al., 2010; KOBAYASHI et al., 2011), sendo muito utilizada na medicina popular (BRAGA et al., 1998; CASCON & GILBERT, 2000; PINTO et al., 2000).

Entretanto, o óleo de copaíba apresenta uma elevada lipofilicidade, o que dificulta sua permeação na pele. Assim, novas formas farmacêuticas que otimizem a sua administração e potencializem sua ação no tratamento localizado de processos inflamatórios, são estratégias que se fazem necessárias. Como exemplo, as nanoemulsões são um sistema potencial para administração tópica de diferentes fármacos (SHAKEEL et al., 2008). As nanoemulsões proporcionam aspecto sensorial agradável, alta capacidade de espalhabilidade e hidratação, além de poderem facilitar a penetração de ativos (TADROS et al., 2004; SONNEVILLE-AUBRUN et al., 2004).

A incorporação de compostos lipofílicos em nanoemulsões pode conduzir a um aumento na taxa de penetração dos mesmos através da pele, intensificando o efeito tópico. Esses sistemas agem como carreadores e liberadores de substâncias de hidrossolubilidade reduzida, que podem estar associadas às gotículas oleosas de tamanho nanométrico e/ou à interface do sistema (WASHINGTON, 1996; TROTTA et al., 2002; SONNEVILLE–AUBRUN et al., 2004). O aumento na taxa de penetração é

atribuído ao prolongamento do tempo de permanência nas camadas superiores da pele, à maior área de superfície de contato e à baixa tensão superficial das gotículas de óleo (KLANG & BENITA, 1998; BENITA, 1999; MATTOS, 2011).

As nanoemulsões podem ser obtidas por métodos de alta ou baixa energia de emulsificação (FERNANDEZ et al., 2004; TADROS et al., 2004). Os métodos que utilizam a alta energia de emulsificação, como a homogeneização à alta pressão, são baseados na geração de energia mecânica através de alta tensão de cisalhamento e permitem melhor controle e ampla escolha dos constituintes da formulação (FERNANDEZ et al., 2004; TADROS et al., 2004; LIU et al., 2006). Os métodos de baixa energia de emulsificação, como a emulsificação espontânea, utilizam-se das propriedades físico-químicas dos sistemas para a obtenção de emulsões com glóbulos de tamanho reduzido (TADROS et al., 2004; ALMEIDA et al., 2008; CAMARGO, 2008).

Levando-se em consideração as potencialidades dos sistemas nanoemulsionados na administração de substâncias de elevada lipofilicidade (TROTTA, 1996; KTISTIS & NIOPAS, 1998; ALVES et al., 2005; ALVES et al., 2006; SHAKEEL et al, 2007), o presente trabalho por objetivo investigar a veiculação do óleo de copaíba em nanoemulsões visando ao desenvolvimento de uma forma farmacêutica de uso tópico com ação anti-inflamatória.

Esta dissertação está estruturada em três capítulos como segue:

- O capítulo I trata da revisão da literatura acerca do tema da dissertação, resumindo os principais aspectos tratados ao longo do trabalho, quais sejam: terapia anti-inflamatória, óleo de copaíba, nanoemulsões, microextração em fase sólida e planejamentos fatoriais;

- O capítulo II apresenta os resultados experimentais relativos à otimização dos parâmetros de extração do β -cariofileno em nanoemulsões por microextração em fase sólida no modo *headspace* e a validação de um método indicativo de estabilidade por cromatografia gasosa acoplada a detector ionização de chama;

- O capítulo III apresenta o estudo de formulação, empregando-se planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} , em que o efeito da composição do núcleo oleoso, de tensoativo e co-tensoativo foi avaliado sobre as propriedades físico-químicas e a estabilidade das nanoemulsões produzidas por dois métodos distintos: homogenização à alta pressão e emulsificação espontânea.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Desenvolver nanoemulsões de uso tópico contendo óleo de copaíba e validar um método de doseamento do componente majoritário, β -cariofileno.

Objetivos Específicos

- Otimizar os parâmetros de extração do β -cariofileno por HS-SPME-CG;
- Desenvolver e validar um método analítico indicativo de estabilidade para doseamento do β -cariofileno em nanoemulsões contendo óleo de copaíba;
- Preparar nanoemulsões pelas técnicas de homogeneização à alta pressão e emulsificação espontânea empregando-se delineamento experimental;
- Caracterizar as nanoemulsões desenvolvidas e avaliar a influência de diferentes proporções de óleo, tensoativos e co-tensoativos sobre as características físicas, químicas e físico-químicas das formulações;
- Avaliar a estabilidade das formulações desenvolvidas.

CAPÍTULO I

Revisão

Terapia anti-inflamatória

A inflamação é caracterizada por uma resposta multifatorial essencial para a manutenção da homeostase celular diante de uma lesão tecidual ou infecção. Apresenta-se como um mecanismo de defesa do organismo, cujo objetivo é a eliminação da causa inicial da lesão celular, provocadas por patógenos ou por ação de agentes físicos. Dessa forma, o processo inflamatório pode ser definido como uma seqüência de eventos que ocorrem em resposta a estímulo nocivo, trauma ou infecção. Essa resposta envolve uma ação coordenada entre os mediadores da inflamação e as células inflamatórias (SACCA et al., 1997; WOO, 2000; BERNARDI 2009).

O processo inflamatório é desencadeado pela liberação de mediadores químicos originados nos tecidos lesados e nas células migratórias. Dentre os principais mediadores figuram a histamina, as proteases plasmáticas, os metabolitos do ácido araquidônico (prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos), o fator ativador de plaquetas, o óxido nítrico, os constituintes lisossômicos dos leucócitos e os radicais livres derivados do oxigênio (CALIXTO et al., 2000).

A busca de moléculas com atividade anti-inflamatória é um desafio para as indústrias, pois esta classe de medicamentos apresenta uma alta diversidade de uso como, por exemplo, hemorróidas, reumatismos, acne, lesões dérmicas, úlceras, entre outras (DARSHAN & DORESWAMY, 2004).

Dentre os anti-inflamatórios existentes no mercado, os mais usuais são os glicocorticóides e os anti-inflamatórios não-esteróides. Os glicocorticóides ainda são os principais agentes anti-inflamatórios empregados no tratamento de doenças inflamatórias cutâneas, devido aos seus efeitos sobre a resposta imune. Porém, o uso contínuo dos glicocorticóides é freqüentemente acompanhado de efeitos adversos severos e muitas vezes irreversíveis, incluindo a atrofia cutânea, telangiectasias, hipertricose, alterações no processo de cicatrização, Síndrome de Cushing, entre outros

(SCHOEPE et al., 2006; SCHÄCKE et al., 2002). Já os anti-inflamatórios não-esteróides (AINES), estão entre os mais usados de todos os fármacos. Atualmente há mais de cinquenta AINES diferentes no mercado global. Esses agentes proporcionam alívio sintomático de dor e artropatia crônica, como ocorre na osteoartrite e artrite reumatóide, em afecções inflamatórias mais agudas, como os traumas esportivos, fraturas, entorses e outras lesões das partes moles, entre outras. Ainda, como vários AINES estão à disposição para a venda livre, são freqüentemente usados sem prescrição para outros tipos de dores menores, podendo causar efeitos indesejados significativos, especialmente em idosos (RANG, 2007).

Mesmo com o arsenal de agentes anti-inflamatórios disponíveis, alguns fatores comprometem a adesão do paciente ao tratamento, como o esquema posológico, efeitos adversos indesejáveis, custo elevado do tratamento, entre outros (GOTTLIEB, 2005; LEUNG *et al.*, 2004). Além disso, alguns medicamentos não atingem a eficácia desejada ou comprometem a resposta imunológica, aumentando o risco a infecções (DISEPIO et al., 1999; FOX et al., 2006; RANG et al., 2007). Assim, tanto a academia quanto a indústria farmacêutica tem voltado sua atenção para as plantas medicinais, na busca de um agente efetivo no tratamento das doenças inflamatórias cutâneas e com efeitos adversos reduzidos.

A utilização de plantas medicinais para fins terapêuticos é descrita desde os primórdios da civilização. O conhecimento popular sobre o uso e a eficácia das plantas contribuiu, de forma decisiva, para a divulgação de seus efeitos medicinais, tornando freqüente a sua utilização, apesar de, por vezes, não se conhecer completamente seus constituintes químicos (MACIEL, 2002).

Em 2005, foi introduzido no mercado brasileiro o primeiro fitomedicamento com base tecnológica totalmente nacional, o Acheflan®, medicamento anti-inflamatório de uso tópico cujo princípio ativo é o α -humuleno, componente do óleo essencial extraído da *Cordia verbenacea*, planta utilizada pela medicina popular como anti-inflamatória,

anti-microbiana, anti-úlceras, anti-reumática e analgésica (CALIXTO 2005; NATÉRCIA, 2005).

Óleo de Copaíba

O óleo de copaíba é extraído de árvores do gênero *Copaifera* (figura 1), da família *Fabaceae*, subfamília *Caesalpinioideae*, que são encontradas facilmente nas Regiões Amazônica e Centro-oeste do Brasil (RAMOS 2006). Entre as espécies mais abundantes, destacam-se: *C. officinalis* L. (norte do Amazonas, Roraima, Colômbia, Venezuela e San Salvador), *C. guianensis* Desf. (Guianas), *C. reticulata* Ducke, *C. multijuga* Hayne (Amazônia), *C. confertiflora* Bth (Piauí), *C. langsdorffii* Desf. (Brasil, Argentina e Paraguai), *C. coriacea* Mart.(Bahia), *C. cearensis* Huber ex Ducke (Ceará) (VEIGA- JÚNIOR & PINTO, 2002).



Figura 1. Árvores do gênero *Copaifera* spp. (Fonte: Armazém Amazônico, 2012).

A designação correta para o óleo de copaíba é óleo-resina, por ser um exudato constituído por ácidos resinosos e compostos voláteis (VEIGA-JÚNIOR et al., 2001). É um óleo-resina transparente, de viscosidade variável, cuja coloração também pode

variar do amarelo ao marrom, sendo utilizado industrialmente em vernizes e lacas, na restauração de pinturas antigas, como fixador de odor em fragrâncias e como aromatizante em alimentos (VEIGA-JÚNIOR et al., 1997; VEIGA-JÚNIOR & PINTO, 2002). Também é chamado, erroneamente, de bálsamo de copaíba, pois não se trata de um bálsamo verdadeiro, por não conter derivados do ácido benzóico ou cinâmico (VEIGA-JÚNIOR et al., 2001).

Segundo relatos da literatura, acredita-se que o óleo de copaíba não seja um produto do metabolismo primário e sim secundário, mais especificamente, um produto de excreção ou desintoxicação que funciona como defesa da árvore contra animais, fungos e bactérias. Este óleo é encontrado em canais secretores localizados em todas as partes da árvore, tendo no tronco seu compartimento mais saliente (ALENCAR, 1982).

Para a retirada do óleo destas árvores já foram utilizados diferentes métodos, entre eles, alguns que levavam a morte imediata do vegetal (VEIGA Jr., 2002). Atualmente, a extração do óleo pela incisão de trado, a cerca de 1 m de altura da base da árvore, é a prática mais empregada. Após a coleta, o orifício é vedado com argila para impedir a infestação da árvore por fungos e cupins (ALENCAR, 1982). Esta prática garante também que, de um mesmo espécime, possa ser coletado óleo várias vezes ao ano, sem danos à espécie vegetal (LAWRENCE, 1980).

Fatores climáticos e a época do ano devem ser considerados no processo de extração do óleo-resina. A composição química das espécies de *Copaifera* pode apresentar diferenças quantitativas e qualitativas. A presença de substâncias químicas em uma determinada espécie pode estar atrelada a sua sazonalidade, variando em função de alguns fatores, tais como: temperatura, radiação solar e precipitação pluviométrica (CASCON & GILBERT, 2000; OLIVEIRA et al., 2006).

O óleo de copaíba é constituído por misturas de sesquiterpenos e diterpenos. A composição destes componentes pode variar entre espécies ou mesmo interespecies

(ARRHENIUS et al., 1983; MONTI et al., 1996 e 1999; BRAGA et al., 1998; CASCON & GILBERT, 2000). O sesquiterpeno β -cariofileno (figura 2) é o principal componente da fração volátil deste óleo-resina e é encontrado na grande maioria dos óleos essenciais, especialmente no óleo de cravo, porém o óleo-resina de copaíba é a maior fonte natural conhecida deste composto (CARVALHO 2004).

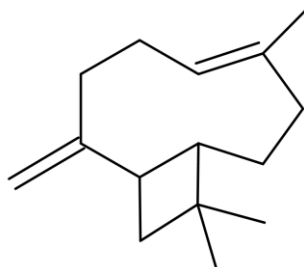


Figura 2. Estrutura química do β -cariofileno.

Vários relatos têm demonstrado que a atividade biológica do óleo de copaíba pode ser explicada pela natureza complexa da mistura de sesquiterpenos e diterpenos, resultando em um efeito sinérgico (CASCON & GILBERT, 2000; FERNANDES & FREITAS, 2007). Lima e colaboradores (2003) relataram que as frações obtidas do óleo-resina são menos ativas que o do óleo de copaíba bruto.

O óleo de copaíba que chega ao mercado 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*. A comercialização do óleo-resina sem controle de qualidade pode facilitar possíveis adulterações no óleo (VEIGA-JÚNIOR et al., 1997). É possível encontrar adição de água e gordura animal, ou impurezas como cascas, cinzas e terra, que afetam a aparência e o conteúdo do produto, ou ainda alterações causadas pela armazenagem em recipientes plásticos ou exposição à luz solar (ROMERO, 2007).

A análise por cromatografia em fase gasosa de alta resolução mostrou que o óleo-resina apresenta duas regiões bem definidas cromatograficamente: uma referente à região dos sesquiterpenos e outra à dos diterpenos (PATITUCCI, 1995). Esta metodologia permitiu avaliar o perfil de diferentes amostras de óleos de copaíba e

constatar adulterações, além de supor misturas de óleos de diferentes espécies, mostrando ser uma técnica eficaz no controle da autenticidade desta oleorresina (VEIGA-JÚNIOR. et al., 1997). Alguns trabalhos analíticos recentes têm sido realizados buscando a padronização desta matéria-prima, apesar de suas variações naturais, sendo que a cromatografia gasosa é a técnica mais empregada (VEIGA-JÚNIOR et al., 1997; CASCON & GILBERT, 2000; TAPPIN et al., 2004; BIAVATTI et al., 2006).

Documentos históricos apontam os índios brasileiros como os pioneiros no uso medicinal do óleo de copaíba (SANTOS, 2008). Na medicina popular, especialmente na Amazônia brasileira, o óleo de copaíba é utilizado como anti-inflamatório (BRAGA et al., 1998; CASCON & GILBERT, 2000; PINTO et al., 2000), anti-séptico em feridas, eczemas, na psoríase e urticária (CASCON & GILBERT, 2000; PINTO et al., 2000), em afecções pulmonares (tosses e bronquites, gripes e resfriados) (PAIVA et al., 1998; VEIGA-JÚNIOR & PINTO, 2002), cicatrizante de pequenas irritações do couro cabeludo, disenteria, cistite e leucorréia (VEIGA-JÚNIOR & PINTO, 2002), como analgésico (PINTO et al., 2000), antiúlcera (PAIVA et al., 1998), e como antitumoral (OHSAKI et al., 1994).

Na literatura científica é descrito seu efeito antimicrobiano (MAZURELLA & SICURELLA, 1960; OPDYKE, 1976, COSTA-LOTUFO et al., 2002; TINCUSI et al., 2002; SOUZA et al., 2011; SANTOS et al., 2012), anti-helmíntico (PELLEGRINO, 1967; GILBERT et al., 1972), antitumoral (LIMA et al., 2003). Souza Jr. e colaboradores (2000) e Paiva e colaboradores (2004a) descreveram o efeito protetor do óleo-resina nas colites induzidas por ácido acético em ratos. Este último também descreve o efeito do óleo-resina de *C. langsdorffii* na atenuação de lesões intestinais (PAIVA et al. 2004b), sugerindo que o efeito protetor em ambos os estudos seja devido, em parte, às ações antioxidantes e lipoperoxidativas do óleo-resina.

Acredita-se que seu efeito antimicrobiano se deve principalmente aos componentes voláteis, que estão presentes no óleo-resina, uma vez que é bem descrito o efeito antimicrobiano destes compostos (MUROI & KUBO 1993; SHAFIN et al., 2002).

Santos e colaboradores (2008a) testaram a atividade antimicrobiana do óleo de diferentes espécies de *Copaifera*. As espécies de *C. officinalis* e *C. reticulata* exibiram boa atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas, incluindo cepas de SARM (*Staphylococcus aureus* resistente à meticilina). Por outro lado, todos os óleos testados foram inativos contra bactérias gram-negativas. O óleo de *C. duckei* teve atividade antimicrobiana contra as diversas cepas estudadas (CABRAL, 2008). O óleo-resina apresentou atividade bacteriostática e bactericida seletiva contra bactérias gram-positivas, mas também não foi efetivo contra as gram-negativas. Mendonça e Onofre (2007), utilizando a técnica de difusão em ágar, demonstraram a atividade antimicrobiana do óleo-resina de *C. multijuga* contra as cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, havendo a inibição do crescimento das bactérias avaliadas. O óleo desta mesma espécie também apresentou atividade antimicrobiana *in vitro* contra as cepas de fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* (*A. flavus* e *A. tamarii*) e da levedura *Candida parapsilosis*, apresentando halos de inibição maiores do que os do grupo controle (miconazol), caracterizando o óleo-resina de *C. multijuga* como potencial atividade antifúngica (DEUS et al., 2011).

O óleo-resina proveniente de diversas espécies de *Copaifera* exibe excelente atividade larvicida contra o vetor de *Aedes aegypti* de diferentes doenças, como a dengue e a febre amarela (SILVA et al., 2003; MENDONÇA et al., 2005; SILVA et al., 2007; GERIS et al., 2008; PROPHIRO et al. 2012). Os principais componentes químicos do óleo responsável pela morte das larvas dos mosquitos são os diterpenos (GERIS et al., 2008).

A utilização do óleo de copaíba no tratamento da leishmaniose também é citada em vários estudos etnofarmacológicos, sendo alguns fora do Brasil (GRENAND & MORETTI, 1987; FLEURY, 1997; MOREIRA et al., 2002; KVIST et al., 2006). Santos e colaboradores (2008b) realizaram um *screening* para a atividade anti-leishmaniose *in vitro* com o óleo proveniente de oito diferentes espécies de *Copaifera*. Todos os óleos apresentaram atividade contra as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* em diferentes níveis, sendo o de *Copaifera reticulata* o que apresentou a melhor

atividade. Em estudo *in vivo*, a administração do óleo de *C. martii* pela via oral em ratos infectados causou redução significativa da lesão de *L. amazonensis* quando comparados com o grupo controle. Nos testes de toxicidade e genotoxicidade, o óleo demonstrou não ter nenhum desses efeitos (SANTOS et al, 2011).

A ação cicatrizante do óleo de copaíba está bem descrita na literatura. Brito (1996) estudou os aspectos morfológicos e morfométricos do processo cicatricial de feridas cutâneas abertas em ratos tratadas com óleo de copaíba (*C. reticulata*) e observou aumento da crosta da lesão, do tecido de granulação e do número de vasos sanguíneos, com diminuição do número de fibras colágenas. O óleo de copaíba (*C. langsdorffii*) possui a capacidade de reduzir o tempo de reparação tecidual em feridas cutâneas em ratos (EURIDES et al., 1998; PAIVA et al., 2002) e reduz a formação de tecido de granulação (BASILE et al., 1998). Resultados similares foram descritos por Henriques e colaboradores (1990) em feridas pós-operatórias. Porém, até o momento, não foram encontrados estudos clínicos utilizando óleo de copaíba.

A atividade anti-inflamatória do óleo-resina é a mais difundida na medicina popular e investigada no meio científico. No estudo realizado por Fernandes e colaboradores (1992), foi demonstrado que o óleo-resina obtido de *Copaifera cearensis* Huber apresentou atividade anti-inflamatória maior do que suas substâncias isoladas (bisabolol, ácido copálico, éster metílico do ácido solidago). Basile e colaboradores (1998) mostraram, em modelo animal, a ação anti-inflamatória do óleo-resina de copaíba comercial, estimando a DL₅₀ em 3,79 mL/kg. Woisky (2001) avaliando diferentes amostras de óleo-resina e suas frações, volátil e resinosa, no edema de pata induzido por carragenina, nistatina ou miconazol, constatou a atividade anti-inflamatória da óleo-resina, não observando diferença significativa entre o óleo-resina e suas frações. Veiga-Júnior e colaboradores (2001) estudando a atividade anti-inflamatória do óleo de copaíba comercial proveniente de diversos locais do país mostraram que a fração rica em hidrocarbonetos apresentou melhores resultados, que a fração de álcoois sesquiterpênicos e ácidos diterpênicos, na redução do edema de pata induzido por bradicinina ou carragenina. Carvalho e colaboradores (2005) avaliaram a atividade

anti-inflamatória e analgésica tópica do óleo-resina de *C. duckei* Dwyer em ratos, obtendo resultados promissores.

É descrito que existem diferenças entre a atividade anti-inflamatória para as diferentes espécies de *Copaiferas*. Veiga-Júnior e colaboradores (2007) avaliaram o efeito farmacológico do óleo-resina provenientes de *C. multijuga*, *C. reticulata* e *C. cearensis* *in vitro* pela medida da produção de óxido nítrico por macrófagos murinos, e *in vivo* pelo modelo de pleurisia em ratos. O óleo de copaíba de *C. multijuga* (100 mg/kg) foi o que mostrou maior efeito anti-inflamatório, inibindo a produção de óxido nítrico e de pleurisma induzido por zymosan. O óleo proveniente desta espécie foi o que apresentou maior conteúdo de β -cariofileno, que tem sido descrito como um importante composto anti-inflamatório. Os óleos-resina de *C. reticulata* e *C. cearensis* *in vitro* também apresentaram esta atividade, mas em menor intensidade. O óleo de *C. multijuga* também demonstrou atividade antinociceptiva e anti-inflamatória, provavelmente mediada por receptores opióides e através da inibição de vias histaminérgicas e serotorinérgicas, respectivamente (GOMES et al., 2010). Em estudo recente, realizado por Kobayashi e colaboradores (2011), a avaliação farmacológica do óleo proveniente de *C. multijuga*, demonstrou atividade anti-inflamatória *in vitro* e *in vivo*, demonstrando a potencialidade do uso do óleo de copaíba na terapia anti-inflamatória.

Estudos toxicológicos mostram que a toxicidade oral aguda do óleo-resina parece ser baixa, e o LD₅₀ determinado em ratos e camundongos foi maior que 2000 mg/kg (GOMES et al., 2007; SACHETTI et al., 2009). Maistro e colaboradores (2005) não encontraram evidências de genotoxicidade para o óleo de *Copaifera duckei* no teste de micronúcleo com medula de rato. Ainda, o creme vaginal contendo 2,5% do óleo-resina desta mesma espécie mostrou ser seguro durante a gestação em ratos fêmeas (*Rattus norvegicus*) da raça Winstar (LIMA et al., 2011). Os resultados do estudo realizado por Sachetti e colaboradores (2011) indicam que o óleo-resina de *C. reticulata* não foi teratogênico em ratos, nas doses testadas. No entanto, o ácido kaurenóico (30 e 60 μ g/mL), um diterpeno encontrado em *C. langsdorffii*, mostrou atividade prejudicial ao

DNA em fibroblastos de hamster chinês (linhagem V79). O estudo realizado por Cunha e colaboradores (2003) demonstrou que o ácido kaurenóico tem efeito de relaxante uterino em ratos, o que aparentemente resulta em duas distintas ações: o bloqueio dos canais de cálcio e a abertura dos canais de ATP sensíveis a potássio.

A importância do óleo de copaíba se reflete também no seu número considerável de patentes, na sua grande maioria relacionada a fins cosméticos e de perfumaria (KOSE CORPORATION, 2001; KAO CORPORATION, 2002; LION CORPORATION, 2000; SHISEIDO CO. LTD., 1996; AVEDA CORPORATION, 2000; US425501805), algumas a produtos para repelência e sanitários (RIFUSE:KK, 2001; HAYASE; RIFUSE; SUZUKI, 2002; HAYASE; RIFUSE; DAIHO; SUZUKI, 2004). São poucas, entretanto, com fins na terapêutica (BEVERLY M. SPARLING, 1950; GEROLANO; GIMENES, 1986; ICHIMARU PHARCOS CO LTD. 1995; HARGER, 2002), dentre estas temos somente duas patentes nacionais (GEROLANO; GIMENES, 1986 e HARGER, 2002), o que demonstra a necessidade emergente de que as pesquisas realizadas no país, além de gerarem produção científica, que ainda é uma demanda nacional, também possam ser orientadas à produção de recursos e tecnologia.

Atualmente, o óleo de copaíba é comercializado no Brasil na forma de cápsulas (óleo-resina) ou como óleo puro para o uso como anti-inflamatório e anti-séptico (GOMES et al., 2007; SANTOS 2008). Em 2003, havia cem produtos com óleo de copaíba registrados como fitoterápicos no mercado brasileiro, entretanto, não foram encontrados dados mais recentes (ANVISA, 2012). Contudo, ainda não existem estudos na literatura a respeito do desenvolvimento de formas farmacêuticas de aplicação tópica contendo este óleo, que possa ser de interesse no tratamento anti-inflamatório.

Nanoemulsões

Durante muito tempo, a pele foi considerada como uma barreira impermeável, porém este conceito foi modificado e se reconheceram diferentes graus de permeabilidade (PRISTA et al., 1992). A pele e as mucosas têm sido freqüentemente estudadas como via de administração de fármacos, pois representam uma via atrativa e acessível para administração de substâncias em comparação às vias oral e parenteral, por apresentar mínimo efeito sistêmico (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999; GUTERRES et al., 2007).

A penetração cutânea de um fármaco não depende apenas de suas propriedades físico-químicas deste, mas também do seu comportamento junto ao veículo farmacêutico e da condição da pele (ANSEL et al., 2007).

As nanoemulsões têm sido consideradas como um potencial sistema para a administração tópica de diferentes fármacos (FRIEDMAN et al., 1995; PIEMI et al., 1999; ALVES et al., 2005; SHAKEEL et al., 2007; SHAQUIF et al., 2007). Esses sistemas podem ser definidos como uma dispersão nanométrica de gotículas oleosas em uma fase aquosa externa, estabilizada por um sistema tensoativo. Apresentam-se como líquidos de aspecto leitoso, reduzido diâmetro de gotícula e baixa viscosidade, sendo que as moléculas veiculadas encontram-se preferencialmente dispersas e/ou adsorvidas no núcleo oleoso da nanoestrutura (BENITA & LEVY, 1993; BENITA, 1998; BOUCHEMAL et al., 2004). Elas proporcionam aspecto sensorial agradável, alta capacidade de espalhabilidade e hidratação, além de poderem facilitar a penetração de ativos (TADROS et al., 2004; SONNEVILLE-AUBRUN et al., 2004).

Esses sistemas têm atraído considerável atenção nos últimos anos, sendo descritas como uma forma farmacêutica promissora para a incorporação de fármacos pobremente solúveis em meio aquoso (GUTIÉRRIEZ et al., 2008). A solubilização de moléculas de reduzida hidrossolubilidade em um núcleo oleoso disperso em uma fase

externa aquosa representa uma das grandes vantagens desse tipo de sistema. Além disso, alguns trabalhos têm demonstrado algumas vantagens desses sistemas no que se refere à redução de efeitos colaterais, aumento da biodisponibilidade, ou ainda, sobre a estabilidade de alguns fármacos veiculados, quando comparadas com formulações convencionais (FRIEDMAN et al., 1995; SCHWARZ et al., 1995; BENITA, 1998; PIEMI et al., 1999; YILMAZ e BORCHERT, 2006). As nanoemulsões têm sido utilizados durante anos para a veiculação de fármacos, dentre os quais podemos citar a penicilina G benzatina (SANTOS-MAGALHÃES, et al., 2000), nimesulida (ALVES et al., 2007), paclitaxel (KHANNAVILLI & PANCHAGNULA, 2007), aceclofenaco (SHAKELL et al., 2007), tetracaína (IZQUIERDO et al., 2007), carbamazepina (KELMANN et al., 2007), celecoxib (BABOOTA et al., 2007; SHAKEEL et al., 2008), talidomida (ARAÚJO et al., 2011), colchicina (SHEN et al., 2011), tamoxifeno (PATHAN & MALLIKARJUNA, 2011), clotrimazol (BORHADE et al., 2012).

As formas farmacêuticas obtidas a partir de nanoemulsões de uso tópico vêm mostrando potencial uso como carreadores e liberadores de compostos bioativos de reduzida hidrossolubilidade, visando tanto uma atividade sistêmica quanto uma atividade local (DUNCAN et al., 1990; FRIEDMAN et al., 1995; PIEMI et al., 1999; YILMAZ; BORCHERT, 2006; KELMANN et al., 2007). Essas formulações apresentam vantagens para aqueles fármacos pouco solúveis em água, visto que o reduzido diâmetro de gotícula permite um depósito uniforme na pele, e pela possibilidade de promover um aumento da permeação transdérmica (SONNEVILLE–AUBRUN et al., 2004; TADROS et al., 2004; RUKTANONCHAI et al., 2009; SILVA et al., 2009; MATTOS, 2011). A incorporação de compostos lipofílicos nas nanoemulsões pode conduzir a um aumento na taxa de penetração dos mesmos através da pele intensificando, assim, o efeito tópico, ou o núcleo pode exercer a função de reservatório de liberação nas camadas mais superficiais da pele (BARRY, 1987; CALDERILLA-FAJARDO et al., 2006; BENITA, 1998). Isso ocorre devido ao prolongamento do tempo de permanência nas camadas superiores da pele, à maior área de superfície de contato e pela baixa tensão superficial das gotículas de óleo (KLANG; BENITA, 1998; BENITA, 1999; MATTOS, 2011). Estas características proporcionam assim, a modulação da

barreira do estrato córneo, controlando a penetração cutânea; o aumento da interação do ativo com a pele e o aumento da estabilidade química do ativo (ALVES et al., 2007; FASOLO et al., 2007; FASOLO et al., 2009; JUNYAPRASERT et al., 2009).

O núcleo oleoso das nanoemulsões corresponde de 5 a 30% da composição final da formulação e o óleo a ser utilizado e a sua concentração depende da solubilidade do fármaco nestes componentes, propriedades físico-químicas desejadas e estabilidade das formulações (KLANG & BENITA, 1998). Os óleos de origem vegetal e semi-sintéticos, como os óleos de rícino, oliva, soja, gergelim, amendoim, triglicerídeos de cadeia média, são amplamente empregados no desenvolvimento de nanoemulsões (KLANG & BENITA, 1998). Óleos constituídos principalmente de triglicerídeos têm sido correntemente utilizados para compor a fase interna da nanoemulsão (PRIMO et al., 2008; ALVES et al., 2007; TEERANACHAIDEEKUL et al., 2007; HATZIANTONIOU et al., 2007; FRIEDMAN et al., 1995; BENITA, 1999; PIEMI, et al., 1999; CUNHA-JUNIOR et al., 2003; ALVES et al., 2005; PRIMO et al., 2006, MATTOS, 2011). Os triglicerídeos de cadeia média (TCM) são ésteres constituídos de três ácidos graxos, com 8 a 12 átomos de carbono, unidos ao glicerol, e dissolvem quantidades elevadas de compostos lipossolúveis. São aproximadamente 100 vezes mais solúveis em água do que os triglicerídeos de cadeia longa (TCL), sendo esses menos utilizados (MUCHTAR & BENITA, 1994). Esses óleos são considerados seguros para a via cutânea (TRAUL et al., 2000).

Outro fator de extrema importância no desenvolvimento de nanoemulsões é selecionar o tensoativo ou a mistura de tensoativos ótima para cada fase dispersa (OLIVEIRA, 2008). Preferencialmente escolhem-se os tensoativos hidrossolúveis para a estabilização da interfase óleo/água das nanoemulsões, já que necessitam menor energia para formar as nanoemulsões e dessa forma melhorar a estabilidade desses sistemas (KOMMURU et al., 2001). As lecitinas são tensoativos anfóteros de origem natural formadas por misturas de fosfolipídios extraídos da soja ou da gema de ovo, possuem a fosfatidilcolina como componente majoritário, e são empregadas para estabilização de nanoemulsões por serem atóxicos e biocompatíveis (BENITA, 1998;

KIBBE, 2000; HENNERÉ et al., 2009). Já os tensoativos não-iônicos, como o Span[®] e o Tween[®], são considerados superiores aos iônicos por que produzem emulsões estáveis e são menos tóxicos do que a maioria dos tensoativos iônicos (ACOSTA, 2008).

Além de ter potencial uso para a incorporação de fármacos de reduzida hidrossolubilidade (DUNCAN et al., 1990; FRIEDMAN et al., 1995; PIEMI et al., 1999; YILMAZ & BORCHERT, 2006), as nanoemulsões também estão sendo usadas para veicular óleos vegetais com atividades biológicas visando o uso tópico, onde o ativo é o próprio núcleo oleoso. O desenvolvimento destes sistemas utilizando óleos vegetais tem sido intensamente valorizado, devido às atividades benéficas que a complexa composição de ácidos graxos presentes nestes óleos podem exercer na pele e pelo conceito de que são seguros e biocompatíveis, fatores que reforçam a atual tendência de utilização de produtos naturais (BLOISE, 2003; CAMARGO, 2008)

Nanoemulsões utilizando o óleo essencial de capim limão (*Cymbopogon citratus*) como núcleo oleoso demonstrou melhor perfil de permeação que o óleo cru. Na avaliação do efeito anti-acne *in vitro*, os resultados obtidos para a nanoemulsão foi maior que o padrão clindamicina. Estes resultados sugerem que as nanoemulsões podem ser um veículo promissor para óleo de capim limão no tratamento da acne (FAIYAZUDDINA et al, 2009).

As nanoemulsões têm sido usadas para melhorar a atividade repelente e aumentar o tempo de proteção contra mosquitos *Aedes aegypti*. No estudo realizado por Sakulku e colaboradores (2009), a encapsulação do óleo de citronela (*Cymbopogon nardus*) em nanoemulsões permitiu modular a liberação do óleo nas formulações, aumentando o tempo de atividade repelente contra mosquitos *A. aegypti*. A atividade repelente contra esse mosquito também foi avaliada *in vitro* em nanoemulsões com o óleo de citronela, em combinação com o óleo de manjeriço (*Ocimum genus*) e vetiver (*Vetiveria zizanioides*), sendo a nanoemulsão que apresentou maior tempo de atividade repelente

contra *A. aegypti* (4,7 horas) foi composta de 10% de óleo de citronela (v/v), 5% de óleo de manjeriço (v/v) e 5% de óleo de vetiver (v/v) (NUCHUCHUA et al., 2009).

O óleo de melaleuca (*Melaleuca alternifolia*), empregado principalmente como antimicrobiano (CARSON et al., 2006), também tem sido usado para produzir nanoemulsões. Flores e colaboradores (2011) produziram nanoemulsões com o óleo de melaleuca com características físico-químicas adequadas para este tipo de sistema. Oliveira e colaboradores (2011) incorporaram nanoemulsões com o óleo de melaleuca em hidrogéis, aumentando a estabilidade das formulações e proporcionando um sistema mais adequado para o uso tópico.

O método de preparo de tais sistemas possui grande influência sobre as propriedades físico-químicas, e em especial, o diâmetro das gotículas das emulsões produzidas. Atualmente existem vários métodos de produção de nanoemulsão descritos na literatura, das quais podemos citar: a homogeneização a alta pressão e a microfluidização, que são métodos físicos capazes de conduzir à obtenção de emulsões monodispersas com reduzido diâmetro de partícula e em grande escala, mas que em algumas condições experimentais, causam aquecimento da amostra e requerem o emprego de equipamentos específicos; a sonicação, que possui facilidade na execução em escala laboratorial, mas acarreta na elevação da temperatura da amostra durante o processo, pode contaminar o produto com componentes da sonda e possui dificuldade na obtenção de emulsões monodispersas e na execução em escala industrial; e a técnica de emulsificação espontânea, que utiliza solventes orgânicos para a formação das nanogotículas, com posterior evaporação dos mesmos, visando à produção de volumes reduzidos de produto final e apresenta facilidade na execução em escala laboratorial, conduzindo a formação de sistemas monodispersos (ALMEIDA et al., 2008).

A homogeneização a alta pressão é um método físico que utiliza alta energia de emulsificação, baseado na geração de energia mecânica através de alta tensão de cisalhamento (BENITA 1999; ALMEIDA et al., 2008). O emprego deste método tem sido

descrito por diversos autores (JUMMA et al., 1998; SZNITOWSKA et al., 2002; FLOURY et al., 2004a e 2004b; LU et al., 2008; SINGH & VINGKAR, 2008; SAKULKU et al., 2009; NUCHUCHUA et al., 2009; BASPINAR et al., 2010; DONSI et al., 2011).

A preparação de nanoemulsões por esta técnica ocorre geralmente em duas etapas. Primeiramente, as fases aquosa e oleosa são preparadas separadamente, podendo ou não ser aquecidas e emulsionadas através do uso de homogeneizadores de alta velocidade (como o Ultraturrax[®]) ou outro equipamento similar. Assim, uma emulsão grosseira é obtida, apresentando um tamanho de gotícula micrométrica. Em uma segunda etapa, o diâmetro de gotícula da emulsão primária é progressivamente reduzido até valores submicrométricos, compreendidos entre 100 e 300 nm, através da utilização de homogeneizadores à alta pressão (JUMA & MULLER, 1998; RIEGER, 2001; BIVAS-BENITA et al., 2004; ALMEIDA et al., 2008).

No homogeneizador à alta pressão, a emulsão grosseira é forçada, sob alta pressão, através de um espaço anular entre uma válvula de ajuste (móvel) e o suporte da válvula (fixo), denominado “lacuna homogeneizadora”. Quando o produto entra na área entre a válvula e o suporte, há um rápido aumento na velocidade e correspondente aumento na pressão. A energia liberada causa turbulência e diferenças de pressão localizadas, que causam rompimento das gotículas. O produto homogeneizado choca-se ao anel de impacto e sai a uma pressão suficiente para mover-se ao próximo estágio de processamento (figura 3) (JAHNKE, 1998; FLOURY et al 2004a e 2004b; LU et al., 2008; ALMEIDA et al., 2008) . A otimização das condições, como pressão e número de ciclos de homogeneização, é geralmente determinada experimentalmente para cada sistema desenvolvido e tipo de equipamento utilizado (TEIXEIRA et al., 2002).

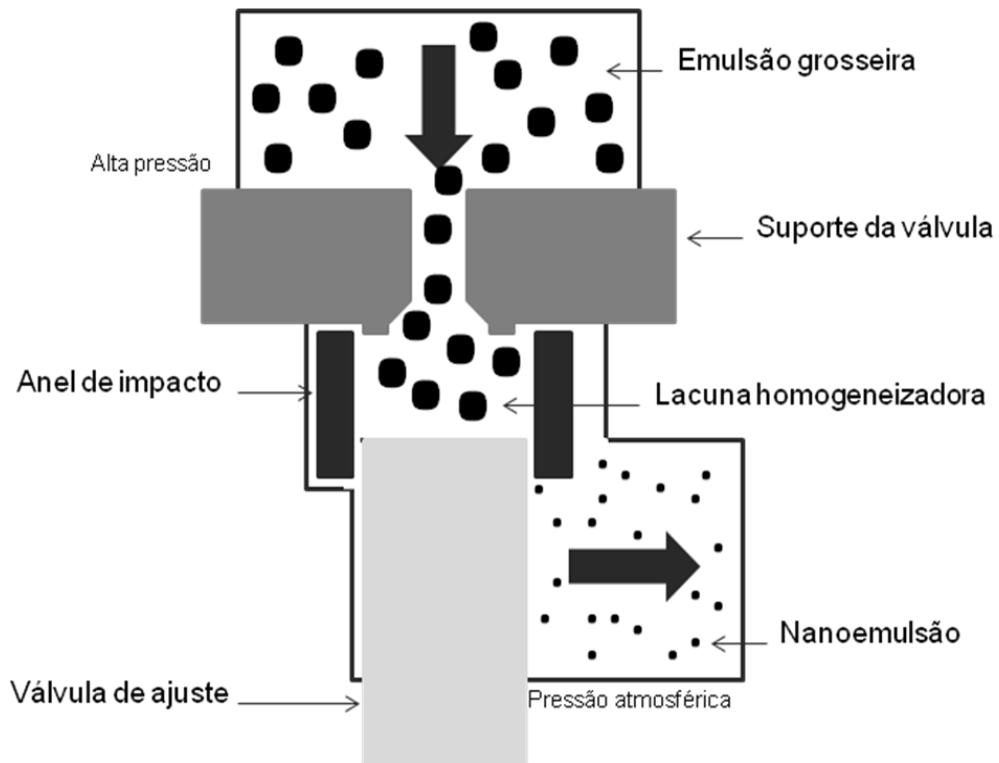


Figura 3. Representação do homogeneizador à alta pressão (Modificado de FLOURY et al., 2004b).

Outro método de muito utilizado para obtenção de nanoemulsões é a emulsificação espontânea (TABOSA DO EGITO et al., 1996; BOUCHEMNAL, 2004; MARTINI et al., 2007; KELMANN et al., 2007; KELMANN et al., 2008; ARAÚJO et al., 2011). Esta é uma técnica de fácil realização em escala laboratorial, não requer equipamentos sofisticados, não utiliza altas temperaturas e geralmente leva à formação de pequeno tamanho de gotícula na formulação, possibilitando preparar nanoemulsões com propriedades similares àquelas obtidas por métodos físicos (TABOSA DO EGITO et al., 1996; BOUCHEMNAL, 2004; MARTINI et al., 2007). Por esse método, a adição de uma solução solvente-óleo na fase aquosa resulta na emulsificação das nanogotículas da fase oleosa, devido a algum tipo de instabilidade interfacial, originada da rápida difusão do solvente através da interface diminuindo a tensão interfacial (BOUCHEMNAL et al., 2004; XU & LUO, 2007; ALMEIDA et al., 2008).

A técnica de emulsificação espontânea prevê a formação de uma emulsão quando uma fase orgânica e outra aquosa são misturadas. A fase orgânica, que consiste de uma solução homogênea de óleo e tensoativo lipofílico e uma mistura de solventes hidromiscíveis. A fase aquosa homogênea é formada por água e um tensoativo hidrofílico. Ambas as fases são submetidas à agitação magnética, com posterior adição lenta da fase orgânica sobre a aquosa, para permitir que o sistema atinja o equilíbrio. A emulsão óleo em água (O/A) é formada instantaneamente por difusão do solvente orgânico na fase externa aquosa levando à formação de nanogotículas. O solvente orgânico é removido por evaporação à pressão reduzida (TEIXEIRA et al., 2002; BOUCHEMAL et al. 2004). Esse procedimento apresenta como vantagem a possibilidade de preparação de pequenos volumes de amostra em baixas temperaturas, o que pode ter interesse para fármacos termolábeis (TEIXEIRA et al., 2002).

O tamanho e a distribuição das gotículas são fortemente afetados pela natureza do solvente usado durante o processo de emulsificação espontânea (BOUCHEMAL et al. 2004, MARTINI et al., 2007; KELMANN et al., 2007; KELMANN et al., 2008, ALMEIDA et al., 2008). Com isso, um aumento progressivo na quantidade de solvente orgânico resulta na diminuição do diâmetro das gotículas, o que pode ser atribuído a maior velocidade de difusão da fase orgânica em água, podendo ser relacionado com a menor concentração dos componentes da fase interna solubilizados na fase orgânica (MARTINI et al., 2007). A diminuição do diâmetro de gotícula, no entanto, só ocorre até certo ponto, após o qual provavelmente a difusão do solvente não seja mais influenciada pela concentração de soluto, sendo somente afetada pelas propriedades de difusão do solvente. Além desses, outros parâmetros, como a viscosidade do óleo, o tipo de tensoativo e a miscibilidade do solvente com a água, são importantes na determinação da qualidade da nanoemulsão final obtida através deste procedimento (BOUCHEMAL et al. 2004; ALMEIDA et al., 2008).

Após o preparo de uma emulsão ocorrem alterações que dependem do tempo e da temperatura de armazenagem e que levam a sua instabilidade, sendo esta

evidenciada pela cremagem, floculação e/ou coalescência (RIEGER, 2001; PRISTA et al., 2003).

A cremação acontece quando as gotículas da fase interna têm maior tendência a subir para a superfície ou sedimentar do que partículas individuais. Esse fenômeno, na ausência de coalescência, é um processo reversível. A floculação acontece quando os glóbulos se unem e o filme interfacial é mantido, ou seja, permanecem gotículas distintas. A coalescência acontece quando há união dos glóbulos e a ruptura da interface, formando um glóbulo maior. É um processo irreversível e quando um número grande de gotículas coalescem, o resultado é a separação das fases (ANSEL et al., 2007).

As nanoemulsões não são termodinamicamente estáveis e, como resultado, o tamanho das gotículas tende a aumentar com o tempo até a separação de fases (coalescência). Contudo, devido ao tamanho nanométrico da gotícula obtido inicialmente e da baixa polidispersão, elas podem ter uma longa estabilidade cinética, o que significa que as pequenas gotículas praticamente não aumentam o seu tamanho por um longo período possuindo estabilidade inerente (GUTIÉRRIEZ et al., 2008). O emprego de co-tensoativos contribui para a inerente estabilidade, pois conferem estabilização estérica entre as gotículas, reduzindo a possibilidade de coalescência, bem como pela superação da força da gravidade atuante nessas gotículas pelo movimento browniano, presente nesses sistemas, evitando assim processos de instabilidade (TADROS et al., 2004; FERNADEZ et al., 2004).

Dentre as características físico-químicas que precisam ser monitoradas nesse tipo de sistema, o tamanho de partícula é um dos parâmetros mais importantes, pois pode fornecer informações importantes a respeito da influência dos componentes da formulação sobre as características físico-químicas da mesma (BENITA & LEVY, 1993; KLANG & BENITA, 1998). Nanoemulsões visando à aplicação tópica devem apresentar tamanho de gotícula geralmente entre 100 a 300 nm, garantindo um contato próximo com o estrato córneo (SAKULKU et al., 2009; ALVES et al., 2007). Além disso, a

avaliação do diâmetro de partícula é fundamental nos estudos de estabilidade de emulsões, já que a medida do tamanho da gotícula após o preparo e durante o período de armazenamento fornece indicação sobre a estabilidade do sistema: quanto mais rápido as gotículas do sistema aumentam de tamanho, menor a estabilidade do sistema (ROLAND et al., 2003; CAMARGO 2008).

A técnica mais empregada para analisar o diâmetro médio de partícula é a espectroscopia de correlação de fótons (PCS), também conhecida como espalhamento de luz dinâmico. Técnicas complementares têm sido empregadas para avaliar a morfologia e o tamanho das gotículas, como a microscopia eletrônica de transmissão - MET (FRIEDMAN et al., 1995; HATZIANTONIOU et al., 2007; RUKTANONCHAI et al., 2009; ALVES et al., 2007).

O índice de polidispersão (IP) indica a distribuição das partículas e é analisado juntamente com o diâmetro médio de gotícula. Valores de IP menores que 0,3 indicam uma boa homogeneidade das gotículas na amostra, e geralmente em nanoemulsões de uso tópico o ideal é a distribuição apresentar-se de forma monodispersa, ou seja, com uma dispersão uniforme do diâmetro das nanopartículas (ALVES et al., 2007; VARGAS, 2010).

Os tensoativos estabilizam a interface da emulsão não apenas com a formação de uma barreira mecânica, mas também através da produção de um potencial elétrico de superfície, denominada potencial zeta, que tem a capacidade de produzir forças repulsivas entre as gotículas de óleo evitando a coalescência (BENITA & LEVY, 1993; FLOYD, 1999). O potencial zeta está diretamente relacionado à repulsão eletrostática entre as gotículas dispersas das nanoemulsões, demonstrando o potencial de superfície das mesmas (ROLAND et al., 2003). Esse parâmetro é consequência da natureza química das moléculas localizadas na interface das emulsões, freqüentemente originado pela dissociação de grupamentos químicos dos agentes tensoativos (NETZ & ORTEGA, 2002). Um elevado valor de potencial zeta em módulo (>30mV) é importante

para a estabilidade físico-química da emulsão, uma vez que forças repulsivas tendem a evitar uma possível floculação (KLANG & BENITA, 1998; ROLAND et al., 2003).

Microextração em Fase Sólida – SPME

A Microextração em Fase Sólida (do inglês, *Solid Phase MicroExtraction* – SPME) é uma técnica de extração que permite ser usada diretamente na amostra, sem a necessidade de concentração prévia. Ela se adapta perfeitamente à cromatografia, tanto gasosa quanto líquida (PAWLISZYN, 1997; GOMES 2003).

A SPME foi desenvolvida por Arthur e Pawliszyn (1990), com o objetivo de facilitar a rápida preparação de amostras, onde se propôs imergir fibras em soluções aquosas contendo os analitos teste, as quais eram dessorvidas no bloco aquecido do injetor do cromatógrafo gasoso logo a seguir. Desde então, as aplicações de SPME tem se estendido a matrizes ambientais, farmacêuticas, clínicas, forensicas, alimentícias e perfumes (STEFFEN & PAWLISZYN, 1996 ; ANDRADE et al., 2005; QUEIROZ & LANÇAS, 2005; VILLANUEVA et al., 2006; NUNES et al., 2006; SIMÕES et al., 2007; ÁVILA et al., 2007; SCIBETTA et al., 2007; WANG et al., 2008; CAPOBIANGO & CARDEAL, 2008; TSIMELI et al., 2008 ; SILVA et al., 2009; RODRÍGUEZ-BENCOMO et al., 2009 ; PATIL et al., 2010; KRANH et al., 2010; SOUZA et al., 2011).

O dispositivo manual de SPME é essencialmente uma seringa modificada contendo um êmbolo que permite a exposição e a retração da fibra, respectivamente, durante as etapas de exposição e dessorção. A fibra consiste de sílica fundida, recoberto com um fino filme de polimérico ou de um sólido adsorvente (figura 4) (VALENTE & AUGUSTO, 2000).

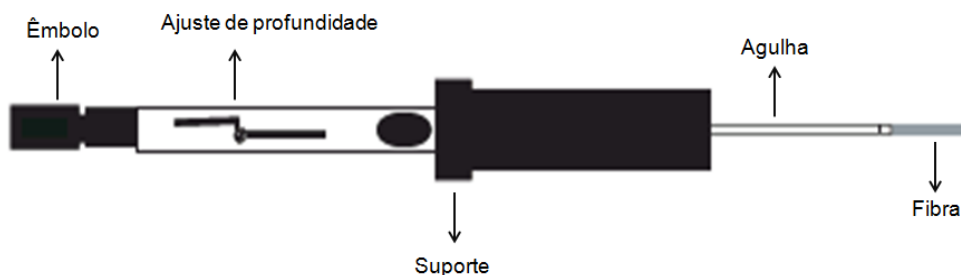


Figura 4. Dispositivo manual de SPME.

A SPME pode ser utilizada em três modos: por membrana, direta e *headspace*. Na amostragem por membrana, a fibra é inserida em uma membrana imersa na amostra; trata-se de um processo menos utilizado em SPME. Na amostragem direta, a fibra é inserida diretamente na matriz (amostra líquidas) e os analitos são sorvidos diretamente sobre o revestimento da fibra (figura 5a). No modo *headspace*, os analitos precisam ser transportados através da barreira de ar antes de alcançarem a fibra. Este modo é empregado para a análise de compostos de média e alta volatilidade de amostras gasosas, líquidas ou sólidas, conforme visto na figura 5b (ULRICH, 2000, MAGALHÃES, 2009). Comparado ao modo direto, essa amostragem protege mais a fibra de analitos de alto peso moleculares e interferentes não-voláteis, uma vez que a SPME não necessita de prévio tratamento da amostra (PAWLISZYN, 1997). Além disso, os tempos necessários para alcançar o equilíbrio no modo *headspace* são menores do que aqueles em modo direto em condições semelhantes de análise. Como os analitos voláteis e semi-voláteis se concentram mais no *headspace*, o transporte de massa será mais rápido, possibilitando extrações em menores tempos (ZHANG & PAWLISZYN, 1993; GOMES 2003).

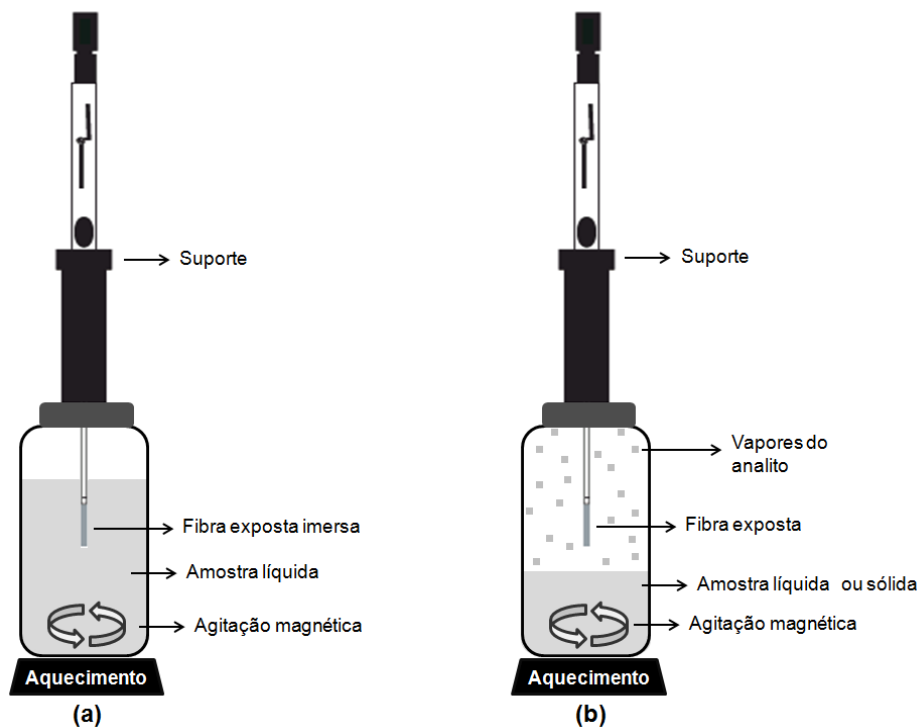


Figura 5. Principais modos empregados na microextração em fase sólida: extração direta (a) e extração via *headspace* (b).

Para a extração, a amostra é colocada dentro de um frasco apropriado, vedado com septos de teflon, que será perfurado pela agulha, seguido da exposição da fibra, sob agitação magnética. Então, as moléculas se deslocam na matriz e penetram no material de recobrimento da fibra, sendo estabelecido um equilíbrio de partição do analito entre a fibra e o meio que o envolve. Quando o equilíbrio é alcançado, a quantidade de composto extraído está diretamente relacionada à afinidade com a fase da fibra e sua concentração na amostra. Para a retirada do analito retido na fase extratora é necessária a etapa de dessorção, a qual deve ser otimizada durante o desenvolvimento do método e, dependendo da técnica analítica utilizada, pode ocorrer através da imersão da fibra em um solvente orgânico apropriado ou na própria fase móvel (no caso de cromatografia líquida) ou ainda empregando-se a temperatura (no caso de cromatografia gasosa) (LANÇAS, 2004; MATA et al., 2004; MAGALHÃES, 2009).

Entre os fatores que influenciam a eficiência do processo extrativo estão a escolha do filme polimérico da fibra mais apropriado ao analito que se deseja extrair e o tipo de matriz em que está contido. Por isso, o primeiro passo no desenvolvimento de um método por SPME é a seleção do tipo de fibra para a extração dos analitos (PAWLISZYN, 1997). A escolha do filme, bem como a sua espessura, é geralmente feita em uma etapa de otimização das condições de análise, tendo como base as características físico-químicas dos analitos e das fibras disponíveis. Se a fase polimérica for líquida há absorção do analito e se estabelece um equilíbrio de partição que é afetado pela espessura do filme polimérico e pelo tamanho do analito. Em fases poliméricas sólidas, a retenção do analito ocorre nos sítios ativos da fibra e o equilíbrio de adsorção que ocorre depende, principalmente, do tamanho dos poros (AUGUSTO, 2000; DAMASCENO, 2007; MENEZES, 2011). Atualmente, são comercializadas fibras com espessuras de fases, polaridades e composições variadas como mostra a Tabela 1.

Tabela 1. Principais características das fibras utilizadas em SPME (Fonte: MENEZES, 2011).

Composição da Fase	Polaridade	Processo	Espessura de Fase (μm)	Temperatura de dessorção ($^{\circ}\text{C}$)	Aplicação
Polidimetilsiloxana (PDMS)	Apolar	Absorção	100	200 - 270	Voláteis
			30	200 - 270	Semi-voláteis
			7	200 - 270	Semi-voláteis
Polidimetilsiloxana/ Divinilbenzeno (PDMS/DVB)	Polar	Adsorção	60	200 - 270	Voláteis
			65	200 - 270	Não-voláteis
Carboxen/ Polidimetilsiloxana (CAR/PDMS)	Polar	Adsorção	75	240 - 300	Voláteis
Carbowax/ Divinilbenzeno (CW/DVB)	Polar	Adsorção	65	200 - 260	Voláteis

Divinilbenzeno/ Carboxen/ Polidimetilsiloxana (DVB/CAR/PDMS)	Polar/ Apolar	Adsorção	50/30	230 - 270	Voláteis
Poliacrilato (PA)	Polar	Absorção	85	220 - 310	Voláteis

O processo de extração do analito freqüentemente precisa ser otimizado para melhorar as condições extrativas. Os parâmetros que podem ser alterados são: temperatura, força iônica, adição de modificador orgânico, volume da amostra, pH, tempo de extração (THEODORIDIS et al., 2000; LORD & PAWLISZYN, 2000; OLIVEIRA, 2007), conforme explicado a seguir.

- Tempo: O tempo ótimo de extração é o tempo necessário para o sistema atingir o equilíbrio e assim resultar no máximo de recuperação do analito. Porém, esse tempo depende de vários fatores como espessura da fibra utilizada, coeficiente de difusão do soluto, agitação e temperatura do sistema e, muitas vezes, a extração é feita antes do equilíbrio ser atingido.

- Agitação: a agitação do sistema é utilizada com o objetivo de melhorar a recuperação do analito, diminuir o tempo de extração e de equilíbrio.

- pH: O ajuste do pH pode melhorar a extração principalmente de compostos que podem estar protonados ou não. O pH é ajustado com o objetivo de obter o analito na sua forma neutra. Cuidados no ajuste do pH devem ser tomados principalmente no método de extração por imersão direta, já que valores extremos de pH podem deteriorar as fibras extratoras.

- Temperatura: um aumento na temperatura pode aumentar a extração, favorecendo que o sistema atinja esse estado de equilíbrio mais rapidamente. Por outro lado, o aumento da temperatura pode diminuir a porcentagem de extração por diminuir a constante de distribuição.

- Força iônica: a adição de um eletrólito pode melhorar a recuperação do analito pelo processo *salting out*. Esse processo é saturável sendo que o aumento da recuperação é relatado até uma concentração ótima do eletrólito e concentrações maiores diminuem a recuperação do analito.

A análise de compostos voláteis e semi-voláteis, como o β -cariofileno, normalmente é realizada por cromatografia a gás. Entretanto, os métodos tradicionais usados para extrair compostos voláteis de matrizes não-voláteis são muito demorados e podem acarretar em perdas e degradação de alguns compostos. Esses métodos tradicionais não eliminam a etapa de pré-concentração exigida para análises em nível de traços, consumindo tempo e solventes. Na SPME, muitas das dificuldades das outras técnicas inexistem. Esse recurso não requer, por exemplo, o uso de solventes ou sistemas complicados de amostragem e pode ser usada para analisar voláteis e semi-voláteis. Além disso, possui o diferencial de se poder realizar análises não-destrutivas (GOMES, 2003), sendo também já utilizada para a extração de fármacos em nanoemulsões (KRANH et al., 2010).

Planejamento fatorial

O planejamento fatorial é uma ferramenta utilizada para minimizar o número de experimentos e otimizar os processos, tendo como base a análise estatística (BARROS NETO et al, 2001; NETO, 2003; MONTGOMERY, 2005). Essa técnica engloba: planejamento fatorial fracionário (PFF), delineamento fatorial (DF) pelo arranjo quadrados e da metodologia de superfície de resposta (MSR).

As técnicas de planejamento de experimentos podem ser utilizadas nas etapas de projeto preliminar, projeto do produto e processo de fabricação e na etapa de avaliação e melhoria (MOURA, 2008). A escolha da melhor estratégia do planejamento experimental depende principalmente do número de variáveis independentes ou fatores que se deseja estudar e do conhecimento inicial que se tem sobre o processo. Quando o número de fatores é muito grande, é mais conveniente escolher primeiro um fatorial

fracionado que reduz o número de ensaios. Desta forma, todo o tempo e recurso para o desenvolvimento da pesquisa não são gastos diretamente num primeiro planejamento. Isto porque muitas vezes se está longe das condições ótimas. Portanto, a análise dos efeitos como informação inicial pode dirigir seqüencialmente a pesquisa, através de novos fatoriais fracionados até se chegar ao completo, atingindo-se as condições desejadas (RODRIGUES e IEMMA, 2005; REIS, 2010).

A finalidade do planejamento experimental visa determinar os efeitos dos fatores ou variáveis do processo e da interação entre eles sobre o resultado do experimento fatorial (MONTGOMERY, 2003). Para realizar um estudo deste tipo, deve-se escolher as variáveis a serem estudadas e efetuar-se experimentos em diferentes valores (níveis) destes fatores: um fator menor representado pelo sinal (-) e um superior, representado pelo sinal (+), e todas as combinações possíveis destes dois níveis são investigados. Em um estudo que tenha 3 fatores e 2 níveis (2^3), o número total de experimentos é 8 (BARROS NETO et al., 2001). No entanto, quando o número de fatores a serem investigados é alto, o Delineamento Fatorial pode ser fracionado, a fim de reduzir o número de experimentos. Com a redução de experimentos algumas informações sobre os efeitos da interação entre as variáveis sobre o resultado do experimento são afetadas, mas os principais efeitos e as variáveis isoladas não são (TEOFILO et al., 2006; MOURA, 2008; REIS, 2010). Outra ferramenta que também pode ser utilizada quando se tem vários fatores a serem avaliados é a Metodologia de Superfície de Resposta, que é uma ferramenta para otimizar a eficiência do processo, sendo essa uma técnica muito útil para esta finalidade, pois fornece modelos estatísticos que ajudam na compreensão das interações entre os parâmetros que foram otimizados (HAMEED et al., 2009).

Após verificar quais parâmetros avaliados tiveram maior efeito sobre a resposta em estudo é recomendada a utilização de outra ferramenta estatística, como o Delineamento Composto Central e Delineamento três-níveis Box-Behnken (FERREIRA et al., 2007). Estes tipos de delineamentos são uma alternativa que possibilita a exploração de todo o espaço amostral com um menor número de ensaios, em relação

aos fatoriais completos, e pode ser realizado seqüencialmente, de forma a caminhar no sentido da otimização do sistema. Isso consiste em chegar à região que contém o ponto ótimo e, então, comparar a parte do delineamento, que consiste dos pontos axiais, com o objetivo de avaliar a parte curvilínea existente, de forma a chegar à solução ótima, que maximiza os resultados do sistema. Esta última característica é uma das mais interessantes do delineamento (MATEUS et al., 2001; RODRIGUES e IEMMA, 2005).

Referências

ACOSTA, E.J. The HLD-NAC equation of state for microemulsions formulated with nonionic alcohol ethoxylate and alkylphenol ethoxylate surfactants. **Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Aspects**, v. 320 (1-3), 193-204, 2008.

ALENCAR, J.C. Estudo silviculturais de uma população de *Copaifera multijuga* Hayne-Leguminosae, na Amazônia Central. – Produção de óleo resina. **Acta Amazônica**. Manaus, v.1, n.1, p.75-89, 1982.

ALMEIDA, M. E.; TEIXEIRA, H. F.; KOESTER, L. S. Preparação de emulsões submicrométricas: aspectos teóricos sobre os métodos empregados na atualidade. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, n. 5, p. 780-788, 2008.

ALVES, M. P.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Semisolid topical formulations containing nimesulide-loaded nanocapsules, nanospheres or nanoemulsion: development and rheological characterization. **Pharmazie**, v. 60, p. 63-67, 2005.

ALVES, M. P. **Formas farmacêuticas plásticas contendo nanocápsulas, nanoesferas e nanoemulsões de nimesulida: desenvolvimento, caracterização e avaliação da permeação cutânea in vitro**. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, 2006.

ALVES, M. P.; SCARRONE, A. L.; SANTOS, M.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Human skin penetration and distribution of nimesulide from hydrophilic gels containing nanocarriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 341, p. 215- 220, 2007.

ANDRADE, R.; REYES, FELIX, G.R; RATH, S. A. method for the determination of volatile N-nitrosamines in food by HS-SPME-GC-TEA. **Food Chemistry**, v. 91, p. 173–179, 2005.

ANSEL,H.C.; POPVICH, N.G.; Jr., L.V.A. **Farmacotécnica – Formas Farmacêuticas & Sistemas de Liberação de Fármacos**. 8 ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.

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.

Armazém Amazônico

<http://armazemsalvador.blogspot.com/2011/01/copaiba-e-seus-poderes-cicatrizantes-e.html> (acessado em janeiro de 2012).

ARRHENIUS, S. P.; LANGENHEIM, J. H. Sesquiterpenes in leaf pocket resins of *Copaifera* species. **Phytochemistry** v. 22, p. 471-472, 1983.

ARTHUR, C. L.; PAWLISZYN, J. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. **Analytical Chemistry**, v. 62, p. 2145–2148, 1990.

AVEDA CORPORATION. Stanley R. Foog, Roland T. Kapsner, Peter Matravers. **Methods of coloring hair or eyelashes with compositions which contain metal containing pigments and a copaiba resin**. US 6045589, 04 abril, 2000.

AVILA, M.A.S.; BREITER, R.; MOTT, H. Development of a simple, accurate SPME-based method for assay of VOCs in column breakthrough experiments. **Chemosphere**, v. 66, p. 18–29, 2007.

BABOOTA, S ; SHAKEEL, F.; AHUJA, A.; ALI, J.; SHAFIQ, S. Design development and evaluation of novel nanoemulsions formulations for transdermal potential of celecoxib, *Acta Pharm.* v.8, p. 315-332, 2007.

BARRY, B.W. Mode as action of penetration enhancers in human skin. **Journal of Controlled Release**, v. 6, p. 85-97, 1987.

BARROS NETO, B; SCARMÍNIO, I. S; BRUNS, R.E. **Planejamento e otimização de experimentos** – 3 ed. Campinas: Editora da Unicamp, 2001.

BASILE, A.C.; SERTIÉ, J.A.A.; FREITAS, P.C.D.; ZANINI, A.C. Anti-inflammatory activity of oleoresin from Brazilian *Copaifera*. **Journal Ethnopharmacology**. v.22, p. 101-109, 1998.

BASPINAR, Y.; KECK, C. M.; BORCHERT, H.H. Development of a positively charged prednicarbate nanoemulsion. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 383, p. 201–208, 2010.

BENITA, S. **Submicron emulsion in Drug Targeting and Delivery**. Amsterdam, Harwood Academic Publishers, p. 340, 1998.

BENITA, S. Prevention of topical and ocular oxidative stress by positively charged submicron emulsion. **Biomed & Pharmacotherapy**, v. 53, p. 193-206, 1999.

BENITA, S.; LEVY, M.Y. Submicron emulsions as colloidal drug carriers for intravenous administration: comprehensive physicochemical characterization. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 82, p.1069-1079, 1993.

BERNARDI, A. **Nanocápsulas contendo indometacina:avaliação dos efeitos antitumoral, neuroprotetor e antiinflamatório**. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas: Bioquímica) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, UFRGS, 2009.

BEVERLY M. SPARLING. **Medicinal preparation**. Patente GB637440, 05 julho, 1950.

BIAVATTI, M. W.; DOSSIN, D.; DESCHAMPS, F. C.; LIMA, M. P. Análise de óleos-resinas de copaíba: contribuição para o seu controle de qualidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n.2, p. 230-235, 2006.

BIVAS-BENITA, M.; OUDSHOORN, M.; ROMEIJN, S.; MEIJGAARDEN, K. V.; KOERTEN, H.; MEULEN, H.V. D.; LAMBERT, G.; OTTENHOFF, T.; BENITA, S.; HANS J.; GERRIT, B. Cationic submicron emulsions for pulmonary DNA immunization. **Journal of Controlled Release**, v. 100, p. 145 – 155, 2004.

BLOISE, M.I. Óleos vegetais e especialidades da floresta amazônica. **Cosmetics & Toiletries**, v.15, n. 5, p.46-49, 2003.

BORHADE , V.; PATHAK, S.; SHARMA, S.; PATRAVALE, V. Clotrimazole nanoemulsion for malaria chemotherapy. Part I: Preformulation studies, formulation design and physicochemical evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**, doi:10.1016/j.ijpharm.2011.12.04, 2012.

BRAGA W.F.; REZENDE, C.M.; ANTUNES, A. C.; PINTO, A. C. Terpenoids from *Copaiba cearensis*. **Phytochemistry**, v.49, p.263-264, 1998.

BRITO, N.M.B. Aspectos morfológicos e morfométricos da cicatrização de feridas cutâneas abertas em ratos tratados com óleo de copaíba. **Dissertação de Mestrado**, Escola Paulista de Medicina, 1996.

CABRAL, D. **Avaliação da atividade antimicrobiana in vitro do óleo-resina de copaíba (*Copaifera duckei* Dwyer)**. Dissertação de Mestrado, Universidade de Alfenas, 2008.

CALDERILLA-FAJARDO, S. B.; CAZARES-DELGADILLO, J.; VILLALOBOSGARCIA, R.; QUINTANAR-GUERRERO, D.; GANEM-QUINTANAR, A. Influence of sucrose esters on the in vivo percutaneous penetration of octyl methoxycinnamate formulated in nanocapsules, nanoemulsion and emulsion. **Drug Dev. Ind. Pharm.**, v. 32, p. 107-113, 2006.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines or herbal medicines (phytotherapeutic agent). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v.33, p.179-89, 2000.

CALIXTO, J.B. Resenha: *Cordia verbenacea*. **Arquivos Brasileiros de Fitomedicina Científica**, n.2, p. 5–8, 2005.

CALIXTO, J.B.; CABRINI, D.A.; FERREIRA, J.; CAMPOS, M. M. Kinins in pain and inflammation. **Pain**, n. 87, 1-5, 2000.

CAMARGO, M. F. P. **Desenvolvimento de nanoemulsões à base de óleo de maracujá (*Passiflora edulis*) e óleo essencial de lavanda (*Lavandula officinalis*) e avaliação da atividade anti-inflamatória tópica.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, USP, 2008.

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

CAPOBIANGO, H. L. V.; CARDEAL, Z. L. A Solid-Phase Microextraction Method for the Chromatographic Determination of Organophosphorus Pesticides in Fish, Water, Potatoes, Guava and Coffee. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 16, n. 5, p. 907-914, 2005.

CARSON, C.F.; HAMMER, K.A.; RILEY, T.V. *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil: a Review of Antimicrobial and Other Medicinal Properties. **Clin. Microb. Rev.** v. 19, n.1, p. 50-62, 2006.

CARVALHO, J.C.T. **Fitoterápicos anti-inflamatórios (aspectos químicos, farmacológicos e aplicação terapêutica).** 1 ed., São Paulo: Tecmedd Editora, v. 1, 2004.

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. **Phytotherapy Research**, v. 19, p. 946–950, 2005.

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

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.** v.40, p. 1231-1234, 2002.

CUNHA JUNIOR, A.S.; FIALHO, S.L.; CARNEIRO, L.B.; *et al.* Microemulsões como veículo de drogas para administração ocular tópica. **Arquivo Brasileiro de Oftalmologia**, v.66, n.3, p.385-391, 2003.

CUNHA, K.M.A., PAIVA, L.A.F., SANTOS, F.A., GRAMOSA, N.V., SILVEIRA, E.R., RAO, V.S.N. Smooth muscle relaxant effect of kaurenoic acid, a diterpene from *Copaifera langsdorffii* on the rat uterus in vitro. **Phyther. Res.**, v. 17, p. 320–324, 2003.

DAMASCENO, F. C. Microextração em fase sólida no modo headspace aplicada ao estudo de substâncias voláteis de plantas infestadas por galhas foliares entomógenas.

Dissertação (Mestrado em Química) – Programa em Pós Graduação em Química, UFRGS, 2007.

DARSHAN, S.; DORESWANY, R. Patented antiinflammatory plant drug development from tradicional medicine. **Phytotherapy Research**. v. 18, p. 343-357, 2004.

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

DISEPIO, D.; CHANDRARATNA, R.A.; NAGPAL, S. Novel approaches for the treatment of psoriasis. **Drug Discovery Today**, v. 4, p. 222-231, 1999.

DONSÌ, F.; WANG, Y.; HUANG, Q. Freezeethaw stability of lecithin and modified starch-based nanoemulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 1327-1336, 2011.

DUNCAN, J.I., PAYNE, S.N., WINFIELD, A.J., ORMEROD, A. D. THOMSON, A.W. Enhanced percutaneous absorption of a novel topical cyclosporin A formulation and assessment of its immunosuppressive activity. **British Journal of Dermatology**., v.123, p.631-640, 1990.

EURIDES, D.; MAZZANTI, A.; GONÇALVES, G.F.; BELLETI, M.E.; SILVA, L.A.F.; FIORAVANTI, M.C.S.; CHAVES, N.S.T.; BOMBONATO, P.P.; CAMPOS, V.A.; OGATA, A.S. Aspectos morfológicos, morfométricos e histológicos da reparação tecidual de feridas cutâneas de camundongos tratadas com óleo de copaíba (*Copaifera langsdorffii*). **Veterinária Notícias**, v.4, p.77-82, 1998.

FASOLO, D.; LIEGE, S.; HOLZSCHUH, M.; BASSANI, V.; TEIXEIRA, H. Validation of an isocratic LC method for determination of quercetin and methylquercetin in topical nanoemulsions. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, n. 44, p. 1174-1177, 2007.

FASOLO, D.; BASSANI, V. L.; TEIXEIRA, H. Development of topical nanoemulsions containing quercetin and 3-O-methylquercetin. **Pharmazie**, v. 64, p. 726-730, 2009.

FAIYAZUDDINA, M.; BABOOTA, S.; ALI, J.; AHUJA, A.; AHMAD, S. Characterization and in vitro bioactive studies of lemongrass oil phytonanoemulsion system in the treatment of acne vulgaris. **International Journal of Essential Oil Therapeutics**, v. 3, n. 1, p. 13-21, 2009.

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). **Veterinary Parasitology**, n. 147, p. 150–154, 2007.

FERNANDES, R.M.; PEREIRA, N.A.; PAULO, G.L. Anti-inflammatory activity of copaiba balsam (*Copaifera cearensis*, Huber). **Revista Brasileira de Farmácia**, v.73, n.3, p. 53-56, 1992.

FERNANDEZ, P.; ANDRÉ, V.; RIEGER, J; KÜHNLE, A. Nanoemulsions formation by emulsions phase inversion. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.251, p.53-54, 2004.

FERREIRA, A. H. **Efeito da adição de surfactantes e do ajuste de pH sobre filmes a base de gelatina, triacetina, ácidos graxos e ceras de carnaúba e de cana-de-açúcar**. Dissertação de Mestrado em Alimentos e Nutrição, UNICAMP, 2006.

FLEURY, M. A propos de l'intérêt médicinal du baume de Copahu. **Acta Botanica Gallica**, v. 144, p. 473–479, 1997.

FLOYD, A.G.; Top ten considerations in the development of parenteral emulsions. **Pharmaceutical Science Technology**, v.2, p.134-143, 1999.

FLORES, F. C.; RIBEIRO, R. F.; OURIQUE A. F.; ROLIM, C. M. B.; SILVA, C., B.; POHLMANN, A, R.; BECK, R. C. R.; GUTERRES, S. S. Nanostructured systems containing an essential oil: protection against volatilization. **Química Nova**, v. 6, p. 968-972, 2011.

FLOURY, J .; BELLETTRE, J.E; LEGRAND, J .; DESRUMAUX, A. Analysis of a new type of high pressure homogeniser. A study of the flow pattern. **Chemical Engineering Science**, v. 59, p. 843-853, 2004a.

FLOURY, J.; LEGRAND, J.; DESRUMAUX, A. Analysis of a new type of high pressure homogeniser. Part B. study of droplet break-up and recalescence phenomena. **Chemical Engineering Science**, v. 59, p. 1285-1294, 2004b.

FOX, L.P. Farmacologia dermatológica. In: BRUNTON, L.L.; LAZO, J.S.; PARKER, K.L. **Goodman & Gilman - As bases farmacológicas da terapêutica**. 11. ed. Rio de Janeiro:McGrawHill, p. 1534-1537, 2006.

FRIEDMAN, D.I.; SCHWARZ, J.S.; WEISSPAPIR,M. Submicron emulsion vehicle for enhanced transdermal delivery of steroidal and nonsteroidal antiinflammatory drugs. **Journal of Pharmaceutical Science**, v.84, p.324-329, 1995.

GILBERT, B.; MORS, W.B.; BAKER, P. M.; TOMAZZINI, T.C.B. A atividade antihelmíntica de óleos essenciais e de seus componentes químicos. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.44, p. 423-428, 1972.

GERIS, R.; SILVA, I.G.; SILVA, H.H.; 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**, v. 50, p. 25–28, 2008.

GEROLANO, D.Q. GIMENES, J.Q. **Pomada de Copaíba**. Patente BR8605738, 28 junho 1988.

GOMES, F. **Estudos de compostos voláteis do alecrim utilizando as técnicas de microextração em fase sólida (SPME), hidrodestilação e extração com fluido supercrítico (SFE)**. Dissertação (Mestrado em Química) – Programa de Pós Graduação em Química, UFRGS, 2003.

GOMES, N.M., REZENDE, C.M., FONTES, S. P., MATHEUS, M.E., FERNANDES, P.D. Antinociceptive activity of Amazonian Copaiba oils. **J. Ethnopharmacol.** v. 109, p. 486–492, 2007.

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. **Journal of Ethnopharmacology** , v. 128, p. 177–183, 2010.

GOTTLIEB, A.B. Therapeutic options in the treatment of psoriasis and atopic dermatitis. **Journal of American Academy Dermatology**. v. 53 , p. s3-16, 2005.

GRENAND, P., MORETTI, C. Pharmacopées traditionnelles en Guyane. Créoles Palikur, Wayãpi, Orstom, Paris, p. 569, 1987.

GUTERRES, S. S.; ALVES, M.P.; POHLMANN, A. R. Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules for cutaneous application. **Drug Target Insights**, v. 2, p. 147-157, 2007.

GUTIÉRREZ, J.M.; GONZÁLEZ, C.; MAESTRO, A.; SOLE, I.; PEY, C.M.; NOLLA, J. Nano-emulsions: New applications and optimization of their preparation. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 13, p. 245–251, 2008.

HAMEED, B. H.; TAN, I. A. W.; AHMAD, A. L. Preparation of oil palm empty fruit bunch-based activated carbon for removal of 2,4,6-trichlorophenol: Optimization using response surface methodology. **J. Hazardous Mater.**, v. 164, p. 1316-1324, 2009.

HARGER, C. A. **Tratamento de hemorróidas, com óleo vegetal extraído de plantas da espécie das copaíferas (copaíba)**. Patente BR8203234, 09 maio 2002.

HATZIANTONIOU , S.; DELI , G.; NIKAS , Y.; DEMETZOS, C.; PAPAIOANNOU G. Scanning electron microscopy study on nanoemulsions and solid lipid nanoparticles containing high amounts of ceramides. **Microscopy in Nanobiotechnology**, v. 38, p. 819-823, 2007.

HENNERÉ, G.; PROGNON, P.; BRION, F.; ROSILIO, V. ; NICOLIS, I. Molecular dynamics simulation of a mixed lipid emulsion model : influence of the triglycerides on interfacial phospholipid organization. **Journal of Molecular Structure: THEOCHEM**, v. 901, p. 174-185, 2009.

HENRIQUES, M.G.M. O.; WEG, V.B.; MARTINS, M. A.; SILVA, P.M.R.; FERNANDES, P.D.; CORDEIRO, R.S.B.; VARGARIG, B.B. Differential inhibition by two hetrazepne PAF antagonists of acute inflammation in the mouse. **British Journal of Pharmacology**, v. 99, p. 164-168, 1990.

ICHIMARU PHARCOS CO LTD. Nichibe Yuninaga, Tomono Norihiro, Kawagoe Shinko, Wakamatsu Kanae, Ando Hiroshi. External preparation for skin and bathing agent. Patente JP07-278001, 24 outubro 1995.

JAHNKE, D.I.S. "The theory of high-pressure homogenization", in "Emulsions and Nanosuspensions for Formulation of Poorly Soluble Drugs" (R.H. Müller, S. Benita & B. Böhn, eds), **Medpharm Scientific Publishers**, p. 177-200, 1998.

JUMMA, M.; KLEINEBUDDE, P.; MÜLLER, B.W. Mixture experiments with the oil phase of parenteral emulsions. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.46, p.161-176, 1998.

JUNQUEIRA, L. C.; & CARNEIRO, J. **Histologia Básica**, 9 ed. São Paulo: Guanabara Koogan, cap.18, p. 303-314, 1999.

JUNYAPRASERT, V. B., TEERANACHAIDEEKUL, V., SOUTO, E. B., OONME, P. e MÜLLER, R. H. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 377, p. 207-214, 2009.

KAO CORPORATION. Akiba Shunichi, Hama Masakatsu, Okihaka Kouichi, Ara Katsutoshi, Kayane Shigeto. **Deodorant**. Patente JP2002255774, 11 setembro 2002.

KELMANN, R.G.; KUMINEK, G.; TEIXEIRA, H.F.; KOESTER, L.S Carbamazepine parenteral nanoemulsions prepared by spontaneous emulsification process. **International Journal of Pharmaceutics**, v.342, p. 231-239, 2007.

KELMANN, R.G.; KUMINEK, G.; TEIXEIRA, H.F.; KOESTER, L.S. Preliminary Study on the Development of Nanoemulsions for Carbamazepine Intravenous Delivery: An Investigation of Drug Polymorphic Transition. **Drug Development and Industrial Pharmacy** v. 34, p.53-58, 2008.

KHANDAVILLI, S.; PANCHAGNULA, R. Studies of the skin permeation of lipophilic drugs: paclitaxel. **Die Pharmazie**, v. 62(6), p.471-473, 2007.

KIBBE, A. M. (Ed.). **Handbook of Pharmaceutical Excipients**, 3 ed. London: Pharmaceutical Press, 2000.

KLANG, S.; BENITA, S. Design and evaluation of submicron emulsions as colloidal drug carriers for intravenous administration. In: BENITA, S. **Submicron emulsions in drug targeting and delivery**. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, p. 340, 1998.

KOBAYASHI, C.; FONTANIVE, T.O.; ENZWEILER, B. G.; BONA, L. R.; MASSONI, T.; APEL, M. A.; HENRIQUES, A. T.; R., MARC, F.; ARDENGHI, P.; SUYENAGA, E. S. Pharmacological evaluation of *Copaifera multijuga* oil in rats. **Pharmaceutical Biology**, v. 49, n. 3, p. 306-313, 2011.

KOMMURU, T.R.; GURLEY, B.; KHAN, M.A. and REDDY, I. K. Selfemulsifying drug delivery systems (SEDDS) of coenzyme Q10: formulation development and bioavailability assessment. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 212, p. 233–246, 2001.

KOSE CORPORATION; TANABE SEITAKU CORP LTDA. Hoshino Horishi, HataTomonori, Nishio Maki, Takamatsu Satoshi. **Skin care preparation**. Patente JP2001322941, 20 novembro 2001.

KRAHN, C.L.; DEBOM, R.; MAYORGA, P.; GUTERRES, S. S; LIMBERGER, R. P. SPME–GC Determination of an Inhalation Anesthetic, Isoflurane in Bulk and Nanoemulsion Dosage Form. **Chromatographia**, v. 72, p. 177–182, 2010.

KTISTIS, G.; NIOPAS, I. A study on the in vitro percutaneous absorption of propranolol from disperse systems. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.50, p.413-418, 1998.

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. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, p. 390–402, 2006.

LANÇAS, F. M. **Extração em fase sólida (SPE)**. São Carlos: RiMa, 2004.

LAWRENCE, B.M. Progress in essential oil. **Natural flavor and fragrance materials**. v. 5, p. 32. 1980.

LEUNG, D.Y.M.; BOGUNIEWICZ, M., HOWEL, M.D.; NOMURA, I. HAMUD, Q. A. New insights into atopic dermatitis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 113, p. 651-657, 2004.

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. Pre-clinical validation of a vaginal cream containing copaiba oil (reproductive toxicology study). **Phytomedicine**, v. 18, p. 1013– 1023, 2011.

LIMA, S. R. M.; VEIGA Jr. V.F.; CHRISTO, H.B.; PINTO, A. C.; FERNANDES, P.D. *In vivo* and *in vitro* studies on the anticancer activity of *Copaiba multijuga* Hayne and its fractions. **Phytotherapy Research**. v.17, p. 1048-1053, 2003.

LION CORPORATION. Uchiyama Chiyoko, Hayashi Tatsuo. **Agent for preventing and improving gray hair**. Patente JP2000169348, 20junho 2000.

LIU, W.; HU, M.; LIU, W.; XUE, C.; XU, H.; YANG, X. Investigation of the carbopol gel of solid lipid nanoparticles for the transdermal iontophoretic delivery of triamcinolone acetonide acetate. **International Journal of Pharmaceutics**. 364, p.135–14, 2008.

LORD, H.; PAWLISZYN, J. Method optimization for the analysis of amphetamines in urine by solid-phase microextraction. **Anal. Chem.**, v. 64, p. 1187-1199, 1992.

LU, Y.; WANG, Y.J.; TANG, W. Formulation and thermal sterile stability of a less painful intravenous clarithromycin emulsion containing vitamin E. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 346, p. 47-56, 2008.

MACIEL, M. A. M. Plantas Medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25 (3), p. 429-438, 2002.

MAGALHÃES, I. R. S. **Aplicação da microextração em fase líquida na análise de alguns fármacos antimaláricos e respectivas metabolitos em plasma**. Tese (Doutorado em Toxicologia) – Programa de Pós Graduação em Toxicologia, USP, 2009.

MAISTRO, E.L., CARVALHO, J.C.T., CASCON, V., KAPLAN, M.A.C., In vivo valuation of the mutagenic potential and phytochemical characterization of oleoresin from *Copaifera duckei* Dwyer. **Genet. Mol. Biol.** v. 28, p. 833–838, 2005.

MARTINI, E.; CARVALHO, E; H. TEIXEIRA. Adsorção de oligonucleotídeos em nanoemulsões obtidas por emulsificação espontânea. **Química Nova** v. 30, p. 930-934, 2007.

MATA, A. R. ; NELSON, D. L. ; AFONSO, R. J. C. F.; GLÓRIA, M. B. A.; JUNQUEIRA, R. G. Identificação de compostos voláteis da curcuma empregando microextração por fase sólida e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 24, n. 1, p. 151-157, 2004.

MATEUS, N. B., BARBIN, D., CANAGIN, A. Viabilidade de uso do delineamento composto central. **Acta scientiarum**, v. 23, n. 6, p. 1537-1546, 2001.

MATTOS, C. B. **Desenvolvimento e caracterização de nanoemulsões contendo um derivado sintético de chalcona visando ao tratamento de Leishmaniose Tegumentar Americana**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, 2011.

MAZURELLA, J. C.; SICURELLA, N. A., Antibacterial activity of essential vapors. **Journal of the American Pharmaceutical Association.**, v. 49, p. 692-694, 1960.

MENDONÇA, F.A.C.; SILVA, K.F.S.; SANTOS, K.K.; JÚNIOR, K.A.L.R.; SANT'ANA, A.E.G. Activities of some Brazilian plants against larvae of the mosquito *Aedes aegypti*. **Fitoterapia**, v. 76, p.629–636, 2005.

MENDONÇA, D.E., ONOFRE, S.B., Atividade antimicrobiana do óleo-resina produzido pela copaíba – *Copaifera multijuga* Hayne (Leguminosae). **Braz. J. Pharmacog.**, v.19, p. 577–581, 2008.

MENEZES, H. C. **Análise ambiental de benzene e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos por microextração em fase sólida e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas.** Tese (Doutorado em Ciências Exatas) – Programa de Pós Graduação em Ciências Exatas, UFMG, 2011.

MENEZES, H. C.; CARDEAL, Z. L. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons from ambient air particulate matter using a cold fiber solid phase microextraction gas chromatography–mass spectrometry method. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 3300–3305, 2011.

MONTGOMERY, D. C. **Estatística aplicada e probabilidade para engenheiros.** 2. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2003.

MONTGOMERY, D. C. **Design and Analysis of Experiments**, 6th ed.; John Wiley & Sons, Inc.: New York, 2005.

MONTI, H.; TILIACOS, N.; FAURE, R. Two diterpenoids from copaiba oil. **Phytochemistry**, v.42, n. 6, p. 1653 -1656, 1996.

MONTI, H.; TILIACOS, N.; FAURE, R. Copaiba oil isolation and characterization of a new diterpenoid with the dinorlabdane skeleton. **Phytochemistry**, n. 40, p. 1013-1015, 1999.

MOREIRA, R.C.R., REBELO, J.M.M., GAMA, M.E.A., COSTA, J.M.L. Awareness of American tegumentary leishmaniasis (ATL) and use of alternative therapies in an endemic area in the Amazon region in the State of Maranhão, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, n.18, p. 187–195, 2002.

MOURA, K. R. M. **Otimização do processo de produção de biodiesel metílico do sebo bovino aplicando um delineamento composto central rotacional (DCCR) e a avaliação da estabilidade térmica.** Tese (Doutorado em Química) – Programa de Pós Graduação em Química, UFPA, 2008.

MUCHTAR, S.; BENITA, S. Emulsions as drug carriers for ophtalmic use. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 91, p. 181-190. 1994.

MUROI, H.;KUBO, I. Combination Effects of Antibacterial Compounds in Green Tea Flavor against *Streptococcus mutans*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 41, p. 1102-1105, 1999.

NATERCIA, F. Parcerias e inovação impulsionam setor farmacêutico. *Inovação Uniemp*, v. 1(3), p. 32-37,2005.

NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**, 2a ed.; UNICAMP: Campinas, Brasil, 2003.

NETZ, P.; ORTEGA, G.G. **Fundamentos de físico-química**. Porto Alegre: Artmed, 2002.

NUCHUCHUA, O.; SAKULKU, U.; UAWONGYART, N.; PUTTIPIPATKHACHORN, S.; SOOTTITANTAWAT, A.; RUKTANONCHAI, U. In Vitro Characterization and Mosquito (*Aedes aegypti*) Repellent Activity of Essential-Oils-Loaded Nanoemulsions. **AAPS Pharm. Sci. Tech.** , v. 4, p. 1234-1242, 2009.

NUNES, C.; ROCHA, S. M.; SARAIVA, J.; COIMBRA M. A. Simple and solvent-free methodology for simultaneous quantification of methanol and acetic acid content of plant polysaccharides based on headspace solid phase microextraction-gas chromatography (HS-SPME-GC-FID). **Carbohydrate Polymers**, v. 64, p. 306–311, 2006.

OHSAKI, A.; YAN, L.T.; ITO, S.; EDATSUGI, H.; IWATA, D.; KOMODA, Y. The isolation and *in vivo* potent antitumor activity of clerodane diterpenoid from the oleoresin of the brazilian medicinal plant, *Copaifera langsdorffii* Desfon. **Bioorganic Medicinal Chemistry Letters**. v. 4, n.24, p.2889-2892, 1994.

OLIVEIRA, A. R. M. **Técnicas de microextração aplicadas a análise estereosseletiva do ibuprofeno, da hidroxicloroquina e de seus metabólitos em urina**. Tese (Doutorado em Toxicologia) – Programa de Pós Graduação em Toxicologia, USP, 2007.

OLIVEIRA, B. R. **Desenvolvimento e avaliação de nanoemulsões com óleo de *Carapa guianensis* e *Copaifera* sp. e estudo de ação repelente frente a *Aedes aegypti***. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, USP, 2008.

OLIVEIRA, J. S.; AGUIAR, T. A.; MEZADRI, H.; SANTOS, O. D. H. Attainment of hydrogel-thickened nanoemulsions with tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*) and retinyl palmitate. **African Journal of Biotechnology**, v.10, n.60, p. 13014-13018, 2011.

OPDYKE, D. L. J., Balsam Copaiba . **Food and Chemical Toxicology**. v.14, p. 687, 1976.

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. **Journal Ethnopharmacology**. v. 62, p. 73-78, 1998.

PAIVA, L.A.F.; DE ALENCAR CUNHA, K.M.; SANTOS, F.A.; GRAMOSA, N.V.; SILVEIRA, E.R.; RAO, V.S.N. Investigation on the wound healing activity of oleoresin from *Copaifera langsdorffii* in rats. **Phytotherapy Research**. v. 16, p. 737-739, 2002.

PAIVA, L.A.F.; GURGEL, L.A.; DE 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. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 93, p.51-56, 2004a.

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 Science**, v. 75, p. 1979-1987, 2004b.

PATHAN, I.B.; MALLIKARJUNA, S., C. Enhancement of transdermal delivery of tamoxifen citrate using **nanoemulsion** vehicle. **International Journal of PharmTech Research** , v. 3, n. 1, p. 287-297, 2011.

PATIL, S. H.; BANERJEE, K.; UTTURE, S. C.; FONTANA, A. R.; ALTAMIRANO, J. C.; OULKAR, D. P.; WAGH, S. S.; DASGUPTA, S.; PATIL, S. B.; JADHAV, M. R.; UGARE, B.; ADSULE, P. G.; DESHMUKH, M. B. Development and validation of a simple analytical method for the determination of 2,4,6-Trichloroanisole in wine by GC-MS. **Food Chemistry**, v. 124, n. 4, p. 1734–1740, 2011.

PATITUCCI, M.L.; VEIGA, JR. V.F.; PINTO, A.C. Utilização de cromatografia gasosa de alta resolução na detecção de classe de diterpenos em extratos brutos de vegetais. **Química Nova**, v.18, n.3, p. 262-266, 1995.

Pawliszyn, J. Solid-Phase Microextraction, Theory and Practice New York, Willey, 1997. PELLEGRINO, J. Protection against human *Schistosoma cercariae*. **Experimental Parasitology**. v. 21, n. 1, p. 112-31, 1967.

PIEMI, M.P.Y.; KORNER, D.; BENITA, S.; MARTY, J-P. Positively and negatively charged submicron emulsion for enhanced topical delivery of antifungal drugs. **Journal of Controlled Release**, v. 58, p.177-187, 1999.

PINTO, A.C.; BRAGA W. F.; REZENDE, C. M.; GARRIDO, F. M. S.; VEIGA JR., V.F.; BERGYER, L.; PATITUCCI M. L.; ANTUNES, A. C. Separation of acid diterpenes of *Copaifera cearensis* Huber ex Duke by flash chromatography using potassium hydroxide impregnated silica gel. **Journal Brazilian Chemistry**, v. 11, p. 355-360, 2000.

PRIMO, F. L.; MICHIELETO, L.; RODRIGUES, M. A. M.; MACAROFF, P. P.; MORAIS, P. C.; LACAVAL, Z. G. M.; BENTLEY, M. V. L. B.; TEDESCO, A. C. Magnetic

nanoemulsions as drug delivery system for Foscan®: Skin permeation and retention in vitro assays for topical application in photodynamic therapy (PDT) of skin cancer. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, v. 311, p.354-357, 2006.

PRIMO, F. L., RODRIGUES, M. M. A., SIMIONI, A. R., BENTLEY, M. V. L. B., MORAIS, P. C. e TEDESCO, A. C. In vitro studies of cutaneous retention of magnetic nanoemulsion loaded with zinc phthalocyanine for synergic use in skin cancer treatment. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, v. 320, p. 211–214, 2008.

PRISTA, L.N.; BAHIA, M.F.G.; VILAR, E. **Dermofarmácia e Cosmética**. 1. ed. Porto: Associação Nacional de Farmácias, 1992.

PRISTA, L. N.; ALVEZ, A. C.; MORGADO, R. **Tecnologia farmacêutica**. 6 ed. Vol I. Lisboa: Fundação Lacouste Gulbenkian, 2003.

PROPHIRO, J.S.; SILVA, M.N.; KANIS, L.A.; 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.* v. 110, p. 699–705, 2012.

QUEIROZ, M. E. C.; LANÇAS, F. M. Análise de Fármacos em Material Biológico: acoplamento microextração em fase sólida “no tubo” e cromatografia líquida de alta eficiência. *Quim. Nova*, v. 28, n. 5, p. 880-886, 2005.

RAMOS, M. F. S. **Desenvolvimento de microcápsulas contendo a fração volátil de copaíba por spray-drying: estudo de estabilidade e avaliação farmacológica**. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, USP, 2006.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; FLOWER, R.J. **Rang & Dale farmacologia**. 6. ed. Rio de Janeiro, RJ: Elsevier, 2007.

REIS, M. F. T. **Micelas reversas formadas por surfactante/solvente orgânico/água: estudo termodinâmico e aplicação para extração de proteínas da semente de jaca**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Programa de Pós Graduação em Engenharia de Alimentos, UESB, 2010.

RIEGER, M.M. “Emulsões”, in “Teoria e prática na indústria farmacêutica” 3.ed. (L. Lachman, H.A. Lieberman, & J.L. Kanig, eds), Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, p. 855-906, 2001.

RIFUSE:KK. KOMAI KOICHIRO, MIIWATA MASAYASU, SAKURAI OSAMU. **Sanitary insect pest repellent and repellent active wax**. Patente JP2001348304, 18 dezembro 2001.

RODRIGUES, M. I., IEMMA, A. F. Planejamento de experimentos. 1ª ed. Campinas - SP, 2005.

RODRÍGUEZ-BENCOMO, J. J.; SCHNEIDER, R.; LEPOUTRE, J. P.; RIGOU, P. Improved method to quantitatively determine powerful odorant volatile thiols in wine by headspace solid-phase microextraction after derivatization. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 5640–5646, 2009.

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.

ROMERO, A.L. **Contribuição ao conhecimento químico do óleo-resina de copaíba: configuração absoluta de terpenos**. Dissertação (Mestrado em Química) – Programa de Pós Graduação em Química, Unicamp, 2007.

RUKTANONCHAI, U.; BEJRAPHA, P.; SAKULKHU, U.; OPANASOPIT, P.; BUNYAPRAPHATSARA, N.; JUNYAPRASERT, V.; PUTTIPIPATKHACHORN, S. Physicochemical Characteristics, Cytotoxicity, and Antioxidant Activity of Three Lipid Nanoparticulate Formulations of Alpha-lipoic Acid. **AAPS Pharm Sci Tech**, v. 10, p. 227-234, 2009.

SACCA, R.; CUFF, C.A.; RUDDLE, N.H. Mediators of inflammation. **Curr. Opin. Immunol.** n. 3, p. 851-857, 1997.

SACHETTI, C.G.; FASCINELI, M.L.; SAMPAIO, J.A.; LAMEIRA, A.O.; CALDAS, E.D. Assessment of the neurotoxic potential and acute toxicity of copaiba (*Copaifera reticulata*, Ducke Fabaceae). **Braz. J. Pharmacogn.** v. 19, p. 937–941, 2009.

SACHETTI, C.G.; CARVALHO, R. R.; PAUMGARTTEN, F. J.R.; LAMEIRA, A.O.; CALDAS, E.D. Developmental toxicity of copaiba tree (*Copaifera reticulata* Ducke, Fabaceae) oleoresin in rat. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p.1080–1085, 2011.

SAHFIN, P. M.; ROSAMMA, M.K.; JAMIL, K.REDDY, P.S. Antibacterial activity of the essential oil from *Aristolochia indica*. **Fitoterapia**. v. 73, n. 5, p. 439-441, 2002.

SAKULKU, U.; NUCHUCHUA, O.; UAWONGYART, N.; PUTTIPIPATKHACHORN, S.; SOOTTITANTAWAT, A. ; RUKTANONCHAIU, U. Characterization and mosquito repellent activity of citronella oil nanoemulsion. **Int. J. Pharm.**, v. 372, p. 105-111, 2009.

SANTOS, A. O. **Investigação da atividade biológica do óleo de copaíba obtido de diferentes espécies de *Copaifera* spp.** Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Programa de Pós Graduação em Microbiologia. Universidade Estadual de Londrina, 2008.

SANTOS, A.O.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B.P.; VEIGA JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C.; NAKAMURA, C.V. Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, p. 277–281, 2008a.

SANTOS, A.O.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS-FILHO, B.P.; VEIGA-JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C.; NAKAMURA, C.V.; Effect of Brazilian copaiba oils on *Leishmania amazonensis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, p. 204–208, 2008b.

SANTOS, A.O.; COSTA, M. A.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS-FILHO, B.P.; VEIGA-JUNIOR, V.F.; LIMA, M. M. S.; NAKAMURA, C.V. *Leishmania amazonensis*: Effects of oral treatment with copaiba oil in mice. **Experimental Parasitology**, v. 129, p. 145–151, 2011.

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. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 109, p. 265–26, 2012.

SANTOS-MAGALHÃES, N.S., PONTES, A.; PEREIRA, V.M.W.; CAETANO, M.N.P. Colloidal carries for benzathine penicillin G: Nanoemulsions and Nanocapsules. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 208, p. 71-80, 2000.

SCHÄCKE, H; DÖCKE, W.; ASADULLAH, K. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. **Pharmacology & Therapeutics**. v. 96, p. 23-43, 2002.

SCHOEPE, S.; SCHACKE, H. MAY, E.; ASADULLAH, K. Glucocorticoid therapy-induced skin atrophy. **Experimental Dermatology**. v. 15 ,p. 406-420, 2006.

SCHWARZ, J. S.; WEISSPAPIR, M. R.; FRIEDMAN, D. I. Enhanced transdermal delivery of diazepam by submicron emulsion (SME) creams. **Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 5, p.687-692, 1995.

SHAFIQ, S.; FAIYAZ, S.; SUSHMA,T.; FARHAN, J.A.; KHAR, R.K.; ALI, M. Design and development of ramipril nanoemulsion formulation: In vitro and in vivo assessment. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 3, p. 28–44, 2007.

SHAKEEL, F.; BABOOTA, S.; AHUJA, A.; ALI, J.; AQIL, M.; SHAFIQ, S. Nanoemulsions as vehicles for transdermal delivery of aceclofenac, **AAPS PharmSciTech**, v. 8, p. E1-E9, 2007.

SHAKEEL, F.; BABOOTA, S.; AHUJA, A.; ALI, J.; AQIL, M.; SHAFIQ, S. Skin permeation mechanism and bioavailability enhancement of celecoxib from transdermally applied nanoemulsion. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 6, p.08-19, 2008.

SHEN, Q.; WANG, Y.; ZHANG, Y. Improvement of colchicine oral bioavailability by incorporating eugenol in the nanoemulsion as an oil excipient and enhancer. **International journal of nanomedicine**, v. 6 , p. 1313-1325, 2011.

SHISEIDO CO. LTDA. Yagi Eiichiro, Komazaki Hisayuki, Shibata Yuki, Nagamuna Masako, Fukuda Minoru. **Skin external preparation**. Patente JP08012560, 16 Janeiro 1996.

SILVA, A.P.C.; NUNES, B.R.; OLIVEIRA, M.C.; KOESTER, L.S.; MAYORGA, P.; BASSANI, L. Development of topical nanoemulsions containing the isoflavone genistein. **Pharmazie**, v. 64, p. 32-35, 2009.

SILVA, B. J. G.; LANCAS, F. M.; QUEIROZ, M. E. C. Determination of fluoxetine and norfluoxetine enantiomers in human plasma by polypyrrole-coated capillary in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 8590–8597, 2009.

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*, v. 32, p.729–732, 2003.

SILVA, H.H.G.; GERIS, R. RODRIGUES, E.; ROCHA, C.; SILVA, I.G. Larvicidal activity of oil-resin fractions from the Brazilian medicinal plant *Copaifera reticulata* Ducke (Leguminosae- Caesalpinoideae) against *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 40, p.264–267, 2007.

SIMOES, N.G.; CARDOSO, V.V.; Ferreira, E.; Benoliel, M.J.; Almeida, C. M.M. Experimental and statistical validation of SPME-GC–MS analysis of phenol and chlorophenols in raw and treated water. **Chemosphere**, v. 68, p. 501–510, 2007.

SINGH, K. K.; VINGKAR, S.K. Formulation, antimalarial activity and biodistribution of oral lipid nanoemulsion of primaquine. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 47, p. 136–143, 2008.

SONNEVILLE-AUBRUN, O.; SIMONNET, J. T.; L'ALLORET, F. Nanoemulsions: a new vehicle for skincare products. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 20, p. 145-149, 2004.

SOUZA Jr., O. G.; LAMARÃO, L.G.; DAMOUS, S.H. Colite induzida por ácido acético e tratada com edema de óleo de copaíba. **Anais da Faculdade de Medicina da Universidade Pernambuco**, v. 45 (2), p. 131-135, 2000.

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.; VENEZIANI, R. C. S. Antimicrobial Evaluation of Diterpenes from *Copaifera langsdorffii* Oleoresin Against Periodontal Anaerobic Bacteria. **Molecules**, v. 16, p. 9611-9619, 2011.

SOUZA, D. Z.; BOEHL, P. O. ; COMIRAN, E.; MARIOTTI, K. C.; PECHANSKY, F.; DUARTE, P. C.A.V.; DE BONI, R.; FROELICH, P. E.; LIMBERGER, R. P.

Determination of amphetamine-type stimulants in oral fluid by solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 696, p. 67–76, 2011.

STEFFEN, A.; PAWLISZYN, J. Analysis of Flavor Volatiles Using Headspace Solid-Phase Microextraction. **J. Agric. Food Chem.**, v.44, p. 2187-2193, 1996.

SZINITOWSKA, M.; JANICKI, S.; DABROWSKA, E.A.; GAJEWSKA, M. Physicochemical screening of antimicrobial agents as potential preservatives for submicron emulsions. **Eur. J. Pharm. Sci.** v. 15, p. 489-495, 2002.

TABOSA DO EGITO, E.S., FESSI, H., APPEL, M., BARRATT, G., LEGRAND, P., BOLARD, J.; DEVISSAGUET, J.P. A morphological study of an amphotericin B emulsion-based delivery system. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 145, p. 17-27, 1996.

TADROS, T., IZQUIERDO, P., ESQUENA, J., SOLANS, C. Formation and stability of nano-emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 108, p. 303-318, 2004.

TAPPIN, M.R.R.; PEREIRA, F.G.; LIMA, L.A.; SIANI, A.C.; MAZZEI, J.L.C.; RAMOS, M.F.S. Análise química quantitativa para padronização do óleo de copaíba por cromatografia em fase gasosa de alta resolução **Química Nova**, v.27, n. 2, p. 236- 240, 2004.

TEERANACHAIDEEKUL, V.; SOUTO, E.B.; MÜLLER, R.H.; JUNYAPRASERT, V.B. Physicochemical characterization and in vitro release studies of ascorbyl palmitate-loaded semi-solid nanostructured lipid carriers (NLC gels). **Journal of Microencapsulation**. v. 25, n.2, p. 111-120, 2008.

TEIXEIRA, H.; MARTINI, E., SILVEIRA, A. M.; DUBERNET, C. Preparação e caracterização de nanoemulsões contendo oligonucleotídeos antisense através da técnica de emulsificação espontânea. **Caderno de Farmácia**, v. 18, n. 2, p. 89-93, 2002.

TEOFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Planilhas Eletrônicas para Cálculos de Planejamentos Experimentais. **Química Nova**, v. 29, p. 338–350, 2006.

THEODORIDIS, G.; KOSTER, E.H.M; JONG, G. J.; Solid-phase microextractions for analysis of biological samples. **Journal of Chromatography B**, v. 745, p. 49-82, 2000.

TINCUSI, B.M.; JIMENEZ, I.A.; BAZZOCCHI, I.L.; MOUJIR, L.M.; MAMANI, Z.A.; BARROSO, J.P.; RAVELO, A.G.; HERNANDEZ, B.V. Antimicrobial Terpenoids from the Oleoresin of the Peruvian Medicinal Plant *Copaifera pauper*. **Planta Med.**, v. 68, p. 808-812, 2002.

TRAUL, K. A.; DRIEDGER, A.; INGLE, D. L.; NAKHASI, D. Review of the toxicologic properties of medium-chain triglycerides. **Food and Chemical Toxicology**, v. 38, p.79-98, 2000.

TROTTA, M.; PATTARINO, F.; IGNONI, T. Stability of drug-carrier emulsions containing phosphatidylcholine mixtures. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 53, p. 203-208, 2002.

TSIMELI, K.; TRIANTIS, T.M.; DIMOTIKALI, D.; HISKIA A. Development of a rapid and sensitive method for the simultaneous determination of 1,2-dibromoethane, 1,4-dichlorobenzene and naphthalene residues in honey using HS-SPME coupled with GC-MS. **Analytica Chimica Acta**, v. 617, p. 64-71, 2008.

ULRICH, S. Solid-phase microextraction in biomedical analysis. **Journal of Chromatography A**, v.23, p. 523-530, 2000.

UNITED STATES PHARMACOPEIA 24. The National Formulary 19. The U.S. Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville, USA. 2000.

VALENTE, A. L. P.; AUGUSTO, F. Microextração por fase sólida. **Química Nova**, v. 23, n.4, p. 523-530, 2000.

VARGAS, B. A. **Hidrogéis contendo nanoemulsões de genisteína: Estudos de formulação, permeação e retenção cutânea da genisteína. Dissertação de Mestrado**, Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2010.

VEIGA JR., V.F.; PATITUCCI, M.L.P.; PINTO, A.C. Controle e autenticidade de óleos de copaíba comerciais por cromatografia gasosa de alta resolução. **Química Nova**. v. 20 (6), p. 612-615, 1997.

VEIGA JR. V.F.; ZUNINO, L.; CALIXTO, J. B.; PATITUCCI, M.L.P.; PINTO, A.C. Phytochemical and antioedematogenic studies of commercial copaíba oil available in Brazil. **Phytotherapy Research**. v. 15, p. 476-480, 2001.

VEIGA JR., V.F.; PINTO, A.C. O Gênero *Copaifera* L. **Química Nova**. v. 25 (2), p. 273-286, 2001.

VEIGA JR., V.F.; PINTO, A.C.; MACIEL, M. A. M. PLANTAS MEDICINAIS: CURA SEGURA? **Química Nova**, v. 28 (3), p. 519-528, 2005.

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

VILLANUEVA, S.; VEGAS, A.; FERNANDEZ-ESCUADERO, J.A.; INIGUEZ, M.; RODRIGUEZ-MENDEZ, M.L.; SAJA, J.A. SPME coupled to an array of MOS sensors: Reduction of the interferences caused by water and ethanol during the analysis of red wines. **Sensors and Actuators B**, v. 120, p. 278–287, 2006.

XU, X.; LUO, J. Marangoni flow in an evaporating water Droplet. **Applied Physics Letters**, v. 91, p. 124-132, 2007.

WANG, L.F.; LEE, J.Y.; CHUNG, J.O.; BAIK, J.H.; SO, S.; PARK, S.K. Discrimination of teas with different degrees of fermentation by SPME–GC analysis of the characteristic volatile flavour compounds. **Food Chemistry**, v. 109, p. 196–206, 2008.

WASHINGTON, C. Stability of lipid emulsion for drug delivery. **Advanced Drug Delivery**, v. 20, p. 131-145, 1996.

WOISKY, R.G. **Atividade antiinflamatória, toxicidade e aspectos químicos da óleo-resina de copaíba, proveniente de diferentes espécies e de suas respectivas frações.** Tese (Tese de Doutorado) – Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, USP, 2001.

WOO, P. Cytokine polymorphisms and inflammation. **Clinical en Experimental Pharmacology**, v. 18 (6), p. 767-771, 2000.

YILMAZ, E.; BORCHERT, H. H. Effect of lipid-containing, positively charged nanoemulsions on skin hydration, elasticity and erythema - An in vivo study. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 307, p. 232–238, 2006.

ZHANG, Z; PAWLISZIN, J. Quantitative extraction using an internally cooled Solid-Phase Microextraction device. **Anal. Chem.**, v. 67, p.34-43. 1993.

CAPÍTULO II

Optimisation of headspace solid-phase microextraction for analysis of β -caryophyllene in a nanoemulsion dosage form prepared with copaiba (*Copaifera multijuga* Hayne) oil

Trabalho apresentado na forma de artigo publicado na revista ***Analytica Chimica Acta***
(fator de impacto 4.310)

Neste segundo capítulo teve-se por objetivo o desenvolvimento e a validação de um método indicativo de estabilidade por cromatografia gasosa acoplada a detector de chama utilizando a técnica de microextração em fase sólida no modo headspace (HS-SPME) para a quantificação do β -cariofileno em nanoemulsões contendo o óleo de copaíba. Duas formulações foram preparadas com constituições distintas, por meio de homogeneização à alta pressão, e avaliadas quanto às suas propriedades físico-químicas. As condições de extração foram otimizadas por meio de um planejamento fatorial Box–Behnken 3³, variando-se: tempo de extração, temperatura da amostra durante a extração e efeito da força iônica. Os resultados foram analisados posteriormente por ANOVA ao nível de significância de 5%. Após a otimização do processo de extração, a validação do método analítico foi realizada com base no ICH Harmonized Tripartite Guideline, Q2 (R1), de 2005. Melhores níveis de β -cariofileno no óleo de copaíba foram encontrados quando a extração foi feita sem adição de sal durante o processo, à temperatura de 45°C e após 20 minutos de exposição da fibra. O método apresentou-se linear na faixa de 0,14-0,68 $\mu\text{g/mL}$, sensível, preciso, exato e robusto. Nos testes de degradação forçada que atestaram a especificidade do método, observou-se efeito parcialmente protetor das nanoemulsões sobre a degradação do β -cariofileno.

Optimisation of headspace solid-phase microextraction for analysis of β -caryophyllene in a nanoemulsion dosage form prepared with copaiba (*Copaifera multijuga* Hayne) oil

Daiane de O. Dias^a, Mariana Colombo^a, Regina G. Kelmann^a, Tatiane P. De Souza^b, Valquiria L. Bassani^a, Helder F. Teixeira^a, Valdir F. Veiga Jr.^c, Renata P. Limberger^a, Leticia S. Koester^{a1}

^a *Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Av. Ipiranga, 2752, CEP 90610-000, Brazil.*

^b *Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brazil.*

^c *Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, UFAM, Av. Gal. Rodrigo Octávio, 6.200 - Japiim, 69.079-000, Manaus - AM, Brazil.*

¹ Corresponding author. Tel.: +55 51 33085278; fax: +55 51 33085437.
Email address: leticia.koester@ufrgs.br (L.S. Koester).

Abstract

Recent studies have shown the anti-inflammatory activity of Copaiba oils may be addressed to the high content of β -caryophyllene, the most common sesquiterpene detected, especially in the *Copaifera multijuga* Hayne species. In the present study, nanoemulsions were proposed as a delivery system for copaiba oil in view to treat locally inflamed skin. This article describes the optimization and validation of a stability-indicating SPME-GC method, for β -caryophyllene analysis in the nanoemulsions produced by high pressure homogenization. SPME extraction methods are performed with PDMS (polydimethylsiloxane) fiber (100 μm). Three SPME parameters were evaluated by a three-level-three-factor Box–Behnken factorial design as potentially affecting the technique efficiency. According to the results obtained, the best conditions to extract β -caryophyllene were: (i) sampling temperature of 45 °C, (ii) sampling time of 20 minutes and (iii) no NaCl addition. Results coming from the forced degradation tests showed a reduction of β -caryophyllene peak area when both caryophyllene methanolic solution and nanoemulsions were exposed to acid hydrolysis, UV-A irradiation, oxidative (H_2O_2) and thermolitic (60 °C) conditions. Such reduction occurred in lower extent in the nanoemulsions, suggesting a protective effect of the formulation to β -caryophyllene content. Since no degradation products were detected in the same retention time of β -caryophyllene, the specificity of the method was demonstrated. The method was linear in the range of 0.14 – 0.68 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of β -caryophyllene ($r^2 > 0.999$), and was also validated for precision (R.S.D. ≤ 5.0 %), accuracy (97.85% -101.87%) and robustness. Finally, the method was applied to quantification of β -caryophyllene content in the developed formulations.

Keywords: Copaiba oil, nanoemulsion, β -caryophyllene, headspace solid-phase microextraction, validation

Capitulo III

Nanoemulsions loaded with copaiba oil: screening of composition using fractional factorial design and evaluation of different preparation methods

Trabalho apresentado na forma de artigo visando publicação na revista ***International Journal of Pharmaceutics*** (fator de impacto 3.607)

Neste terceiro capítulo está descrito o estudo de formulação utilizando planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} , onde foram avaliados o efeito da composição do núcleo oleoso e tensoativos sobre as propriedades físico-químicas das nanoemulsões produzidas pelos métodos de homogeneização à alta pressão e emulsificação espontânea. Também foi acompanhada a estabilidade das formulações durante 90 dias a 4 e 25 °C. O planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} demonstrou que o método de homogeneização à alta pressão mostrou ser mais vantajoso para produzir nanoemulsões com óleo de copaíba e que a composição mais adequada da nanoemulsão contém 20% de óleo de copaíba, 10% de TCM, 3% Span 80® e 1% de Tween 20®. Após 90 dias de armazenamento a 4 e 25 °C, a temperatura de 4°C manteve as nanoemulsões com menos sinais de instabilidade e com menor perda da fração volátil do óleo de copaíba. O uso de TCM provou ser uma boa estratégia para fixar a fração volátil do óleo de copaíba em nanoemulsões durante a preparação e o período de armazenamento.

Nanoemulsions loaded with copaiba oil: screening of composition using fractional factorial design and evaluation of different preparation methods

D. de O. Dias^a, M. Colombo^a, R. G. Kelmann^a, S. Kaiser^a, H. F. Teixeira^a, R. P. Limberger^a, V. F. Veiga Jr.^b, L. S. Koester^a

^a *Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.*

^b *Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, UFAM, Manaus - AM, Brazil.*

¹ Corresponding author. Tel.: +55 51 33085278; fax: +55 51 33085437.

Email address: leticia.koester@ufrgs.br (L.S. Koester).

ABSTRACT

Copaiba oil has been widely employed in popular medicine because of its anti-inflammatory properties. The oil is extracted from trees of the genus *Copaifera*, which are found mainly in Brazilian regions of the Cerrado and Amazonian. A study was conducted by a 2^{4-1} Fractional Factorial Design to evaluate the effects of oil core and surfactants composition on physical-chemical properties of nanoemulsions produced by high-pressure homogenization and spontaneous emulsification methods. Moreover, the stability of the formulations stored 4 and 25 °C was monitored during 90 days. The method of the high-pressure homogenization was shown to be the most efficient technique to obtain copaiba oil nanoemulsions. The most suitable nanoemulsion composition was achieved by addition of 20% copaiba oil, 10% medium chain triglycerides, 3% Span 80[®] and 1% Tween 20[®]. After 90 days storage at 4 and 25 °C, the temperature of 4°C maintained nanoemulsions with fewer signs of instability and lower loss of the volatile fraction of the copaiba oil. The use of medium chain triglycerides has proven to be a good strategy to fix volatile fractions of copaiba oil incorporated into nanoemulsions during preparation and storage period.

Keywords: Copaiba oil, nanoemulsion, Fractional Factorial Design, high-pressure homogenization, spontaneous emulsification

CONCLUSÕES GERAIS

- Como resultado da otimização dos parâmetros de extração do β -cariofileno em nanoemulsões contendo óleo de copaíba por HS-SPME-CG utilizando planejamento fatorial Box–Behnken 3^3 , obteve-se que os melhores níveis de β -cariofileno foram encontrados quando a extração foi feita sem adição de sal à temperatura de 45°C e após 20 minutos de exposição da fibra.
- A validação do método analítico de doseamento do β -cariofileno em nanoemulsões mostrou-se linear, preciso, exato e robusto. Nos testes de degradação forçada, observou-se efeito parcialmente protetor das nanoemulsões sobre a degradação do β -cariofileno.
- O estudo de formulação utilizando planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} , onde nanoemulsões foram produzidas pelos métodos de homogeneização à alta pressão e emulsificação espontânea demonstrou que o método de homogeneização à alta pressão mostrou ser mais vantajoso para produzir nanoemulsões com óleo de copaíba e que a composição mais adequada da nanoemulsão contém 20% de óleo de copaíba, 10% de TCM, 3% Span 80[®] e 1% de Tween 20[®].
- Após 90 dias de armazenamento a 4 e 25 °C, a temperatura de 4°C manteve as nanoemulsões com menos sinais de instabilidade e com menor perda da fração volátil do óleo de copaíba.
- O uso de TCM provou ser uma boa estratégia para fixar a fração volátil do óleo de copaíba em nanoemulsões durante a preparação e o período de armazenamento.