



Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia

NANOEMULSÕES DE ÓLEO DE COPAÍBA: DESENVOLVIMENTO E
ANÁLISE DE SUA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

Marina Carvalho Sampaio

Brasília

2022

MARINA CARVALHO SAMPAIO

NANOEMULSÕES DE ÓLEO DE COPAÍBA: DESENVOLVIMENTO E ANÁLISE DE
SUA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Nanociência e Nanobiotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Luís Alexandre Muehlmann

BRASÍLIA

2022

Sampaio, Marina Carvalho

Cn NANOEMULSÕES DE ÓLEO DE COPAÍBA:
DESENVOLVIMENTO E ANÁLISE DE SUA ATIVIDADE ANTI-
INFLAMATÓRIA. / Marina
Carvalho Sampaio; orientador Luís Alexandre Muehlmann. -- Brasília,
2022.

105 p.

Tese (Doutorado - Doutorado em Nanociência e
Nanobiotecnologia) –

Universidade de Brasília, 2022.

1. Oleorresina de copaíba. 2. *Copaifera officinalis*. 3.
Nanoemulsão. 4. Anti-inflamatório. 5. Inflamação. I. Muehlmann, Luís
Alexandre, orient. II. Título.

MARINA CARVALHO SAMPAIO

**NANOEMULSÕES DE ÓLEO DE COPAÍBA: DESENVOLVIMENTO E ANÁLISE DE
SUA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Nanociência e Nanobiotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Luís Alexandre Muehlmann

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luís Alexandre Muehlmann – UnB (Orientador)

Prof.^a Dr.^a Sônia Nair Bao PPGNANO/IB – UnB (Examinadora Interna ao PPGNANO)

Dr.^a Luana Cristina Camargo – UnB (Examinadora Externa)

Dr. Victor Carlos Mello da Silva – UnB (Examinador Interno)

Prof.^a Dr.^a Sandra Milena Leal – Universidad de Santander, Colômbia (Examinadora Suplente)

Dedico este trabalho às duas pessoas mais importantes para mim: minha mãe e Emilia.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos os amigos, em especial Alan, Bruna e Gabriella, e familiares, especialmente tio Artur, que estiveram ao meu lado tanto nos momentos difíceis quanto nos alegres. Sem vocês, este trabalho não seria possível.

Gostaria de agradecer o professor Valdir Florencio da Veiga Junior e equipe por ter colaborado no projeto com a caracterização da oleorresina de copaíba.

Agradeço também a Andréia Camargo Pinheiro por toda a parceria e colaboração nos experimentos. Seu trabalho foi essencial para a finalização deste doutorado. Um muito obrigada de coração!

Outra pessoa importante por abrilhantar o projeto foi a Ariane Pandolfo. Obrigada por ter trabalhado nas micrografias do projeto e também pelas palavras de apoio e incentivo.

O grupo de pesquisa LCBNano foi de suma importância para a realização deste projeto de doutorado, serei sempre agradecida por tudo.

Também gostaria de agradecer a todos os técnicos de laboratório que sempre atendiam as nossas demandas prontamente.

Um muito obrigada a todos os professores e colegas de laboratório pelas conversas edificantes e também pelos momentos de descontração.

Gostaria de agradecer também ao professor Ricardo, que sempre me acolheu muito bem em seu laboratório e confiou em mim para realizar os experimentos. Sem seu aval, nem o mestrado, nem o doutorado seriam possíveis.

Também gostaria de agradecer o meu orientador Luís Alexandre Muehlmann por ter me acolhido tão bem em seu grupo. Sem o seu apoio eu não teria chegado à reta final. Muito obrigada pela confiança, compreensão e por toda a orientação!

Um agradecimento a todos os membros da banca examinadora do trabalho. Obrigada por se disporem a avaliar o projeto e contribuírem com ele.

Um muito obrigada à Universidade de Brasília por ter me proporcionado minha formação desde a graduação e por todo conhecimento que adquiri.

Por fim, gostaria de agradecer à agência CAPES, por conceder a bolsa de doutorado, ao DPG/UnB e às agências CNPq, FAP/DF por fomentar o projeto de doutorado e ao convênio MCT/FINEP/CT – Infra Proinfra – 01/2007 por ter financiado o Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília.

“O importante é não parar de questionar. A curiosidade tem
sua própria razão de existir”

(Albert Einstein)

Lista de figuras

Figura 1 Locais onde a árvore de copaíba pode ser encontrada ao longo do planeta. Fonte: (GBIF, 2022a).....	21
Figura 2 Imagem da árvore de copaíba (<i>Copaifera officinalis</i> L.). Fonte:(Gbif, 2019).....	22
Figura 3 Esquerda, fotografia de uma copaibeira e direita, método de extração da oleorresina que não agride a árvore e a oleorresina de copaíba. Fonte: (Toro Chacon et al., 2019). ...	23
Figura 4 Folhas da <i>Copaifera officinalis</i> . Fonte: (GBIF, 2022b).....	24
Figura 5 Cromatograma obtido por cromatografia gasosa de alta resolução da oleorresina obtida de <i>Copaifera</i> sp L. Os sesquiterpenos foram eluídos entre 8 e 13 minutos, enquanto os diterpenos foram eluídos entre 20 e 26 minutos. Fonte: (Veiga Junior and Pinto, 2002).	29
Figura 6 Fórmulas estruturais dos sesquiterpenos: (A) Fórmulas estruturais dos sesquiterpenos: (A) β -bisaboleno e β -bisabolol; (B) α -copaeno, (C) α -humuleno, (D) cariofileno e (E) α - e β -selineno. Fonte: (Albuquerque et al., 2017).....	30
Figura 7 Principais diterpenos encontrados na oleorresina de copaíba. Fonte: (Veiga Jr, Patitucci and Pinto, 1997).	30
Figura 8 Fórmula estrutural cariofileno. Fonte: Albuquerque et al., 2017).	32
Figura 9 Cromatograma da caracterização da oleorresina de <i>Copaifera officinalis</i> de lote OCOPA-2019.....	36
Figura 10 Representação de tipos de nanopartículas. Fonte: (Khan et al., 2022) com adaptações.	50
Figura 11 Representação esquemática de uma nanopartícula. Fonte: (Khan et al., 2022 com adaptações)	51
Figura 12 Representação de um surfactante e como ele é disposto em uma nanoemulsão. Fonte: (Safaya and Rotliwala, 2020) com modificações.....	55
Figura 13 Representação esquemática dos tipos de emulsão. A letra “A” representa a fase aquosa (azul), enquanto a letra “O” a fase oleosa (amarela). Fonte: (Wilson et al., 2022).	55
Figura 14 Representação dos tipos de desestabilização que uma emulsão pode sofrer de acordo com a teoria DLVO. Fonte: (Wilson et al., 2022 com modificações)	57
Figura 15 Exemplos de tipos de tensoativos usados em nanoemulsões. Fonte: (Wilson et al., 2022 com modificações).	59
Figura 16 Representação esquemática dos tratamentos administrados aos ratos Wistar.....	72
Figura 17 Representação esquemática da administração dos tratamentos nos ratos Wistar dos ensaios in vivo	73
Figura 18 Aparato para teste de pressiómetro eletrônico e a área na qual a ponteira de polipropileno foi aplicada na pata. A) Ratos. a.1) em gaiolas de acrílico; a.2) gaiolas de volume 12x20x17 cm com chão de grade; a.3) espelho abaixo do chão, o qual mostra a	

pata dos animais. B) b.1) uma ponteira de polipropileno encaixada em um transdutor de força, a qual foi aplicada entre os 5 dedos – b.2) pontos pretos.	75
Figura 19 Edema de pata de rato sendo avaliado pelo pletismômetro de Ugo. Fonte: (Pereira et al. 1998).	76
Figura 20 Micrografias de nanogotículas de nanoemulsões à base de óleo de copaíba. A) aumento de 6.000 vezes B) aumento de 11.000 vezes.	80
Figura 21 Fotografias da nanoemulsão à base de oleorresina de copaíba (A) e branco (B) feitos por nosso grupo. As fotos foram tiradas após 1 dia de produção das formulações.	81
Figura 22 Fotografia da nanoemulsão à base de oleorresina de copaíba produzida pelo grupo de Valentim (2017).	81
Figura 23 A) gráfico da estabilidade do diâmetro hidrodinâmico da NeCop por 90 dias, B) gráfico da estabilidade do índice de polidispersão da NeCop por 90 dias e C) gráfico da estabilidade do potencial zeta da NeCop por 90 dias.	82
Figura 24 Aspectos macroscópicos de amostras da nanoemulsão à base de oleorresina de copaíba (A) e de amostras do branco (B) ao longo de 90 dias.	83
Figura 25 Gráficos referentes ao ensaio de MTT do tratamento de 24 horas de NeCop em células J774A.1. A) concentrações de 5, 10 e 15 µg/mL. B) concentrações de 30, 45 e 60 µg/mL e C) concentrações de 90, 180 e 360 µg/mL.	84
Figura 26 Gráfico da integridade de membrana das células J774A.1 após 24h de tratamento com nanoemulsão à base de oleorresina de copaíba.	85
Figura 27 Análise da fragmentação de DNA de células J44A.1 após 24 horas de tratamento com nanoemulsão à base de oleorresina de copaíba. PBS 1X: controle negativo; NeCop: nanoemulsão da oleorresina; Branco: nanoemulsão vazia; ETOH: etanol, controle negativo da oleorresina e OL Cop: oleorresina livre de copaíba.	86
Figura 28 Representação da internalização das nanogotículas de oleorresina de copaíba nas células J744A.1 de macrófago murino	87
Figura 29 Gráfico do número de leucócitos (WBC) – e eritrócitos (RBC) dos ratos Wistar após 21 dias de tratamento com nanoemulsão à base de oleorresina de copaíba nas doses de 100 e 400 mg/mL. (DIP: dipirona, Dexa: dexametasona, OL: oleorresina de copaíba livre, NeCop: nanoemulsão à base de oleorresina de copaíba, Branco: nanoemulsão vazia).	88
Figura 30 Gráfico da porcentagem das células vermelhas (hematócrito) dos ratos Wistar após 21 dias de tratamento com nanoemulsão à base de oleorresina de copaíba nas doses de 100 e 400 m/mL. (DIP: dipirona, Dexa: dexametasona, OL: oleorresina de copaíba livre, NeCop: nanoemulsão à base de oleorresina de copaíba Branco: nanoemulsão vazia).	89
Figura 31 Gráfico da taxa de hemoglobina dos ratos Wistar após 21 dias de tratamento com nanoemulsão à base de oleorresina de copaíba nas doses de 100 e 400 mg/mL. (DIP: dipirona, Dexa: dexametasona, OL: oleorresina de copaíba livre, NeCop: nanoemulsão à base de oleorresina de copaíba Branco: nanoemulsão vazia).	90
Figura 32 Gráfico do plaquetograma dos ratos Wistar após 21 dias de tratamento com nanoemulsão à base de oleorresina de copaíba nas doses de 100 e 400 mg/mL. (DIP:	

dipirona, Dexa: dexametasona, OL: oleorresina de copaíba livre, NeCop: nanoemulsão à base de oleorresina de copaíba, Branco: nanoemulsão vazia).	91
Figura 33 Gráfico da albumina dos ratos Wistar após 21 dias de tratamento com nanoemulsão à base de oleorresina de copaíba nas doses de 100 e 400 mg/mL. (OL: oleorresina de copaíba livre, NeCop: nanoemulsão à base de oleorresina de copaíba Branco: nanoemulsão vazia).....	92
Figura 34 Gráficos da Alanina aminotransferase (ALT) - A - e Aspartato aminotransferase (AST) - B dos ratos Wistar após 21 dias de tratamentos com nanoemulsão à base de oleorresina de copaíba (NeCop) nas doses de 100 e 400 mg/mL. (OL: Oleorresina Livre).	93
Figura 35 Lipidograma de ratos Wistar após 21 dias de tratamento com nanoemulsão à base de oleorresina de copaíba (NeCop) nas doses de 100 de 400 mg/mL. (OL: Oleorresina Livre de copaíba).....	94
Figura 36 Gráfico da Creatinina dos ratos Wistar após 21 dias de tratamento com nanoemulsão à base de oleorresina de copaíba nas doses de 100 e 400 mg/mL. (OL: oleorresina de copaíba livre, NeCop: nanoemulsão à base de oleorresina de copaíba Branco: nanoemulsão vazia).....	96
Figura 37 Gráfico da Glicose dos ratos Wistar após 21 dias de tratamento com nanoemulsão à base de oleorresina de copaíba nas doses de 100 e 400 mg/mL. (OL: oleorresina de copaíba livre, NeCop: nanoemulsão à base de oleorresina de copaíba, Branco: nanoemulsão vazia).....	97
Figura 38 Gráfico da Ureia dos ratos Wistar após 21 dias de tratamento com nanoemulsão à base de oleorresina de copaíba nas doses de 100 e 400 mg/mL. (OL: oleorresina de copaíba livre, NeCop: nanoemulsão à base de oleorresina de copaíba, Branco: nanoemulsão vazia).....	98
Figura 39 Gráfico referente ao efeito nociceptivo dos ratos Wistar após 3 horas de administração de carragenina. (Cg: carragenina, Dip: dipirona, Dexa: dexametasona, OL: oleorresina de copaíba livre, NeCop: nanoemulsão à base de oleorresina de copaíba, BL: nanoemulsão vazia).....	100
Figura 40 Gráfico referente ao edema de pata dos ratos Wistar após 3 horas de administração de carragenina (Cg: carragenina, Dip: dipirona, Dexa: dexametasona, OL: oleorresina de copaíba livre, NeCop: nanoemulsão à base de oleorresina de copaíba, Branco: nanoemulsão vazia).....	101

Lista de Tabelas

Tabela 1 Uso etnofarmacológico da oleorresina de copaíba segundo o conhecimento tradicional. Fonte: (Veiga Junior and Pinto, 2002).	28
Tabela 2 Lista de materiais utilizados na caracterização da oleorresina de copaíba (<i>Copaifera officinalis</i>).	35
Tabela 3 Tabela da composição química dos constituintes da caracterização da oleorresina de <i>Copaifera officinalis</i> , lote OCOPA-2019	37
Tabela 4 Composição química de caracterização da oleorresina de <i>Copaifera officinalis</i> por Souza e colaboradores (2021).	38
Tabela 5 Componentes químicos da caracterização de oleorresina de <i>Copaifera officinalis</i> . Fonte: (Monteschio et al., 2021)	38
Tabela 6 Data e aplicação de alguns dos nanomateriais empregados ao longo da história. Fonte: (Khan et al., 2022).	48
Tabela 7 Lista de materiais utilizados para realizar os experimentos de produção, caracterização e análise de estabilidade da NeCop e os experimentos in vitro	66
Tabela 8 Dados da caracterização em relação ao diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão e potencial zeta da NeCop e do B após um dia de formulados.	77
Tabela 9 Ilustração do Diâmetro Hidrodinâmico, Índice de Polidispersão e Potencial Zeta da nanoemulsão à base de oleorresina de copaíba (NeCop) e da nanoemulsão à base de oleorresina de copaíba do grupo de Valentim (2018) após 7 dias de produzidas.	78
Tabela 10 Diâmetro Hidrodinâmico, Índice de Polidispersão e Potencial Zeta da Nanoemulsão à base de oleorresina de copaíba (NeCop) e da nanoemulsão à base de oleorresina de copaíba do grupo de Lucca (2018).	80

Lista de Siglas

AINE – Anti-inflamatório Não Esteroidal
ALT – Alanina Aminotransferase
AlClPt – Aluminium Chloride Phthalocyanine
ANOVA – Análise de Variância
A/O – Água em Óleo
A/O/A – Água em Óleo em Água
AST – Aspartato Aminotransferase
ATCC - American Type Culture Collection
B – Branco ou nanoemulsão à base de oleorresina de copaíba vazia
BCRJ – Banco de Células do Rio de Janeiro
BD – Becton Dickinson
BHE – Barreira Hematoencefalica
BL – Branco ou nanoemulsão à base de oleorresina de copaíba vazia
CB2 – Receptor Canabinoide do tipo 2
Cg – Carragenina
CIM – Concentração Inibitória Mínima
CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CO₂ – Gás Carbônico
COX – Ciclooxigenase
DAMPs – Padrões Moleculares Associados a Danos
Dexa – Dexametasona
DH – Diâmetro Hidrodinâmico
Dip – Dipirona
DLS – Espalhamento de Luz Dinâmico
DLVO – Teoria da Estabilidade da Dispersão Coloidal
DMEM – Dulbecco's Modified Eagle
DMSO – Dimetil Sulfóxido
DPE – Emulsificação de Fase D
EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
ETOH – Etanol
HFBII – Hidrofobina II
HLE – Elastase de Elucócito Humano

HPH – Homogeneizadores de Alta Pressão
HPLC – High Performance Liquid Chromatography
IPL – Injeção Plantar
J774A.1 – Linhagem celular de macrófagos murinos
LDH - Lipoproteína de Baixa Densidade
LPS – Lipopolissacarídeo
LOX - Lipoxigenase
MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura
MMP – Metaloproteinase de Matrix
MRSA – *Staphylococcus aureus* resistente à metilina
MTT - 3-(4,5dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NCN – Nanoemulsão com Carga Negativa
NeCop – Nanoemulsão à base de Oleorresina de Copaíba (*Copaifera officinalis*)
NF – KB – Fator de Transcrição Nuclear
NO – Óxido Nítrico
NPs – Nanopartículas
O/A – Óleo em Água
O/A/O – Óleo em Água em Óleo
OL – Oleorresina Livre de Copaíba (*Copaifera officinalis*) diluído em etanol
OL Cop – Óleo de Copaíba (*Copaifera officinalis*) diluído em etanol
PAF – Fator de Ativação Plaquetário
PAMPs – Padrões Moleculares Associados a Patógenos
PBS – Tampão Fosfato Salino
PCN – Nanoemulsão com Carga Positiva
Pdl- Índice de Polidispersão
PIC – Composição de Inversão de Fase
PIT – Temperatura de Transição de Fase
PPM – Partes Por Milhão
PPR – Receptores de Reconhecimento de Padrão
PVC – Policloreto de Vinila
PZ – Potencial Zeta
Q.s.p – Quantidade

Suficiente Para

RNase – Ribonuclease

RPM – Rotações Por Minuto

SAS – Antissolvente Supercrítico

SC-CO₂ – Gás Carbônico Supercrítico

SEI – Sistema Eletrônico de Informações

SFB – Soro Fetal Bovino

SFEE – Extração dos Fluidos Supercríticos de Emulsões

SNC – Sistema Nervoso Central

TNF – Fator de Necrose Tumoral

TR – Tempo de Retenção

UFG – Universidade Federal de Goiás

V.O. – Via Oral

Sumário

Agradecimentos	6
Lista de Figuras	8
Lista de Tabelas	11
Lista de Siglas	12
Capítulo 1 – Caracterização da oleorresina de copaíba	18
1.1 Resumo.....	19
1.2 Abstract	19
1.3 Revisão da Literatura.....	20
1.3.1 Introdução.....	20
1.3.2 Uso medicinal.....	24
1.3.2.1 Atividades farmacológicas dos principais sesquiterpenos da oleorresina	25
1.3.2.2 Atividades farmacológicas dos principais diterpenos da oleorresina	27
1.3.2.3 Principais ativos.....	28
1.3.3 Materiais e métodos	35
1.3.3.1 Materiais.....	35
a) Oleorresina de copaíba (<i>Copaifera officinalis</i> L.).....	35
1.3.3.2 Método	35
1.3.4 Resultados de discussão.....	36
1.3.5 Conclusão	39
1.3.6 Referências bibliográficas	38
Capítulo 2 – Nanoemulsões à base da oleorresina de copaíba (<i>Copaifera officinalis</i>) e análise na inflamação <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>.....	44
2.1 Resumo.....	45
2.2 Abstract	46
2.3 Revisão bibliográfica.....	47
2.3.1 Introdução.....	47
2.3.1.1 Nanotecnologia	47
2.3.1.2 Nanopartículas	50
2.3.1.3 Aplicações das nanopartículas em nanomedicina.....	51

2.3.1.4	Nanoformulações anti-inflamatórias	53
2.3.1.5	Emulsões	54
2.3.1.6	Nanoemulsões.....	56
2.3.1.7	Estabilidade de nanoemulsões.....	57
2.3.1.8	Tipos de surfactante	58
2.3.1.9	Fase oleosa	60
2.3.1.10	Métodos de formulação das nanoemulsões	61
2.3.1.10.1	Método de alta energia	61
2.3.1.10.2	Método de baixa energia.....	62
a)	Emulsificação espontânea	62
b)	Composição de Inversão de Fase (PIC)	63
c)	Temperatura de Transição de Fase (PIT)	63
2.3.1.11	Caracterização das nanoemulsões	64
2.3.2	Materiais e métodos	66
2.3.2.1	Materiais.....	66
2.3.2.2	Produção da nanoemulsão à base de oleorresina de copaíba.....	67
2.3.2.3	Análise macroscópica	67
2.3.2.4	Análise das características coloidais.....	67
2.3.2.5	Análise de estabilidades coloidal e macroscópica.....	67
2.3.2.6	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	68
2.3.2.7	Ensaio <i>in vitro</i>	68
a)	Ensaio de viabilidade celular.....	68
b)	Integridade de membrana.....	69
c)	Fragmentação de DNA	69
a)	Exposição da NeCop com as células J774A.1	70
2.3.2.8	Ensaio <i>in vivo</i>	70
a)	Manutenção dos animais.....	70
b)	Indução da inflamação por injeção de carragenina (Cg)	71
c)	Desenho experimental.....	71
d)	Hemograma	73
e)	Análises bioquímicas do soro sanguíneo	73

f) Avaliação dos efeitos antinociceptivos e anti-inflamatório	74
2.3.3 Resultados e discussão.....	76
2.3.3.1 Caracterização e análise de estabilidade da NeCop.....	76
a) Caracterização por DLS da NeCop	76
b) Caracterização morfológica e superfície das nanogotículas da NeCop	80
c) Caracterização Macroscópica da NeCop.....	81
d) Análise de estabilidade por DLS e macroscópica da NeCop.....	81
2.3.3.2 <i>Ensaio in vitro</i>	83
a) Ensaio de viabilidade celular - MTT	83
b) Integridade de membrana plasmática de células J774A.1 de macrófagos murinos.....	85
c) Fragmentação de DNA.....	85
d) Exposição das nanogotículas da NeCop com as células J774A.1.....	86
2.3.3.3 <i>Ensaio in vivo</i>	88
a) Análises hematológicas e sorológicas.....	88
b) Efeitos nociceptivos e anti-inflamatórios	99
2.3.4 Conclusão	103
2.3.5 Referências Bibliográficas	104
Anexo 1- Laudo técnico da oleoresina de copaíba (<i>Copaifera officinalis</i>) da empresa Ferquima.....	112
Anexo 1 – Certificado de autorização para o trabalho com ratos Wistar da Comissão de Ética no Uso Animal da Universidade de Brasília	122
Anexo 3 - Histórico Acadêmico	123

Capítulo 1

Caracterização da oleorresina de copaíba (*Copaifera officinalis* L.)

1.1 Resumo

Registros da oleorresina de copaíba datam de 1534, contudo, os indígenas já tinham conhecimento desta matéria-prima que a árvore de copaíba proporciona. A medicina popular utiliza a oleorresina há bastante tempo. De acordo com o conhecimento tradicional, a oleorresina de copaíba apresenta diversas propriedades etnofarmacológicas como contra a asma, câncer, cistite, sífilis e até mesmo contra a inflamação. O cariofileno é um sesquiterpeno e um dos marcadores da oleorresina. Segundo a literatura, ele apresenta propriedades anti-inflamatórias. Por consequência, a oleorresina apresenta tal característica. O presente capítulo possui, como objetivo, caracterizar a oleorresina de copaíba do lote OCOPA-2019. O composto β -cariofileno foi aquele de maior concentração (59,89%) da oleorresina analisada. Também foram observados outros marcadores da oleorresina em quantidade decrescentena matéria-prima: α -humuleno (10,38), ácido copálico (3,86%), ácido-11-AcO- copálico (3,18%) e o óxido de cariofileno (1,75%) Por conseguinte, pode-se afirmar que a oleorresina é realmente de copaíba e é pura.

Palavras-chave: oleorresina de copaíba, *Copaifera officinalis*, cariofileno, anti-inflamatório, caracterização.

1.2 Abstract

Records of copaíba oleoresin date back to 1534. However, the indigenous people were already aware of this raw material that the copaíba tree provides. Folk medicine has been using oleoresin for a long time. According to traditional knowledge, copaíba oleoresin has several ethnopharmacological properties such as for asthma, cancer, cystitis, syphilis and even inflammation. The caryophyllene is a sesquiterpene and one of the markers of the oleoresin. According to the literature, it has anti-inflammatory properties. This chapter aims to characterize the copaíba oleoresin. The compound β -caryophyllene was one with the highest concentration (59.89%) of the oleoresin analyzed. Other markers of oleoresin in

decreasing quantity were also observed: α -humulene (10.38), copalic acid (3.86%), acid-11-AcO-copalic (3.18%) and caryophyllene oxide (1.75%) All in all, oleoresin is actually from copaíba and is pure.

Keywords: copaíba oleoresin, *Copaifera officinalis*, caryophyllene, anti-inflammatory, characterization.

1.3 Revisão da literatura

1.3.1 Introdução

O primeiro registro da oleorresina de copaíba (*Copaifera officinalis* L.) foi uma carta enviada para o Papa Leão X e publicada em 1534 (Dwyer, 1951; Veiga Junior and Pinto, 2002). Entretanto, muito antes deste registro, os índios, da terra que viria a se tornar o Brasil, já conheciam a oleorresina em questão. Inclusive, o nome copaíba provavelmente possui origem indígena. Ele seria proveniente do tupi cupa-yba, que significa a árvore de depósito, que tem jazida, uma clara referência à oleorresina da árvore (Teodoro Sampaio, 1928; Veiga Junior and Pinto, 2002). Já a oleorresina era denominada de copaíva ou copahu (Veiga Junior and Pinto, 2002) pelo povo Tupi.

Em 1760 o cientista Nicolai Josephi Jacquim descreveu a primeira *Copaifera* como sendo *Copaifera officinalis* Jaq (Jacquin, 1760; Veiga Junior and Pinto, 2002). Já em 1762, o cientista sueco Carl von Linneu a descreveu como somente *Copaifera officinalis* e, por consequência, foi nomeada como a descrição oficial do gênero *Copaifera* L (Veiga Junior and Pinto, 2002). Já em 1825, o professor da Universidade Humboldt de Berlim Friedrich Gottlob Hayne lançou uma monografia deste gênero de árvore e é provavelmente o mais importante documento descritivo da *Copaifera* L. (Veiga Junior and Pinto, 2002; Universidade Humboldt de Berlim, 2022).

A identificação botânica da copaíba é geralmente feita a partir das flores, pubescência, sépalas, comprimento dos anteros e condição glabrosa do pistilo (Veiga Junior and Pinto, 2002). Esta árvore, conhecida popularmente como copaibeira e pau d'óleo, recebe a seguinte classificação: reino, Plantae;

filo, Tracheophyta; classe, Magnoliopsida; ordem, Fabales; família, *Fabaceae* e gênero, *spp.* L. (Desmarchelier, 2010; GBIF, 2022a). Existem 52 espécies conhecidas de copaíba (GBIF, 2022a), sendo que 16 delas são vistas somente no Brasil, onde são encontradas principalmente nas regiões Norte e Centro-Oeste (Veiga Junior and Pinto, 2002). A espécie *C. langsdorfii* Desf. pode ser encontrada por todo o território nacional e apresenta 4 tipos de variedades: *C. langsdorfii* var. *grandifolia*, *grandiflora*, *laxa* e *glabra* (Leite and Lleras, 1993; Veiga Junior and Pinto, 2002).

Além do Brasil, vários países da América, como Venezuela, Colômbia, Panamá e San Salvador, bem como da África, como Congo, Guiné, Angola apresentam a copaibeira (Veiga Junior and Pinto, 2002). A figura 1 é uma representação dos lugares onde exemplares de copaíba podem ser observados no globo.

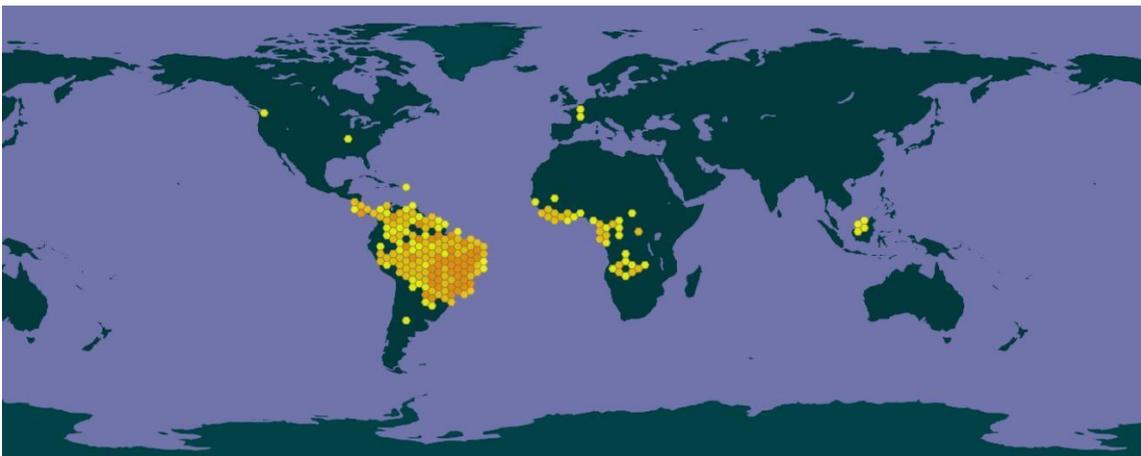


Figura 1 Locais onde a árvore de copaíba pode ser encontrada ao longo do planeta. Fonte: (GBIF, 2022a).

A árvore da copaíba (Figura 2) apresenta crescimento lento e é de grande porte (Vasconcelos *et al.*, 2020), podendo chegar a 40 m de altura e podem viver até 400 anos. Seu tronco é áspero, escuro e o diâmetro pode ser de 0,4 m a 4 m (Veiga Junior and Pinto, 2002).

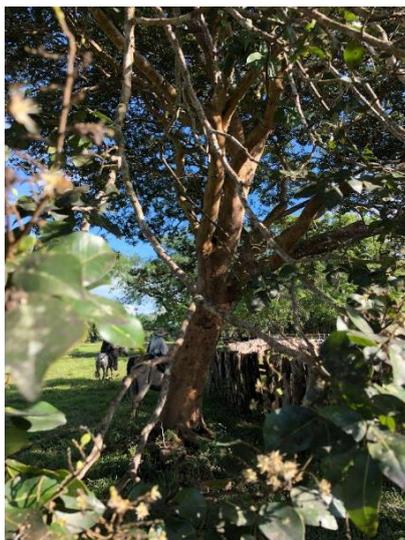


Figura 2 Imagem da árvore de copaíba (*Copaifera officinalis* L.). Fonte:(Gbif, 2019).

A oleorresina de copaíba é encontrada por toda a planta em canais secretores, os quais são formados por uma dilatação de espaços intercelulares que possuem ligação com o meristema. A parte mais saliente do aparelho está no tronco, onde os canais longitudinais ficam agrupados com um traçado irregular, em camadas lenhosas. De acordo com alguns autores, a oleorresina é produto da desintoxicação da planta e tem função de defesa (Alencar, 1982; Veiga Junior and Pinto, 2002)

Os métodos para se extrair a oleorresina são variados. Inicialmente, faziam-se cortes em “V” com machado no tronco, é uma técnica agressiva e deixava a árvore inutilizada. Há somente uma técnica que não é agressiva: faz-se uma incisão com trado a cerca de 1 m de altura do tronco, como pode-se visualizar na Figura 3. Ao final, o orifício é vedado com argila para que parasitas não danifiquem a planta e, assim, pelo mesmo local, pode-se retirar mais oleorresina posteriormente. Uma só árvore, a depender da espécie, é capaz de produzir de 40 a 50 L de oleorresina por ano (Veiga Junior and Pinto, 2002).



Figura 3 Esquerda, fotografia de uma copaibeira e direita, método de extração da oleorresina que não agride a árvore e a oleorresina de copaíba. Fonte: (Toro Chacon et al., 2019).

Povos indígenas de regiões ricas em copaíba utilizam frequentemente a oleorresina de copaíba. Tal fato permitiu que os primeiros médicos no Brasil colônia pudessem trabalhar sem a disponibilidade de vários medicamentos clássicos da Europa. O conhecimento indígena era tão difundido que os viajantes sempre levavam a oleorresina antes de saírem para locais pouco conhecidos (Veiga Junior and Pinto, 2002). A oleorresina é comumente confundida com óleos de outras plantas, principalmente com aquelas do gênero *Eupera*. Entretanto, estes são mais resinosos e esverdeados que aqueles (Veiga Junior and Pinto, 2002).

Na região Amazônica, a utilização da oleorresina é amplamente difundida e, por conta disto, é a planta medicinal mais usada e conhecida pela população local. Devido a tal fato, a oleorresina já foi considerada uma panaceia. Contudo a prescrição de seu uso foi significativamente reduzida após o advento dos antibióticos. Mesmo com essa diminuição, a procura cada vez maior por terapias naturais, bem como a necessidade de descoberta de novos antibióticos, está trazendo os fitoterápicos e seus produtos naturais de volta às prateleiras das farmácias (Veiga Junior and Pinto, 2002).

Uma das espécies mais frequentemente encontradas no mundo é a *Copaifera officinalis* L. Ela está presente no norte do Amazonas, Roraima, Colômbia, Venezuela e Antilhas, por exemplo (Veiga Junior and Pinto, 2002; Veiga Junior et al., 2006). A *Copaifera officinalis* se destaca pelo fato de ser a terceira espécie de copaibeira mais usada no mundo (cerca de 5%) (Veiga Junior and Pinto, 2002). Os folíolos da espécie estão dispostos em 3 ou 4 pares e são

em forma de lança ovalada, com 3,6 a 5,4 cm de extensão. Além disso, a ponta é obtusa acuminada, como pode-se observar na Figura 4. Enquanto as sementes possuem arilo branco (Dwyer, 1951).

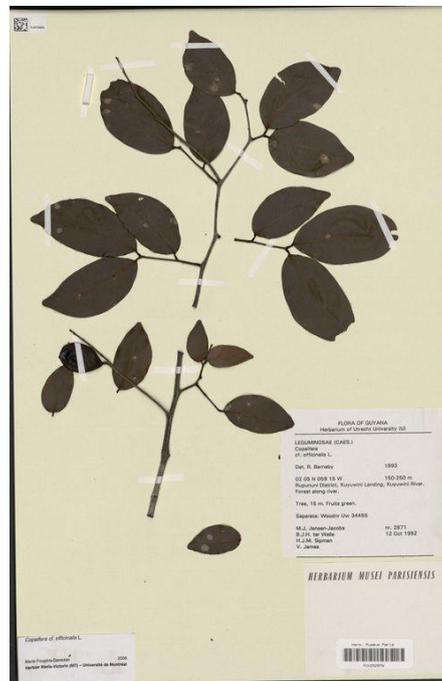


Figura 4 Folhas da *Copaifera officinalis*. Fonte: (GBIF, 2022b).

A disseminação da *Copaifera officinalis* varia conforme a atividade dos agentes dispersores das sementes. Os mais costumeiros agentes são os tucanos, os quais possivelmente têm atenção voltada nas sementes desta espécie devido ao seu arilo de cor amarelada e ao seu odor de cumarina que é exalado (Veiga Junior *et al.*, 2007).

1.3.2 Uso medicinal

A copaíba é fonte de insumos para diversos produtos, como cosméticos, perfumes, materiais fotográficos, biocombustível, tintas vernizes, entre outros (Veiga Junior and Pinto, 2002). O mais importante insumo derivado da copaíba é a oleorresina, a qual tem sido utilizada popularmente há séculos com fins

medicinais. O estado do Amazonas é o principal produtor da oleorresina de copaíba. Em 2017, foram extraídos cerca de 83,9% de toda a oleorresina produzida no país. A importância econômica da copaíba no Amazonas levou à proibição de seu corte por meio do Decreto Estadual nº 25.044/2005 (Governo do Estado do Amazonas, 2005; Vasconcelos *et al.*, 2020).

A oleorresina de copaíba é um exsudado transparente, cuja cor varia do amarelado ao marrom, contendo ácidos resinosos e compostos voláteis, extraído do tronco da árvore. Sua constituição inclui hidrocarbonetos, sesquiterpenos, diterpenos e outros metabólitos secundários (Veiga Junior and Pinto, 2002; Vasconcelos *et al.*, 2020). A sua principal função na planta é a defesa contra microrganismos (Langenheim, 2003; Vasconcelos *et al.*, 2020). Alguns destes compostos, tais como os sesquiterpenos e diterpenos têm efeitos biológicos.

A composição de sesquiterpenos e diterpenos varia de uma espécie para outra de *Copaifera*. Eles estão conectados a vários tipos de atividades biológicas, variando desde propriedades antitumorais até efeitos de embriotoxicidade (Leandro *et al.*, 2012).

Mesmo com a alta variabilidade da composição química da oleorresina de copaíba, geralmente há a presença de β -cariofileno, o qual também geralmente é o principal constituinte da oleorresina (Cascon and Gilbert, 2000; Leandro *et al.*, 2012). Já as espécies *C. paupera*, *C. piresii* e *C. martii* (Zoghbi, Lameira and Oliveira, 2011; Leandro *et al.*, 2012) apresentam como principal componente o α -copaeno. Já o β -bisaboleno foi o principal constituinte nas espécies *C. duckeii* e *C. reticulata* coletadas no Pará (Lameira *et al.*, 2011; Zoghbi *et al.*, 2011; Leandro *et al.*, 2012).

1.3.2.1 Atividades farmacológicas dos principais sesquiterpenos da oleorresina

Vários estudos já demonstraram que os sesquiterpenos são as principais substâncias na oleorresina de copaíba. Por conta disso, muitas propriedades farmacológicas são atribuídas aos principais sesquiterpenos da oleorresina. Deve-se destacar que tais atividades não devem ser atribuídas a somente um composto, já que as substâncias podem interagir sinergicamente e, desta forma, promover as atividades observadas (Leandro *et al.*, 2012).

Os principais sesquiterpenos presentes nas oleorresinas de copaíba são: β -cariofileno, óxido de cariofileno, α -humuleno, δ -cadineno, α -cubebeno, α e β -selineno, β -elemeno, α -copaeno, trans- α -bergamoteno e β -bisaboleno (Leandro *et al.*, 2012).

O β -cariofileno possui propriedades inseticidas (Omolo *et al.*, 2004; Rodilla *et al.*, 2008; Leandro *et al.*, 2012), antimicrobiana (Goren *et al.*, 2011; Leandro *et al.*, 2012), anestésico local (Ghelardini *et al.*, 2001; Leandro *et al.*, 2012), anticâncer (Silva and Yano, 2007; Leandro *et al.*, 2012) e anti-inflamatória (Tung *et al.*, 2008; Chavan, Wakte and Shinde, 2010; Leandro *et al.*, 2012).

O óxido de cariofileno é um artefato oxidativo produzido durante o armazenamento da oleorresina. Ele possui propriedades anti-inflamatórias (Chavan, Wakte and Shinde, 2010; Leandro *et al.*, 2012).

Outros dois sesquiterpenos comuns na oleorresina são o δ -cadineno e o α -cadinol. Foi demonstrado que aquele composto inibiu o crescimento de *Streptococcus mutans* (uma das bactérias causadoras da cárie) e *Propionibacterium acnes* (uma das bactérias causadoras da acne) (Kubo, Muroi and Himejima, 2002; Leandro *et al.*, 2012). Enquanto que este composto, extraído do óleo essencial obtido da fruta do *Schimus molle*, apresentou atividade contra *S. pneumonia* resistente a antibióticos convencionais (Pérez- López *et al.*, 2011; Leandro *et al.*, 2012).

Estudos prévios mostraram que o α -cadinol apresentou atividade antitérmica (Cheng *et al.*, 2004; Leandro *et al.*, 2012), atividade inseticida contra a larva do mosquito da febre amarela e possui citotoxicidade seletiva contra adeno-carcinoma de cólon humano (He *et al.*, 1997; Leandro *et al.*, 2012). Em adição, demonstrou atividade antifúngica contra *C. versicolor* (Chang *et al.*, 2000; Leandro *et al.*, 2012) e *L. sulphureus* (Chang *et al.*, 2000; Cheng *et al.*, 2004; Leandro *et al.*, 2012).

Há também os compostos β -elemeno, δ -elemeno e γ -elemeno, sendo que a primeira substância conta de 60% a 72% destas isoformas (Tan *et al.*, 2011; Leandro *et al.*, 2012). Além disso, é um agente antitumoral de amplo espectro. Foi demonstrado que o β -elemeno é efetivo para câncer de estômago (Liu *et al.*, 2011; Leandro *et al.*, 2012), pulmão (Wang *et al.*, 2005; Leandro *et al.*, 2012) e laringe (Tao *et al.*, 2006; Leandro *et al.*, 2012).

1.3.2.2 Atividades farmacológicas dos principais diterpenos da oleorresina

Os diterpenos mais comuns nas oleorresinas de copaíba são o ácido copálico, o ácido polyalthico, o ácido hardwickiico, o ácido kaurenóico e o ácido ent-kaurenóico e seus derivados: 3-hydroxy-copálico, 3-acetoxycopálico e ent-agático (Leandro *et al.*, 2012).

O ácido copálico foi primeiramente descrito por Nakano and Djerassi (1961). Eles isolaram o composto a partir da resina da planta *Hymenea courbaril*. O ácido copálico é considerado um biomarcador do gênero *Copaifera* e alguns estudiosos pesquisaram os efeitos antibacterianos do composto. O ácido copálico apresentou atividade antibacteriana contra as cepas *B. subtilis*, *S. aureus* e *S. epidermidis* (Tincusi *et al.*, 2002; Leandro *et al.*, 2012).

O ácido hardwickiico é outro diterpeno encontrado na oleorresina da copaíba, o qual é detectado em cerca de 42% das oleorresinas (Veiga, Patitucci and Pinto, 1997; Leandro *et al.*, 2012). Alguns estudos com este ácido foram realizados com o objetivo de avaliar a atividade antimicrobiana. Foi demonstrado que há atividade antibacteriana contra *B. subtilis*, *S. aureus* e *Mycobacterium smegmatis*. Também foi relatado que testes com o ácido hardwickiico, isolado da casca do caule de *Irvingia gabonenses*, inibiu o crescimento de várias espécies de bactérias e fungos (Kuethe *et al.*, 2007; Leandro *et al.*, 2012). Entretanto, em um estudo de 2011, foi observado que o tratamento com o ácido hardwickiico em bactérias multirresistentes gram-negativas não teve nenhum efeito (Kuethe *et al.*, 2011; Leandro *et al.*, 2012).

Já o ácido kaurenóico foi primeiramente descrito por Ferrari e colaboradores (1971), mas, somente em 1998, Braga e colegas detectaram o componente na oleorresina de copaíba (Leandro *et al.*, 2012). Vários estudos farmacológicos foram realizados com este ácido para se determinar alguma atividade deste tipo. Constatou-se que o ácido é um relaxante muscular uterino (Cunha *et al.*, 2003; Leandro *et al.*, 2012), anti-inflamatório (Paiva *et al.*, 2002; Leandro *et al.*, 2012), bactericida (Tincusi *et al.*, 2002; Leandro *et al.*, 2012), possui atividade contra os tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* (Vieira *et al.*, 2002; Leandro *et al.*, 2012) e produz efeitos vasodilatadores (Tirapelli *et al.*, 2004; Leandro *et al.*, 2012).

Outros dois ácidos encontrados na oleorresina de copaíba de *C. reticulata* apresentam atividade larvicida contra as larvas do mosquito *Aedes aegypti*: ácido (-)-3 β -hydroxy-labd-8(17)-13-dien-15-óico e ácido 3- β -acetoxylabd-8(17)- 13-dien-15-óico (Geris *et al.*, 2008; Leandro *et al.*, 2012).

Por último, foi demonstrado que o ácido kovalenol teve uma potente atividade antitumoral contra o carcinoma micropapilar invasivo (tumor murino) em camundongo (Ohsaki *et al.*, 1994; Leandro *et al.*, 2012).

1.3.2.3 Princípios ativos

Na medicina popular, a oleorresina é indicada a diferentes fins terapêuticos. Na Tabela 1 são listadas algumas propriedades etnofarmacológicas da oleorresina de copaíba.

Tabela 1 Uso etnofarmacológico da oleorresina de copaíba segundo o conhecimento tradicional. Fonte: (Veiga Junior and Pinto, 2002).

ÓRGÃO/SISTEMA	INDICADO CONTRA/COMO
TRATO RESPIRATÓRIO	Asma, bronquite, congestão de vias aéreas, inflamações de garganta, hemoptise, pneumonia e sinusite.
TRATO GENITOURINÁRIO	Blenorragia, cistite, incontinência urinária, gonorreia, sífilis
PELE	Dermatite, eczema, psoríase
OUTROS	Afrodisíaco, anticancerígeno, antiofídico, antirreumático, antitetânico, antitumoral (próstata), dor de cabeça, herpes, leishmaniose, leucorreia

No século XVIII, o cronista João Ferreira Rosa foi quem estabeleceu um protocolo de como a oleorresina deve ser aplicada: a quente e em compressas nas partes externas do corpo. Também sugeriu massagens da cabeça, caso o enfermo apresentasse dores de cabeça ou convulsões (Veiga Junior and Pinto, 2002). Entretanto, deve-se tomar cuidado com a administração de altas doses da oleorresina, já que ela pode causar irritação

gastrointestinal, diarreia, sialorreia e depressão do sistema nervoso central (Basile *et al.*, 1988; Veiga Junior and Pinto, 2002).

A composição química da oleorresina de copaíba é descrita em diversos trabalhos, nos quais várias técnicas foram empregadas, desde as mais antigas, até as mais modernas, como cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE, ou HPLC, do inglês *high performance liquid chromatography*, com colunas cromatográficas de fase estacionária quiral (Veiga Junior and Pinto, 2002). Foi observado que a oleorresina é basicamente uma mistura de sesquiterpenos e diterpenos (Patitucci *et al.*, 1995; Veiga Junior and Pinto, 2002). O cromatograma exposto na Figura 5 ilustra a composição típica de uma oleorresina de copaibeira.

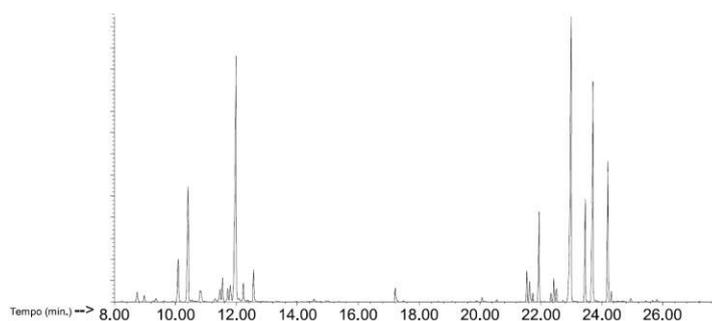


Figura 5 Cromatograma obtido por cromatografia gasosa de alta resolução da oleorresina obtida de *Copaifera sp L.* Os sesquiterpenos foram eluídos entre 8 e 13 minutos, enquanto os diterpenos foram eluídos entre 20 e 26 minutos. Fonte: (Veiga Junior and Pinto, 2002).

Os sesquiterpenos são responsáveis pelo aroma característico da oleorresina. Consequentemente, esta é a fração utilizada na indústria de perfumes. O valor dos sesquiterpenos extraídos da oleorresina chegava a ser 600 vezes maior em comparação com a oleorresina bruta nos anos 2000 (Veiga Junior and Pinto, 2002). Como exemplos de sesquiterpenos encontrados na oleorresina de copaíba, podem-se citar: β -bisaboleno, β -bisabolol, α -copaeno, α -humuleno, cariofileno (o qual é um marcador da oleorresina de copaíba), e α - e β -selineno. A Figura 6 representa a fórmula estrutural dos compostos citados anteriormente.

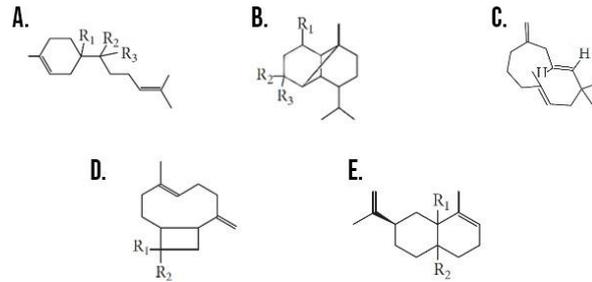


Figura 6 Fórmulas estruturais dos sesquiterpenos: (A) Fórmulas estruturais dos sesquiterpenos: (A) β -bisaboleno e β -bisabolol; (B) α -copaeno, (C) α -humuleno, (D) cariofileno e (E) α - e β -selineno. Fonte: (Albuquerque et al., 2017).

Segundo Veiga Junior and Pinto (2002), ao todo foram encontrados 28 diterpenos em oleorresinas estudadas pelo grupo. O diterpeno ácido copálico foi o único composto encontrado em todas as oleorresinas analisadas. Por conta disto, este ácido é considerado também como um biomarcador deste tipo de óleo (Veiga Jr, Patitucci and Pinto, 1997; Veiga Junior and Pinto, 2002). A Figura 7 representa a fórmula estrutural dos principais diterpenos encontrados na oleorresina de copaíba:

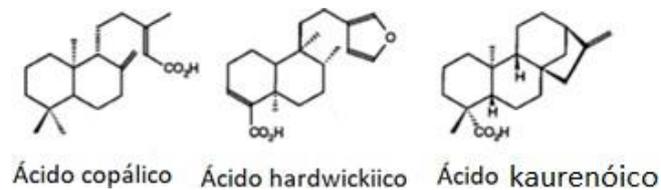


Figura 7 Principais diterpenos encontrados na oleorresina de copaiba. Fonte: (Veiga Jr, Patitucci and Pinto, 1997).

Como não poderia deixar de seguir o padrão de seu gênero, a oleorresina da *Copaifera officinalis* possui diversos empregos para tratar enfermidades, conforme indicado pela medicina popular e por resultados de pesquisas descritos na literatura. Tal produto tem sido registrado como um fitoterápico importante desde o século XVII (Dwyer, 1951). O conhecimento popular tem indicado o uso da oleorresina duas vezes ao dia na área afetada, principalmente para tratar úlceras e feridas em geral. Outra indicação para tratar enfermidades da pele é o uso de uma mistura: para uma parte de óleo, deve-se adicionar de

cinco a dez partes de glicerina para aplicação tópica (Albuquerque *et al.*, 2017; Viana *et al.*, 2011).

Segundo Santos e colaboradores (2008), a oleorresina da espécie em questão apresentou uma boa atividade antibacteriana para bactérias Gram positivas e até mesmo para *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) com concentração inibitória mínima (CIM) de 62,5 a 125 µg/mL. Provavelmente tal resultado foi devido ao ácido hardwickiico que, segundo Veiga Junior and Pinto (2002) e Oliveira e colaboradores (2006), é o principal composto da oleorresina desta espécie.

Outro estudo com resultado importante foi o de Toro Chacon e colaboradores (2019). Eles trabalharam com modelo de gastrite em ratos. A oleorresina foi administrada aos animais e, como controle positivo, foi utilizado o omeprazol. Este medicamento mostrou 97,8% de eficácia, enquanto a oleorresina apresentou 100%. Lâminas histológicas foram feitas e comprovou-se a efetividade da oleorresina como agente gastroprotetor (Arroyo *et al.*, 2009; Toro Chacon *et al.*, 2019).

Apesar de o gênero *Copaifera* já ser descrito há bastante tempo, somente 9 espécies, dentre as mais de 40, já foram estudadas quanto a sua atividade biológica aplicada ao uso da população tradicional. Além disso, em muitos estudos, não há a discriminação entre as várias espécies de copaíba (Leandro *et al.*, 2012)

Vários artigos e estudos relatam que a oleorresina de *Copaifera officinalis* L. apresenta um potencial ou até mesmo possui uma atividade anti-inflamatória. Leandro e colaboradores (2012), Pasquel Reátegui e colaboradores (2018) e Souza e colaboradores (2021) relataram o potencial anti-inflamatório do produto. O primeiro estudo que analisou o potencial anti-inflamatório da oleorresina de copaíba foi desenvolvido por Basile e colaboradores (1988) e conferiu crédito à atividade anti-inflamatória ao demonstrar que o óleo possui propriedades anti-edema. Patas de ratos sofreram indução para inflamação com a substância carragenina (agente inflamatório) (Leandro *et al.*, 2012). Com o tratamento com a oleorresina, houve uma diminuição do edema e, conseqüentemente, da inflamação. Os resultados deste ensaio foram posteriormente confirmados por Veiga e colaboradores (2002). Veiga também relatou que a atividade anti-edema varia conforme a espécie da oleorresina de copaíba (Leandro *et al.*, 2012). Em

outro estudo, observou-se que a oleorresina de *Copaifera officinalis* inibia, *in vitro*, a enzima 5-lipoxigenase, a qual é uma proteína importante da cascata de produção de leucotrienos, importantes eicosanoides envolvidos em respostas inflamatórias (Baylac and Racine, 2003). Um composto responsável, ao menos em parte, pela ação anti-inflamatória da oleorresina é o β -cariofileno (Figura 8). Ele é o composto bioativo com maior concentração na oleorresina e possui caráter anti-inflamatório (Souza, Lima and Sá Silva, 2021). Baylac and Racine (2003). também demonstrou que a oleorresina da *C. officinalis* apresenta atividade inibitória, *in vitro*, para HLE (Elastase de Leucócito Humano), uma protease de neutrófilo e desempenha um importante papel na patogênese em processos inflamatórios.

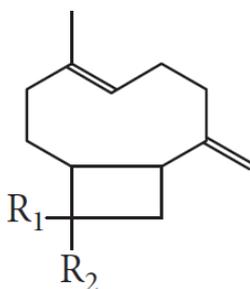


Figura 8 Fórmula estrutural cariofileno. Fonte: Albuquerque et al., 2017).

A atividade anti-inflamatória também foi verificada e comparada em três diferentes espécies: *C. multifuga* Hayne, *C. cearenses* Huber ex Duque e *C. reticulata* Duque. As oleorresinas apresentam composições semelhantes, mas desempenharam diferentes atividades. A pesquisa foi realizada *in vitro* e foi mensurada a produção de Óxido Nítrico (NO) em macrófagos murinos e *in vivo* com a utilização do modelo de camundongo com pleurite induzida. A oleorresina da primeira espécie foi a mais potente e inibiu a produção de NO na concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$. Enquanto que as duas últimas inibiram a produção de NO nas concentrações de 50 $\mu\text{g/mL}$ e 500 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Outro estudo realizado somente com a oleorresina de *C. multifuga* Hayne e suas frações (hexano, dichlorometano e metanólica) mostrou que há atividade anti-inflamatória para edema induzido por carragenina e bradicinina em pata de rato (Veiga Junior et al., 2006; Leandro et al., 2012). Enquanto que o grupo de Brito

(2005) analisou os níveis séricos da ureia e creatinina de ratos que sofreram isquemia e reperfusão renal. Foi observada uma diminuição na permeabilidade vascular e, por consequência, houve uma menor migração de agentes tóxicos para o parênquima renal. Gomes e colaboradores (2010) relataram que esta espécie apresenta propriedades anti-inflamatórias ao inibir as cascatas da histamina e serotonina na inflamação. A oleorresina de *C. dukei* Dweyer também apresentou efeito antiedema em ratos com edema de pata induzido por carragenina (Carvalho *et al.*, 2005; Leandro *et al.*, 2012). As propriedades anti-inflamatórias da *C. officinalis* foram estudadas por Araújo Júnior e colaboradores (2005). Ratos foram submetidos a isquemia hepática e reperfusão para que fossem tratados com a oleorresina e assim, aminotransferases fossem analisadas. Não foi observada nenhuma atividade neste modelo de ensaio anti-inflamatório.

O β -cariofileno e seu óxido (óxido de cariofileno) são sesquiterpenos comumente encontrados na oleorresina de copaíba. Muitos estudos já confirmaram a atividade anti-inflamatória destes compostos (Leandro *et al.*, 2012). Macrófagos estimulados com lipopolissacarídeo (LPS) apresentaram uma diminuição na produção de NO ao serem tratados com β -cariofileno extraído de *Cinnamomun osmophloeum* (Tung *et al.*, 2008; Leandro *et al.*, 2012). Já o óxido de cariofileno demonstrou ser analgésico periférico e central, como também, anti-inflamatório (Chavan, Wakte and Shinde, 2010; Leandro *et al.*, 2012) e em íleo de porco da Índia houve um efeito inibidor das contrações induzidas por histamina (Leandro *et al.*, 2012). β -cariofileno e α -humuleno extraídos do óleo essencial da folha de *Cordia verbenácea* tiveram ação anti-inflamatória sistêmica em edema de pata de rato induzido por carragenina, bradicinina, histamina e fator de ativação plaquetário (PAF). Neste mesmo trabalho, foi observada uma diminuição dos níveis de fator de necrose tumoral (TNF), ainda sem afetar a produção de interleucina-1 (Fernandes *et al.*, 2007; Leandro *et al.*, 2012). A relação de β -cariofileno e α -humuleno com a liberação de mediadores inflamatórios foi observada por Fernandes e colaboradores (2007), assim como a inibição do fator de transcrição nuclear (NF-KB) induzida pela ciclooxigenase-2 (COX-2). Tais compostos também serviram como agentes anti-inflamatórios relacionados à alergia (Rogerio *et al.*, 2009; Leandro *et al.*, 2012).

Já o ácido kaurenóico isolado da *C. langsdorffii* Desf. preveniu o dano tecidual em modelo animal de rato com colite. Tal dado foi comprovado por meio de análise macroscópica, histológica e bioquímica (Paiva *et al.*, 2002a; Leandro *et al.*, 2012).

O controle de qualidade da oleorresina usando compostos bioativos como o β -cariofileno, por exemplo, como marcadores é importante para assegurar que diferentes lotes de oleorresina apresentem efeitos biológicos semelhantes. A qualidade da oleorresina pode ser impactada por diferentes fatores, tais como diferenças fitoquímicas intra e interespécie, características geográficas da área de onde se extraiu a oleorresina, bem como o diâmetro e a porcentagem de cerne no tronco (Vasconcelos *et al.*, 2020). Ainda, existe a possibilidade de se encontrar a oleorresina adulterada, ou seja, misturada a outros tipos de óleos ou até mesmo a diesel (Veiga Junior and Pinto, 2002). Assim, o presente capítulo trata da caracterização fitoquímica do lote de oleorresina de copaíba utilizado em todo este trabalho.

1.3.3 Justificativa e objetivos

O trabalho com matérias-primas naturais, especialmente óleos e oleorresinas requer a verificação da qualidade de tais produtos. Como pode ocorrer adulterações nos produtos comercializados, é realizada uma caracterização para se verificar a pureza dos óleos e oleorresinas. Por conseguinte, o capítulo visa à caracterizar a oleorresina de copaíba (*Copaifera officinalis*) adquirida da empresa Ferquima.

1.3.4 Materiais e métodos

1.3.4.1 Materiais

Tabela 2 Lista de materiais utilizados na caracterização da oleorresina de copaíba (*Copaifera officinalis*).

Material
Alíquota da oleorresina de copaíba (<i>Copaifera officinalis</i> L.)
Trimetilsilildiazometano (TMSD)

a) Oleorresina de copaíba (*Copaifera officinalis* L.)

A oleorresina de copaíba (*Copaifera officinalis* L.) foi fornecida da empresa Ferquima – Vargem Grande Paulista – São Paulo. A extração da oleorresina foi através de destilação a vapor do bálsamo (Anexo 1, página 127). A coloração é característica, de incolor a amarelo palha, é um líquido límpido, isento de impurezas e a concentração de seu marcador biológico β -cariofileno é de 51% (Ferquima, 2022).

1.3.2.2 Método

Em um teste típico, 1 mg da amostra foi deixado para reagir com TMSD para formar metil-ésteres de ácidos orgânicos da oleorresina. Na sequência, essa amostra foi analisada por cromatografia em fase gasosa com detector de massas, no equipamento Trace CG Ultra, hifenado ao espectrômetro ISQ Single Quadruple MS (Thermo Scientific), equipado com auto-amostrador TriPlus RSH e coluna capilar DB5/MS (30 mm x 0,25 mm ID x 0,25 μ m). As amostras foram inseridas no sistema cromatográfico (1 μ L) por meio de injetor a 250 °C, com taxa de divisão 1:20 e vazão de 2 mL/min, utilizando hélio ultrapuro como gás de arraste e detector a 270 °C. As condições de temperatura do forno foram

baseadas numa rampa com início a 90 °C até 160 °C (2,5 °C/min) e de 160 °C a 290 °C (8 °C/min) com uma isoterma final de 5 minutos. As amostras foram ionizadas por impacto de elétrons com energia de 70 eV com varredura de 40 a 400 *uma*.

1.3.5 Resultados e discussão

A Figura 9 representa o cromatograma da caracterização dos constituintes do oleoresina de *Copaifera officinalis* do lote OCOPA-2019. Os tempos de retenção dos compostos observados ficaram entre de 7 e 42 min. O eluido de maior pico, no tempo de retenção (TR) de 11,37 min, representa o composto e biomarcador β -cariofileno. Já o ácido hardwickiico apresentou pico no TR de 37,81 min, tendo valor da área sob a curva de somente de 0,16% no lote verificado, bastante inferior ao do β -cariofileno, cuja área apresentou o maior valor, 59,89%. Tal valor destoou daquele apresentado pelo laudo técnico fornecido pela empresa Ferquima, a qual relatou que a oleoresina possui somente 51% de área de β -cariofileno. Os outros compostos com maior concentração no lote caracterizado foram α -humuleno, cuja área é 10,38% e TR de 12,54 min; ácido copálico, cujo valor da área é de 3,86% e TR de 36,38 min; ácido-11-AcO-copálico, com área de 3,18% e TR de 40,09 min, e, finalmente, o óxido de cariofileno, com área de 1,75% e TR 17,40 min. Todos estes dados também podem ser analisados na Tabela 3.

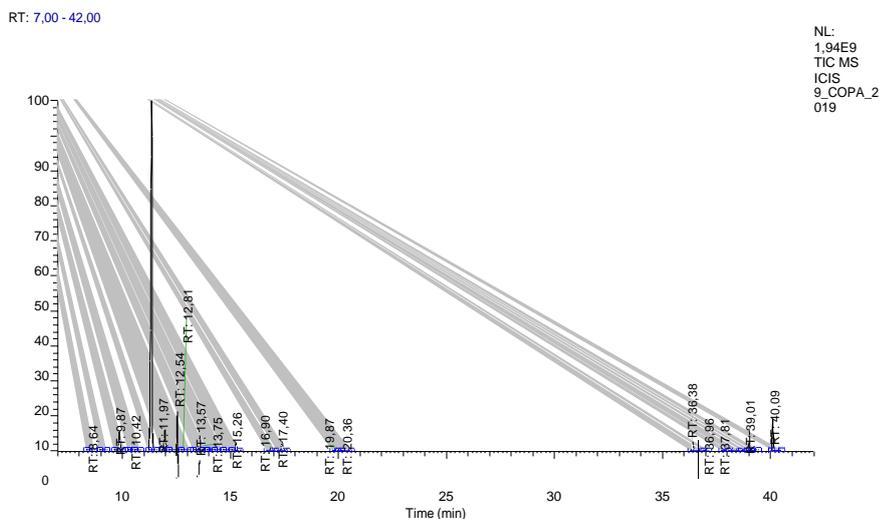


Figura 9 Cromatograma da caracterização da oleoresina de *Copaifera officinalis* de lote OCOPA-2019.

Tabela 3 Tabela da composição química dos constituintes da caracterização da oleorresina de *Copaifera officinalis*, lote OCOPA-2019.

Picos	Constituintes	IR	OCOPA-2019	
			TR	Área (%)
01	δ -Elemeno	1335	8,64	0,38
02	α - Cubebeno	1348	9,02	0,26
03	α -copaeno	1374	9,87	2,80
04	β -elemeno	1389	10,42	0,83
05	Cipereno	1398	10,64	0,26
06	β-cariofileno	1417	11,37	59,89
07	(<i>E</i>)- α -bergamoteno	1432	11,97	3,22
08	α-humuleno	1452	12,54	10,38
09	<i>allo</i> -aromadendreno	1458	12,81	0,38
10	Germacreno D	1480	13,57	3,79
11	β -cis-guaieno	1492	14,14	0,40
12	α -muuroleno	1500	14,37	0,30
13	β -bisaboleno	1505	14,76	0,71
14	δ -cadineno	1522	15,26	1,39
15	Cariofilenol	1570	16,90	0,71
16	Óxido de cariofileno	1582	17,40	1,75
17	Epóxido de humuleno II	1608	-	-
18	Junenol	1618	-	-
19	10- <i>epi</i> - α -muurolol	1640	19,87	0,28
20	δ -cadinol	1644	20,05	0,18
21	α -cadinol	1652	20,36	0,31
22	Ácido copálico	-	36,38	3,86
23	Ácido colavênico	-	36,96	0,14
25	Ácido hardwickiico	-	37,81	0,16
26	Ácido pinifólico	-	38,13	0,19
27	Ácido agático	-	39,01	2,00
28	Ácido-11-OH-copálico	-	39,14	0,51
29	Ácido-11-AcO-copálico	-	40,09	3,18
Constituintes Identificados (%):			98,26	

O β -cariofileno também foi o principal constituinte encontrado por Souza e colaboradores (2021) na oleorresina de *Copaifera officinalis* (Tabela 4), mas em uma quantidade cerca de 10% maior que aquela observada no presente trabalho. Monteschio e colaboradores (2021) também encontraram como principal constituinte o β -cariofileno (Tabela 5). Além da espécie *Copaifera officinalis*, a *Copaifera multijuga* Hayne também apresenta sua oleorresina rica em β -cariofileno e, até mesmo, é a espécie que possui a maior concentração deste biomarcador (Lucca *et al.*, 2015).

Tabela 4 Composição química de caracterização da oleorresina de *Copaifera officinalis* por Souza e colaboradores (2021).

<i>Copaifera officinalis</i>	Composição (%)
β -cariofileno	70
Humuleno	10
α -copaeno	7
Gemacreno d	2
Δ -cadileno	2
β -clemento	1

Tabela 5 Componentes químicos da caracterização de oleorresina de *Copaifera officinalis*. Fonte: (Monteschio *et al.*, 2021)

SUBSTÂNCIA PROVÁVEL	CONCENTRAÇÃO (%)
α -cubebeno	1,0
α -copaeno	5,1
β -elemeno	1,6
β -cariofileno	51,1
α -farneseno	1,8
α -bergamoteno	7,4
α -humuleno	8,1
germacreno-d	2,5
β -bisaboleno	3,7

Tais diferenças na concentração dos componentes da oleorresina de copaíba podem ser devido à época de colheita, local geográfico da planta (Boskovic *et al.*, 2015; Souza, Lima and Sá Silva, 2021a) e época de extração do óleo – se no período da floração ou após (Burt, 2004; Souza, Lima and Sá Silva, 2021a).

1.3.6 Conclusão

A caracterização de um produto natural é de fundamental importância, pois deve-se analisar se a matéria é realmente verdadeira e pura. Para a verificação da oleorresina de copaíba (*Copaifera officinalis*) adquirida do pelo Ferquima, foi feita uma cromatografia gasosa cujo equipamento é acoplado a um espectômetro de massa. O principal composto encontrado na oleorresina foi o β -cariofileno, o que corroborou com os achados descritos em trabalhos de outros grupos. Outros compostos de importância encontrados na oleorresina são, em ordem decrescente de quantidade: α -humuleno, ácido copálico, ácido-11-AcO-copálico e óxido de cariofileno. Tais dados demonstram que a oleorresina analisada é realmente de copaíba e que é pura.

1.3.6 Referências bibliográficas:

ALBUQUERQUE, K. C. O. DE *et al.* Brazilian Amazon Traditional Medicine and the Treatment of Difficult to Heal Leishmaniasis Wounds with *Copaifera*. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine : eCAM**, v. 2017, p. 1–9, 2017.

ALENCAR, J. DA C. Estudos silviculturais de uma população natural de *Copaifera multijuga* Hayne-Leguminosae, na Amazônia Central. 2 - Produção de óleo-resina. **Acta Amazonica**, v. 12, n. 1, p. 75–89, mar. 1982.

ARAÚJO JÚNIOR, F. A. DE *et al.* Efeito do óleo de copaíba nas aminotransferases de ratos submetidos à isquemia e reperfusão hepática com e sem pré-condicionamento isquêmico. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 20, n. 1, p. 93–99, 2005.

ARROYO, J. *et al.* **Copaifera officinalis** oil cytoprotector and antisecretory effects in induced gastric lesions in rats. *Anales de la Facultad de Medicina*. **Anais...**2009. Disponível em: <<https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20103152262>>. Acesso em: 8 jul. 2022

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

BAYLAC, S.; RACINE, P. Inhibition of 5-lipoxygenase by essential oils and other natural fragrant extracts. **International Journal of Aromatherapy**, v. 13, n. 2–3, p. 138–142, 1 jan. 2003.

BOSKOVIC, M. *et al.* Antimicrobial Activity of Thyme (*Tymus vulgaris*) and Oregano (*Origanum vulgare*) Essential Oils against Some Food-borne Microorganisms. **Procedia Food Science**, v. 5, p. 18–21, 1 jan. 2015.

BRITO, M. V. H. *et al.* Copaiba oil effect on urea and creatinine serum levels in rats submitted to kidney ischemia and reperfusion syndrome. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 20, n. 3, p. 243–246, 2005.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223–253, 1 ago. 2004.

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

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

CHANG, S. T. *et al.* Comparison of the antifungal activity of cadinane skeletal sesquiterpenoids from *Taiwania* (*Taiwania cryptomerioides* Hayata) heartwood. **Holzforschung**, v. 54, n. 3, p. 241–245, 13 abr. 2000.

CHAVAN, M. J.; WAKTE, P. S.; SHINDE, D. B. Analgesic and anti-inflammatory activity of Caryophyllene oxide from *Annona squamosa* L. bark. **Phytomedicine**, v. 17, n. 2, p. 149–151, 1 fev. 2010.

CHENG, S. S. *et al.* Antitermitic and Antifungal Activities of Essential Oil of *Calocedrus formosana* Leaf and Its Composition. **Journal of Chemical Ecology** **2004 30:10**, v. 30, n. 10, p. 1957–1967, out. 2004.

CUNHA, K. M. DE A. *et al.* Smooth muscle relaxant effect of kaurenoic acid, a diterpene from *Copaifera langsdorffii* on rat uterus in vitro. **Phytotherapy Research**, v. 17, n. 4, p. 320–324, 1 abr. 2003.

DESMARCHELIER, C. Neotropics and natural ingredients for pharmaceuticals: why isn't South American biodiversity on the crest of the wave? **Phytotherapy Research**, v. 24, n. 6, p. 791–799, 1 jun. 2010.

DWYER, J. D. THE CENTRAL AMERICAN, WEST INDIAN, AND SOUTH AMERICAN SPECIES OF COPAIFERA (CAESALPINIACEAE). **Brittonia**, v. 7, n. 3, p. 143–172, 1951.

FERNANDES, E. S. *et al.* Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. **European Journal of Pharmacology**, v. 569, n. 3, p. 228–236, 27 ago. 2007.

FERNANDES, E. S. *et al.* Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. **European Journal of Pharmacology**, v. 569, n. 3, p. 228–236, 27 ago. 2007.

FERQUIMA. **Laudo técnico óleo essencial de copaíba destilada**. Disponível em: <https://www.ferquima.com.br/novo/produtos/pdf/COPA_DEST%20OE.pdf>. Acesso em: 11 jun. 2022.

GBIF. **Copaifera L.** Disponível em: <<https://www.gbif.org/species/2978115>>. Acesso em: 30 jan. 2022a.

_____. **Copaifera officinalis L.** Disponível em: <<https://www.gbif.org/species/2978155>>. Acesso em:

em: 1 fev. 2022b.

GERIS, R. *et al.* Diterpenoids from *Copaifera reticulata* Ducke with larvicidal activity against *Aedes aegypti* (L.) (Diptera, Culicidae). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 50, n. 1, p. 25–28, jan. 2008.

GHELARDINI, C. *et al.* Local anaesthetic activity of β -caryophyllene. **II Farmaco**, v. 56, n. 5–7, p. 387–389, 1 jul. 2001.

GOMES, N. DE M. *et al.* Characterization of the antinociceptive and anti-inflammatory activities of fractions obtained from *Copaifera multijuga* Hayne. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 128, n. 1, p. 177–183, 2 mar. 2010.

GOREN, A. C. *et al.* Essential oil composition of twenty-two *Stachys* species (mountain tea) and their biological activities. **Phytochemistry Letters**, v. 4, n. 4, p. 448–453, 1 dez. 2011.

GOVERNO DO ESTADO DO AMAZONAS. **SEFAZ/AM - Decreto Estadual 25.044_05**. Disponível em: <https://online.sefaz.am.gov.br/silt/Normas/Legisla%C3%A7%C3%A3o%20Estadual/Decreto%20Estadual/Ano%202005/Arquivo/DE_25044_05.htm>. Acesso em: 31 jan. 2022.

HE, K. *et al.* Bioactive Compounds from *Taiwania cryptomerioides*. **Journal of Natural Products**, v. 60, n. 1, p. 38–40, jan. 1997.

JACQUIN, N. J. **Enumeratio systematica plantarum, quas in insulis Caribaeis vicinaque Americae continente detexit novas, aut jam cognitae emendavit ([Reprod.]) | Gallica. (1760)** Disponível em: <<https://gallica.bnf.fr/ark:/12148/bpt6k96897p>>. Acesso em: 7 mar. 2022.

KUBO, I.; MUROI, H.; HIMEJIMA, M. Antimicrobial activity of green tea flavor components and their combination effects. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, n. 2, p. 245–248, 1 fev. 2002.

KUETE, V. *et al.* Antimicrobial activity of the methanolic extract, fractions and compounds from the stem bark of *Irvingia gabonensis* (Ixonanthaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, n. 1, p. 54–60, 8 out. 2007.

KUETE, V. *et al.* Antibacterial activity of some natural products against bacteria expressing a multidrug-resistant phenotype. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 37, n. 2, p. 156–161, 1 fev. 2011.

LAMEIRA, O. A. *et al.* Seasonal Variation in the Volatiles of *Copaifera duckei* Dwyer Growing Wild in the State of Pará—Brazil. <http://dx.doi.org/10.1080/10412905.2009.9700124>, v. 21, n. 2, p. 105–107, 2011.

LANGENHEIM, J. H. The Production of Resin by Plants. *In: Plant Resins: Chemistry, Evolution, Ecology, and Ethnobotany*. Portland: Timber Press, 2003. p. 23–50.

LEANDRO, L. M. *et al.* Chemistry and Biological Activities of Terpenoids from Copaiba (*Copaifera* spp.) Oleoresins. **Molecules**, v. 17, n. 4, p. 3866, abr. 2012.

LEITE, A. M. C.; LLERAS, E. ÁREAS PRIORITÁRIAS NA AMAZÔNIA PARA CONSERVAÇÃO DOS RECURSOS GENÉTICOS DE ESPÉCIES FLORESTAIS NATIVAS: FASE PRELIMINAR. **Acta Botânica Brasileira**, v. 7, n. 1, p. 61–94, 1993.

LIU, J. *et al.* β -Elemene-induced autophagy protects human gastric cancer cells from undergoing apoptosis. **BMC Cancer**, v. 11, n. 1, p. 1–10, 20 maio 2011.

LUCCA, L. G. *et al.* Determination of β -caryophyllene skin permeation/retention from crude copaiba oil (*Copaifera multijuga* Hayne) and respective oil-based nanoemulsion using a novel HS-GC/MS method. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 104, p. 144–148,

10 fev. 2015.

MONTESCHIO, J. DE O. *et al.* Effect of copaíba essential oil (*Copaifera officinalis* L.) as a natural preservative on the oxidation and shelf life of sheep burgers. **PLoS ONE**, v. 16, n. 3 March, p. 1–16, 1 mar. 2021.

OHSAKI, A. *et al.* The isolation and in vivo Potent Antitumor activity of clerodane diterpenoid from the oleoresin of the brazilian medicinal plant, *copaifera langsdorfi* desfon. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 4, n. 24, p. 2889–2892, 22 dez. 1994.

OMOLO, M. O. *et al.* Repellency of essential oils of some Kenyan plants against *Anopheles gambiae*. **Phytochemistry**, v. 65, n. 20, p. 2797–2802, 1 out. 2004.

PAIVA, L. A. F. *et al.* Anti-inflammatory effect of kaurenoic acid, a diterpene from *Copaifera langsdorffii* on acetic acid-induced colitis in rats. **Vascular Pharmacology**, v. 39, n. 6, p. 303–307, 1 dez. 2002a.

PASQUEL REÁTEGUI, J. L. *et al.* Production of copaiba (*Copaifera officinalis*) oleoresin particles by supercritical fluid extraction of emulsions. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 140, p. 364–371, 1 out. 2018.

PATITUCCI, M. L. *et al.* Utilização de Cromatografia Gasosa de Alta Resolução na detecção de classe de terpenos em extratos brutos vegetais. **Química Nova**, v. 18, n. 3, p. 262–266, 21 mar. 1995.

PÉREZ-LÓPEZ, A. *et al.* Activity against *Streptococcus pneumoniae* of the Essential Oil and δ -Cadinene Isolated from *Schinus molle* Fruit. <http://dx.doi.org/10.1080/10412905.2011.9700477>, v. 23, n. 5, p. 25–28, 2011.

ROGERIO, A. P. *et al.* Preventive and therapeutic anti-inflammatory properties of the sesquiterpene α -humulene in experimental airways allergic inflammation. **British Journal of Pharmacology**, v. 158, n. 4, p. 1087, out. 2009.

SANTOS, A. O. dos *et al.* Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 3, p. 277–281, 2008.

SILVA, S. L. DA; FIGUEIREDO, P. M. S.; YANO, T. Chemotherapeutic potential of the volatile oils from *Zanthoxylum rhoifolium* Lam leaves. **European Journal of Pharmacology**, v. 576, n. 1–3, p. 180–188, 8 dez. 2007.

SOUZA, I. I. M. DE S.; LIMA, R. L. F. A.; SÁ SILVA, C. DE. Revestimento bioativo à base de fécula de mandioca (*Manihot esculenta*) e beterraba acrescido de óleo de copaíba balsamo (*Copaifera officinalis*) para conservação de carne bovina in natura. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 2, p. 1–13, 9 fev. 2021a.

TAN, W. *et al.* Anti-cancer natural products isolated from chinese medicinal herbs. **Chinese Medicine**, v. 6, n. 27, p. 1–15, 2011.

TAO, L. *et al.* Elemene displays anti-cancer ability on laryngeal cancer cells in vitro and in vivo. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 58, n. 1, p. 24–34, 10 nov. 2006.

TEODORO SAMPAIO. **O Tupi na Geografia Nacional**. 3. ed. [s.l.: s.n.].

TINCUSI, B. M. *et al.* Antimicrobial terpenoids from the oleoresin of the Peruvian medicinal plant *Copaifera paupera*. **Planta Medica**, v. 68, n. 9, p. 808–812, 1 set. 2002.

TIRAPELLI, C. R. *et al.* Analysis of the mechanisms underlying the vasorelaxant action of kaurenoic acid in the isolated rat aorta. **European Journal of Pharmacology**, v. 492, n. 2–3, p. 233–241, 25 maio 2004.

TORO CHACON, L. C. *et al.* Uso de los recursos de la biodiversidad: estudio de caso de la oleorresina de copaiba (*copaifera* spp.) en la medicina tradicional en el departamento del Meta - Colombia. **Revista de Investigación Agraria y Ambiental**, v. 11, n. 1, p. 53–64, 11 dez. 2019.

TUNG, Y. T. *et al.* Anti-inflammation activities of essential oil and its constituents from indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*) twigs. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 9, p. 3908–3913, 1 jun. 2008a.

UNIVERSIDADE HUMBOLDT DE BERLIM. **Biografie, Friedrich Gottlob Hayne**. Disponível em: <<https://www.sammlungen.hu-berlin.de/objekte/-/16100/>>. Acesso em: 7 mar. 2022.

VASCONCELOS, R. G. *et al.* Análise da oferta de oleoresina de copaíba (*Copaifera* spp.) no Brasil e do dinamismo do valor da produção. **Diversitas Journal**, v. 5, n. 2, p. 684–692, 6 abr. 2020.

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

VEIGA JUNIOR, V. F. *et al.* The inhibition of paw oedema formation caused by the oil of *Copaifera multijuga* Hayne and its fractions. **The Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 58, n. 10, p. 1533–1543, 18 fev. 2006.

____. Constituintes das sementes de *Copaifera officinalis* L. **Acta Amazonica**, v. 37, n. 1, p. 123–126, 2007.

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

VEIGA, V. F.; PATITUCCI, M. L.; PINTO, A. C. Controle de autenticidade de óleos de copaíba comerciais por cromatografia gasosa de alta resolução. **Química Nova**, v. 20, n. 6, p. 612–615, nov. 1997.

VIANA, C. A. DOS S. *et al.* Plantas da Amazônia: 450 espécies de uso geral. *In*: RIOS, M. N. DA S.; PASTORE JÚNIOR, F. (Eds.). **Plantas da Amazônia: 450 espécies de uso geral**. Brasília: Universidade de Brasília, Biblioteca Central, 2011. p. 2541–2543.

VIEIRA, H. S. *et al.* Novel derivatives of kaurenoic acid: Preparation and evaluation of their trypanocidal activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 13, n. 2, p. 151–157, 2002.

WANG, G. *et al.* Antitumor effect of β -elemene in non-small-cell lung cancer cells is mediated via induction of cell cycle arrest and apoptotic cell death. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS** 2005 62:7, v. 62, n. 7, p. 881–893, abr. 2005.

ZOGHBI, M. D. G. B. *et al.* Chemical Variation in the Volatiles of *Copaifera reticulata* Ducke (Leguminosae) Growing Wild in the States of Pará and Amapá, Brazil. <http://dx.doi.org/10.1080/10412905.2009.9700228>, v. 21, n. 6, p. 501–503, 2011.

ZOGHBI, M. D. G. B.; LAMEIRA, O. A.; OLIVEIRA, E. C. P. Seasonal Variation of Oleoresin and Volatiles from *Copaifera martii* Hayne Growing Wild in the State of Pará, Brazil. <http://dx.doi.org/10.1080/10412905.2007.9699316>, v. 19, n. 6, p. 504–506, 2011.

Capítulo 2

Nanoemulsões à base da oleorresina de copaíba (*Copaifera officinalis*): desenvolvimento, caracterização e análise de sua atividade anti-inflamatória

2.1 Resumo

A nanociência e a nanotecnologia têm acompanhado a vida das pessoas há cerca de 4.500 anos A.C., mas somente 63 anos atrás tais áreas começaram a ser cientificamente estudadas. Suas aplicações são diversas, a tecnologia pode ser encontrada na indústria têxtil, eletrônica, farmacêutica, de pesticidas e em muitas outras. As estruturas nanotecnológicas são denominadas de nanopartículas e apresentam diversos tipos para diversas finalidades. Um dos principais empregos, se não o principal, das nanopartículas é na nanomedicina. Um exemplo de nanopartícula bastante empregada na nanomedicina é a nanoemulsão. Tal formulação é interessante, pois possibilita uma maior solubilidade de substâncias lipofílicas em meios aquosos e, dessa forma, aumenta a biocompatibilidade destes compostos. O presente capítulo visa à descrição da produção de uma nanoemulsão à base de oleorresina de copaíba – NeCop (*Copaifera officinalis*) bem como sua caracterização, análise de estabilidade, interação com células de macrófagos murinos J774A.1 *in vitro* e análise anti-inflamatória *in vivo* de ratos Wistar. Podem-se citar como resultados a produção da nanoemulsão à base de oleorresina de copaíba (NeCop) bem como sua estabilidade em relação a aspectos das nanogotículas e macroscópicos. Também podem-se citar a obtenção de micrografias de alta resolução das nanogotículas da NeCop em microscópio eletrônico de varredura, a viabilidade celular de macrófagos da linhagem J774A.1, a qual apresenta um pequeno aumento quando foram tratados com as concentrações menores das formulações, e o tratamento não leva a uma ruptura da membrana plasmática. Além disso, os ratos apresentaram desidratação e não apresentaram um efeito anti-inflamatório em seus membros pélvicos.

Palavras-chave: nanotecnologia, nanoemulsão, caracterização, macrófagos, anti-inflamatório, rato.

2.2 Abstract

Nanoscience and nanotechnology have been presented in people's lives for about 4,500 years B.C. However, only 63 years ago such areas began to be actually studied. Its applications are diverse, the technology can be found in the textile, electronics, pharmaceutical, pesticide and many others industries. Nanotechnological structures are called nanoparticles and have several types for various purposes. One of the main goals, if not the most important, of nanoparticles is in nanomedicine. An example of nanoparticle widely used in nanomedicine is nanoemulsion. This formulation is interesting because it allows a greater solubility of lipophilic substances in aqueous media and, thus, increases the bioviability of these compounds. This chapter aims to describe the production of a nanoemulsion based on copaíba oleoresin - NeCop- (*Copaifera officinalis*) as well as its characterization, stability analysis and interaction with cells of murine macrophages J774A.1 *in vitro*. The results of the nanoemulsion based on copaíba oleoresin (NeCop) as well as its stability regarding nanodrops and macroscopic aspects can be cited. It must be highlighted the acquirance of high-resolution micrographs of NeCop nanodropletles under a scanning electron microscope, the cellular viability of macrophages of J774A.1 presents a small increase when they were treated with the lower concentrations of the formulations and the treatment does not lead to a rupture of the plasmatic membrane. In addition, rats did not gain mass with treatments, presented dehydration and did not present an anti-inflammatory effect on their pelvic limbs.

Keywords: nanotechnology, nanoemulsion, characterization, macrophages, anti-inflammatory, rat.

2.3 Revisão bibliográfica

2.3.1 Introdução

2.3.1.1 Nanotecnologia

A nanotecnologia visa a desenvolver produtos estruturados na escala nanométrica ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$) que, por essa característica, tenham propriedades diferentes e superiores às dos materiais não nanoestruturados. Materiais com pelo menos uma dimensão na escala nanométrica apresentam, muitas vezes, propriedades ópticas, químicas, farmacodinâmicas, entre outras, que diferem sensivelmente das observadas na matéria-prima não nanotecnológica. Segundo Leopoldo & Vechio (2020), o grande diferencial da escala nanométrica é justamente a presença destas funcionalidades e características diferenciadas. Propriedades como coloração, condutividade, reatividade e ponto de fusão podem ser significativamente diferentes das observadas na substância original (Leopoldo and Vechio, 2020).

O conceito moderno de nanotecnologia data de 29 de dezembro de 1959 (Schulz, 2018), ano no qual o físico laureado com Nobel de Física Richard Feynman proferiu a sua célebre palestra, “There’s plenty of room at the bottom”, na Sociedade Americana de Física. Esta é considerada a primeira palestra em relação às tecnologias que visavam a estudar e desenvolver materiais organizados racionalmente em um nível atômico (Schulz, 2018). Nesta palestra, Feynman lançou a pergunta “Por que não podemos escrever os 24 volumes inteiros da Enciclopédia Britânica na cabeça de um alfinete?” (Feynman, 1960).

A resposta de como miniaturizar as informações de tal enciclopédia para que caibam na cabeça do alfinete está justamente na nanotecnologia, a tecnologia que é capaz de ordenar moléculas e átomos para que os materiais tenham propriedades emergentes da nanoescala. Entretanto, foi somente a partir de 1974 que a palavra “nanotecnologia” foi utilizada e definida. O cientista Norio Taniguchi relatou que a nanotecnologia basicamente consiste no

processamento, separação, consolidação e deformação de materiais no nível molecular ou atômico (Taniguchi, Arakawa and Kobayashi, 1974; Bayda *et al.*, 2020). O prefixo “nano” é proveniente do latim “nanus” e do grego “nanos”, e significa “anão” (Riehemann *et al.*, 2009). Já um significado para nanotecnologia mais atual seria, em termos gerais, a união da ciência, engenharia e tecnologia para manipular a matéria em escala nanométrica, em pelo menos uma de suas dimensões (Zhu *et al.*, 2021).

Apesar de a nanociência e a nanotecnologia terem surgido em meados do século passado, materiais nanoestruturados têm sido desenvolvidos e utilizados pela humanidade há milênios, como expresso na Tabela 6 .

Tabela 6 Data e aplicação de alguns dos nanomateriais empregados ao longo da história. Fonte: (Khan *et al.*, 2022).

Época	Nanomaterial usado	Aplicação
4500 anos atrás	Nanofibras naturais de asbestos	Reforço de matrizes de cerâmica
4500 anos atrás (egípcios)	Síntese química de nanopartículas de sulfeto de chumbo com cerca de 5 nm	Decoração
3º século antes da Era Comum – EC- (Egito, Mesopotâmia, Grécia e Roma)	“Azul egípcio”, vidro de tamanho nanométrico e quartzo	Nanomateriais sintéticos para aplicação prática
14º e 13º séculos da EC (Egípcios e Mesopotâmicos)	Nanopartículas nanometálicas via métodos químicos	Nanomateriais sintéticos em uma aplicação prática
Era do Bronze (1200-1400 antes da EC)	Nanopartículas de cobre	O vidro foi encontrado na Frattesina di Rovigo (Itália) que é colorido pela excitação plasmônica de superfície
400-100 antes da EC	Nanopartículas de cobre e óxido de cobre	Revestimento vermelho céltico para decoração
4º século	Liga de nanopartícula de prata e ouro	Peça de vidro romano
Período Medieval	Nanopartículas coloidais de ouro e prata	Tintura de vidro vermelha e amarela

Século 9º, Mesopotâmicos	Nanopartículas de prata ou cobre (5 a 20 nm) ou combinação de ambas	Cerâmicas vítreas para decoração metálica de lustre
Metade do século XIX	Nanopartículas de cobre	Clareamento do vidro Satsuma com cor rubi
1857 (Michael Faraday)	Solução coloidal de nanopartícula de ouro	Início da história dos nanomateriais na área científica
Década de 1940	Nanopartículas de dióxido de silício	Substituição do carvão preto para reforço de borracha
2003 (Samsung)	Nanopartículas de prata	Tecnologia antibacteriana com nome de mercado “Silver Nano” (inicia-se a comercialização de nanopartículas e nanomateriais)
A partir de 2014	Materiais com nanopartículas	Produtos que são comercialmente disponíveis em mais de 20 países.

Atualmente, diversos nanomateriais estão presentes em produtos comerciais, tais como as televisões da marca LG com a tecnologia NanoCell (LG, 2022), o antioxidante hidratante com nano vitamina C da marca Sallve (Sallve, 2022), o creme de massagem Cafeína 7 ativos, da marca D’água Natural, o qual possui nanopartículas de café (D’água Natural, 2022) e a empresa Nanox, que trabalha com antimicrobianos e nanopartículas que contenham tais classes de medicamentos, fabrica tecidos com tecnologia contra SARS-CoV-2 (Nanox, 2022a), desenvolve embalagens com antimicrobianos em nanopartículas (Nanox, 2022b) e também desenvolve utensílios de casa e higiene com a tecnologia de nanopartícula com antimicrobianos (Nanox, 2022c).

2.3.1.2 Nanopartículas

A fabricação de materiais na nanoescala ganhou maior atenção a partir da década de 2000, devido a suas características únicas (Li, Wang and Cheng, 2017; Khan et al., 2022). A estrutura química, tamanho, forma e aparência das nanopartículas podem ser determinadas no processo de formulação (Khan et al., 2022). A riqueza de processos e materiais desenvolvidos para a produção de nanopartículas é refletida pelo grande número de tipos destas nanoestruturas, conforme os exemplos apresentados na Figura 10. Deve-se ressaltar que devido ao tamanho característico dessas partículas, elas apresentam uma maior área de superfície em relação ao seu volume quando comparadas com os materiais cujo tamanho encontram-se em maior escala (Yanga, Cao and Rui, 2017; Khan et al., 2022).



Figura 10 Representação de tipos de nanoestruturas. Fonte: (Khan et al., 2022) com adaptações.

Dentre as estruturas nanométricas mais estudadas estão as nanopartículas. Este tipo de material possui diâmetro médio na faixa entre 1 e 1000 nm, e pode ser feito de carbono, metal, óxidos metálicos ou de compostos orgânicos, por exemplo. A Figura 11 apresenta um esquema da estrutura de uma nanopartícula. Comparada com partículas micrométricas, as nanopartículas possuem maior relação área de superfície/volume (Gudikandula and Charya Maringanti, 2016; Khan *et al.*, 2022).

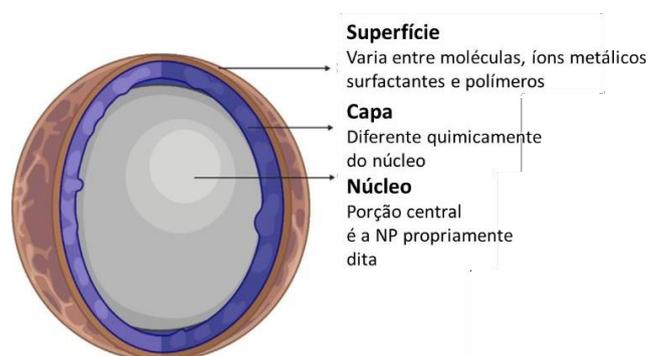


Figura 11 Representação esquemática de uma nanopartícula. Fonte: (Khan *et al.*, 2022 com adaptações).

2.3.1.3 Aplicações das nanopartículas em nanomedicina

As aplicações de nanoformulações são determinadas por suas características físico-químicas. Por exemplo, nanopartículas com propriedades elétricas e ópticas emergentes da nanoescala são usadas em semicondutores, diodos emissores de luz (LEDs), baterias, sensores e biofotônica (Messarah *et al.*, 2012; Alghuthaymi *et al.*, 2015; Khan *et al.*, 2022). Nanopartículas com propriedades magnéticas são empregadas em catalisadores, biomedicina, fluidos magnéticos, armazenamento de dados, ressonância magnética de imagem (RMI) e purificação de água e sal (Khot *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 2015; Jeevanandam *et al.*, 2018; Khan *et al.*, 2022). Já as nanopartículas com propriedades mecânicas especiais são utilizadas na tribologia, engenharia de superfície e materiais de construção e pintura (Jeevanandam *et al.*, 2018; Khan, Saeed and Khan, 2019; Khan *et al.*, 2022). Por fim, nanopartículas com

propriedades térmicas especiais são úteis à formulação de nanofluidos (Khan *et al.*, 2022).

Uma área de grande aplicação da nanotecnologia é a da ciências da vida. Nessa área, a nanotecnologia é subdividida em algumas modalidades, como a nanobiotecnologia e a nanomedicina. Esta foca na aplicação da nanotecnologia na área médica, enquanto aquela abrange a pesquisa básica no âmbito nanoscópico em sistemas biológicos. A nanomedicina usa a nanotecnologia como ferramenta para a melhora de terapias e diagnósticos de diferentes enfermidades (Riehemann *et al.*, 2009).

Uma das áreas da medicina que vem sendo positivamente impactada pela nanotecnologia é a oncologia. As terapias tradicionais contra o câncer, como a quimioterapia, radioterapia e cirurgia, apresentam várias limitações. Por exemplo, a aplicação da quimioterapia muitas vezes é limitada por fatores como distribuição sistêmica inespecífica dos fármacos, janelas terapêuticas estreitas dos quimioterápicos, baixa seletividade em relação às células-alvo, entre outros. Nanoformulações oferecem o potencial de melhorar esses aspectos da quimioterapia. Por exemplo, nanopartículas podem aumentar o índice terapêutico do fármaco ao baixar o seu nível de toxicidade a tecidos não alvo e aumentar a sua entrega ao tumor (Zhang and Kohane, 2021). Ainda, a nanotecnologia pode ser empregada no diagnóstico de cânceres, permitindo a detecção mais precoce de tumores (Chatterjee and Kumar, 2022).

A nanomedicina também oferece soluções para terapias contra doenças causadas por vírus. Infecções virais são uma das principais causas de morbidade e mortalidade no mundo (Lozano *et al.*, 2012; Watkins, 2018; Weiss *et al.*, 2020; WHO, 2020). A nanotecnologia é empregada para o desenvolvimento de novas ferramentas de entrega de fármaco e para o combate de vírus patogênicos. Um exemplo recente é o seu uso contra o coronavírus da síndrome respiratória severa e aguda 2 (SARS-Cov-2), agente etiológico da doença do coronavírus de 2019 (COVID-19). Em março de 2020, a Organização Mundial da Saúde declarou que o mundo estava em uma pandemia de COVID-19. Em maio do mesmo ano, cerca de 185 países indicaram a presença deste vírus em seu território. Em tempo recorde, foram desenvolvidos medicamentos, vacinas, “kits” de diagnóstico, filtros extremamente finos para máscaras faciais,

entre outros, que auxiliaram no combate desse problema de saúde pública (Li, 2020; Weiss *et al.*, 2020; Tenchov, 2021).

A indústria farmacêutica também tem se beneficiado da nanotecnologia, visto que esta possibilita o desenvolvimento de medicamentos com menos efeitos adversos, mais eficazes, e com melhores formas de administração (Zare *et al.*, 2013; Khan *et al.*, 2022). Por definição, nanomedicamento é o sistema de entrega de fármaco de tamanho em escala dos nanômetros, que pode conter fármaco ou agente de contraste para exame ou ambos em uma única formulação e são desenhados para alcançarem especificamente o sítio de ação (Lammers *et al.*, 2012). Com um nanomedicamento, pode-se gerenciar o tamanho e a superfície das partículas e a liberação dos princípios ativos e, assim, pode ser alcançada uma atividade terapêutica mais sítio-específica e perfil farmacodinâmico mais adequado (Mrinmoy De, Ghosh and Rotello, 2008; Vekariya, Kaur and Tikoo, 2012; Khan *et al.*, 2022).

2.3.1.4 Nanoformulações anti-inflamatórias

A inflamação é uma resposta fisiológica contra determinadas perturbações na estrutura e na fisiologia de tecidos. Em geral, sua resposta envolve edema, dor, rubor e calor no local afetado (Serhan *et al.*, 2007; Medzhitov, 2010; Serhan, 2010; Kamaly *et al.*, 2013). Em certas situações, a inflamação pode se tornar uma condição anormal e gerar ou potencializar enfermidades. Em sua fase aguda, é uma resposta protetora que combate microrganismos invasores e promove a reparação de tecidos que apresentam algum dano. Idealmente, a resposta é autolimitante e leva a uma eliminação dos patógenos e de debris celulares (Majno, 2004; Medzhitov, 2010; Kamaly *et al.*, 2013). Entretanto, uma resposta inflamatória excessiva pode levar à inflamação crônica e a um subsequente dano tecidual (Serhan *et al.*, 2007; Medzhitov, 2010; Serhan, 2010; Kamaly *et al.*, 2013). Evidências sugerem que tal resposta excessiva desempenha um papel central em inúmeras doenças, como as metabólicas e neurodegenerativas (Nathan and Ding, 2010; Kamaly *et al.*, 2013).

Nanoformulações têm sido desenvolvidas para a entrega de moléculas anti-inflamatórias ou agentes de imageamento a sítios inflamados, ou mesmo

para a detecção de moléculas envolvidas em respostas inflamatórias para os sítios específicos das enfermidades (Xiao *et al.*, 2012; Kamaly *et al.*, 2013; Salvador-Morales *et al.*, 2013).

Por exemplo, espécies reativas de oxigênio (ERO) e mieloperoxidase, produzidas em tecidos inflamados, podem ser detectadas por nanopartículas e, desta forma, permitir o imageamento *in vivo* de sítios inflamatórios (Xu *et al.*, 2019). Norling e colaboradores demonstraram que mediadores lipídios pró-resolução incorporados em nanopartículas derivadas de neutrófilos apresentaram inflamação aguda limitante, o que melhorou e diminuiu danos das juntas (Norling *et al.*, 2011; Kamaly *et al.*, 2013).

Nanoformulações também podem ser empregadas para melhorar a dispersão de fármacos anti-inflamatórios em meios aquosos (Khan *et al.*, 2022). Um exemplo de nanoformulação que pode ser usada para este fim é a nanoemulsão.

2.3.1.5 Emulsões

Emulsões são misturas com aparência macroscópica homogênea, formadas por dois ou mais líquidos imiscíveis. No nível microscópico, as emulsões exibem uma fase líquida dispersa sob a forma de gotículas em outra fase contínua (Figura 12). Para manter esses sistemas estáveis, são usadas moléculas anfifílicas denominadas surfactantes ou tensoativos, que se dispõem na interface entre as fases dispersa e contínua (Wilson *et al.*, 2022).

As emulsões possuem uma ampla gama de aplicações em diversas indústrias, sendo geralmente usadas quando se deseja dispersar óleo em água ou o oposto. Este tipo de sistema é de grande interesse na produção de alimentos, medicamentos e cosméticos, além de ser usado para misturar moléculas apolares e polares, mudar a textura, gosto e/ou odor de um produto, e melhorar a eficácia de medicamentos (Ohshima and Makino, 2014; Grumezescu, 2016; Sakamoto *et al.*, 2017; Wilson *et al.*, 2022).

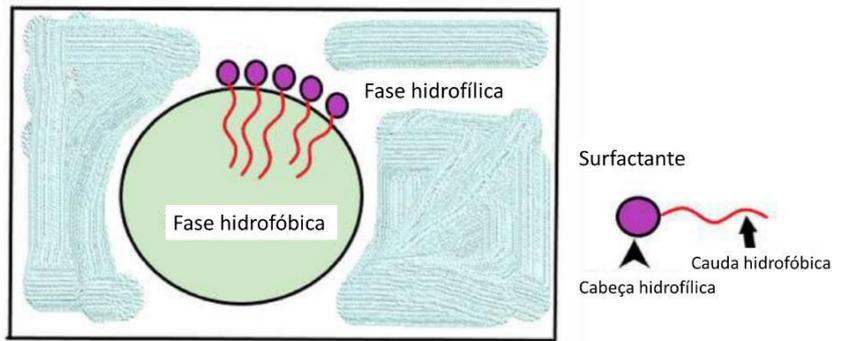


Figura 12 Representação de um surfactante e como ele é disposto em uma nanoemulsão. Fonte: (Safaya and Rotliwala, 2020) com modificações.

O surfactante diminui a tensão superficial entre as fases e age como uma barreira contra desestabilizações (Kabal'nov, Pertzov and Shchukin, 1987; Wilson *et al.*, 2022). Quanto à organização das fases dispersa e contínua, existem quatro tipos principais de emulsões: óleo em água (O/A), água em óleo (A/O), água em óleo em água (A/O/A) e óleo em água em óleo (O/A/O), como representado na Figura 13. Estas duas últimas também são conhecidas como dupla emulsão (Wilson *et al.*, 2022).

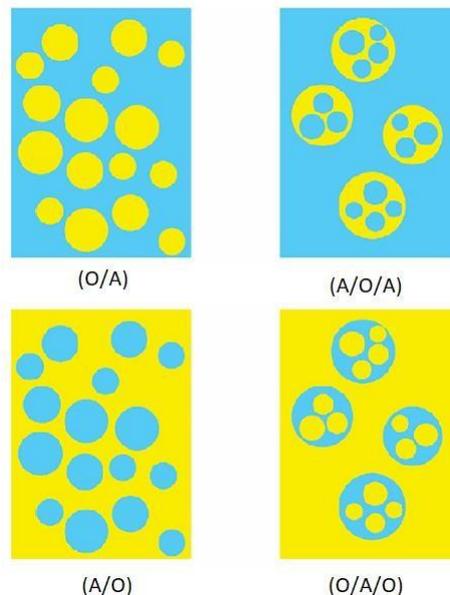


Figura 13 Representação esquemática dos tipos de emulsão. A letra "A" representa a fase aquosa (azul), enquanto a letra "O" a fase oleosa (amarela). Fonte: (Wilson *et al.*, 2022).

Sistemas emulsionados de uso em nanomedicina são geralmente microemulsões ou nanoemulsões. Tais formulações se diferenciam pelo seu comportamento quanto a diluições e flutuações de temperatura. As microemulsões são cineticamente instáveis, diluições podem desestabilizar tais formulações, por exemplo, e termodinamicamente estáveis. Já as nanoemulsões são cineticamente estáveis, mas termodinamicamente instáveis, ou seja, variações de temperatura podem alterar esta formulação (Anton and Vandamme, 2011).

As microemulsões se parecem com as nanoemulsões, já que muitas vezes as nanogotículas de ambas as formulações apresentam a mesma morfologia esférica e são dispersas em uma fase contínua. Tal fato leva a confusões acerca da classificação correta das microemulsões e das nanoemulsões (Anton and Vandamme, 2011). Portanto, deve-se ter cautela ao desenvolver uma formulação de tais tipos.

2.3.1.6 Nanoemulsões

As nanoemulsões são um tipo de emulsão com gotículas, ou nanogotículas, com diâmetros em geral entre 10 e 1000 nm, as quais são cineticamente estáveis e termodinamicamente instáveis (Wilson *et al.*, 2022). Elas ganharam popularidade por possuírem diversas utilidades nas indústrias farmacêutica, cosmética, alimentícia, de pintura e ambiental (Solans *et al.*, 2005b; Safaya and Rotliwala, 2020).

A alta relação área de superfície/volume das nanogotículas faz com que elas apresentem uma grande capacidade de carrear substâncias e, assim, há uma melhora na solubilidade de compostos hidrofóbicos. Como consequência, há uma melhora da biodisponibilidade de substâncias pouco solúveis (Barradas and Silva, 2020; Jain and Chella, 2021). Assim, elas podem encapsular, proteger e promover uma liberação controlada de moléculas bioativas lipofílicas (Sutradhar and Amin, 2013; Barradas *et al.*, 2017; McClements and Jafari, 2018; Barradas and Silva, 2020). Elas também apresentam uma longa validade (Meleson, Graves and Mason, 2007; Safaya and Rotliwala, 2020), têm a

capacidade de penetrar mais facilmente pela pele e, também, de se difundirem de forma uniforme pelo sítio de interesse (Safaya and Rotliwala, 2020).

2.3.1.7 Estabilidade de nanoemulsões

As nanoemulsões são sistemas que, quando desestabilizados, sofrem separação das fases. O surfactante estende o período que a formulação permanece estável por meses a anos. Como consequência, torna o processo translacional mais fácil, especialmente para a nanomedicina, onde mudanças na nanoemulsão podem acarretar sérios impactos na saúde e na vida de pacientes. Portanto, os processos de desestabilização de nanoemulsões devem ser estudados a fundo. Tais processos podem ser resumidos na teoria da estabilidade da dispersão coloidal – Teoria DLVO, a qual descreve que a estabilidade de uma emulsão é a combinação de duas forças independentes: interações de atração de van der Waals e forças de dupla camada eletrostáticas de repulsão (Verwey and Overbeek, 1948; Derjaguin and Landau, 1993; Wilson *et al.*, 2022).

A teoria DLVO descreve que quando as forças de atração dominam, a emulsão passa por uma desestabilização coloidal, que acontece por quatro diferentes formas, de acordo com a Figura 14.

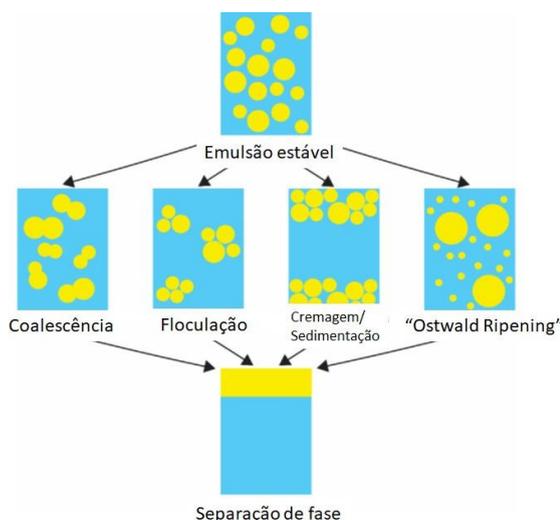


Figura 14 Representação dos tipos de desestabilização que uma emulsão pode sofrer de acordo com a teoria DLVO. Fonte: (Wilson *et al.*, 2022 com modificações)

A coalescência é a união de duas ou mais gotículas em uma única gotícula maior. Ocorre quando as gotículas se aproximam, se deformam e levam à formação de um fino filme na fase contínua. Enquanto que a floculação é a agregação de gotículas próximas umas das outras em um agrupamento (Wilson *et al.*, 2022). Já a cremagem e sedimentação ocorrem quando as gotículas se acumulam no topo (cremagem) ou fundo (sedimentação) da emulsão (Oprea, 2017; Wilson *et al.*, 2022). Por último, “Ostwald Ripening” é o processo pelo qual grandes gotículas vão crescendo às custas das gotículas de tamanho normal pela fase contínua (Taylor, 1998; Wilson *et al.*, 2022).

2.3.1.8 Tipos de surfactantes

Os surfactantes são moléculas anfifílicas sintéticas ou naturais que podem ser classificados em iônicos ou não iônicos. Como exemplos de surfactantes iônicos podem-se citar os fosfolipídeos, proteínas e polissacarídeos. Já os surfactantes não iônicos podem ser ésteres de sorbitano e surfactantes poliméricos. Tais emulsificantes, se usados apropriadamente, têm a capacidade de formarem nanogotículas de tamanho reduzido (Jafari, 2017; Barradas and Silva, 2020).

Os emulsificantes naturais vêm se destacando por serem biodegradáveis e biocompatíveis (Salem and Ezzat, 2018; Barradas and Silva, 2020). Eles são estáveis em diferentes condições como em diversas temperaturas, pH, pressão e osmolaridade e, por conseguinte, podem ser mais eficientes em manter as nanoemulsões estáveis (Barradas and Silva, 2020). A maioria dos surfactantes naturais são moléculas volumosas e, por isso, formam nanogotículas maiores. Mesmo assim promovem a estabilidade da formulação por estabilização estérica e eletrostática (Qian and McClements, 2011; Barradas and Silva, 2020).

Um exemplo de tensoativo bastante utilizado na formulação de nanoemulsões são os fosfolípidios. Eles também são o principal componente da membrana celular e apresentam uma morfologia de cabeça-cauda (figura 15), caracterizados por um grupo fosfato carregado negativamente, representado pela cabeça, e duas caudas de radicais acil graxos. São muito utilizados nas indústrias alimentícias, cosméticas e farmacêuticas por causa da sua biocompatibilidade. Podem-se citar como tensoativos fosfolípidios a lecitina de ovo e de soja, as quais estabilizam a longo prazo as emulsões (Pichot, Watson and Norton, 2013; Wilson *et al.*, 2022). Tais tensoativos estabilizam as nanoemulsões por meio de duas formas: ao promover uma repulsão eletrostática entre as nanogotículas e ao agir como uma barreira esteárica (Isailović *et al.*, 2017; Wilson *et al.*, 2022).

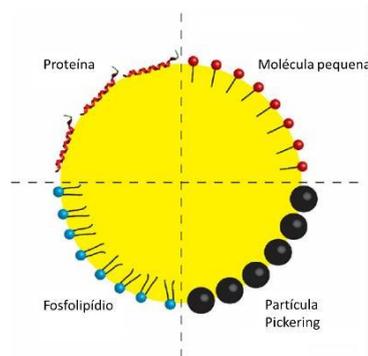


Figura 15 Exemplos de tipos de tensoativos usados em nanoemulsões. Fonte: (Wilson *et al.*, 2022 com modificações).

Nanoemulsões recobertas com surfactantes iônicos recrutam íons da solução e, assim, geram uma dupla camada elétrica, promovendo estabilização eletrostática por meio de forças repulsivas (Verwey, 1940; Wilson *et al.*, 2022). Tal dupla camada elétrica é feita por três partes: a superfície da emulsão carregada, a camada rígida da ligação forte dos íons e a camada difusa com alta concentração de ligações fracas (Wilson *et al.*, 2022). O ponto no qual a camada difusa não apresenta mais movimento com as nanogotículas é denominado de “slip lane” (Delgado *et al.*, 2007; Wilson *et al.*, 2022). A carga no “slip lane” é o ponto utilizado para determinar o potencial zeta de uma nanoemulsão onde quanto mais negativo ou positivo o potencial for, a formulação será mais estável. Este potencial é uma das medidas importantes de análise da estabilidade de

uma nanoemulsão (Delgado *et al.*, 2007; Wooster and Augustin, 2007; Wilson *et al.*, 2022). Além disso, a carga elétrica na superfície das nanogotículas conduz à estabilização do sistema, devido à repulsão eletrostática e estabilização contra agregação. Adicionalmente, a carga de superfície pode ser explorada para prover novas aplicações para as nanoemulsões ao promover uma interação com outros componentes no meio biológico (Tian, Chen and Zhang, 2016; Barradas and Silva, 2020).

2.3.1.9 Fase oleosa

A fase oleosa é constituída, em uma nanoemulsão O/A, pelos componentes do núcleo lipofílico da nanogotícula e apresenta um importante papel na formação e estabilidade da nanoemulsão. Aspectos como polaridade, miscibilidade em água, tensão interfacial e viscosidade podem alterar as características das formulações como por exemplo tamanho da nanogotícula e estabilidade (McClements, 2011b; Barradas and Silva, 2020). Adicionalmente, o peso molecular dos componentes oleosos, tensão interfacial, densidade e viscosidade dos óleos direcionam a escolha do melhor surfactante da nanoemulsão e do melhor método de obtenção da formulação (Rao and McClements, 2011; Barradas and Silva, 2020).

As razões óleo:surfactante e óleo:água são critérios essenciais para a formação da nanogotícula e para a estabilidade da formulação (Dasgupta, Ranjan and Gandhi, 2018; Barradas and Silva, 2020). Por exemplo, uma grande quantidade de componentes hidrofóbicos pode levar ao “Ostwald ripening” (amadurecimento de Ostwald), o qual é o principal motivo de instabilidade nas nanoemulsões (Chebil *et al.*, 2013; Barradas and Silva, 2020).

Óleos e substâncias lipofílicas podem ser encapsuladas nas nanogotículas a fim de serem protegidas, pois muitas vezes são moléculas lábeis, de terem sua liberação controlada, de aumentar a bioviabilidade e de facilitar a incorporação na fase aquosa (Barradas and Silva, 2020).

2.3.1.10 Métodos de formulação das nanoemulsões

Há basicamente duas classes de métodos para a produção de nanoemulsões: método de alta energia e o método de baixa energia. Neste, deve-se compreender os aspectos físicos e químicos de cada fase e do tensoativo e, naquele deve ser usado um equipamento que aplique uma força de cisalhamento tal que haja energia suficiente para a formação da emulsão (Wilson *et al.*, 2022). Exemplos de métodos de baixa energia são temperatura de transição de fase, composição de inversão de fase, emulsificação espontânea, diluição e emulsificação de fase D (DPE). Enquanto que exemplos de métodos de alta energia são microfluidização, homogeneização de alta pressão e ultrassonicação (Safaya and Rotliwala, 2020).

2.3.1.10.1 Método de alta energia

Os métodos de preparo de nanoemulsões por alta energia demandam dispositivos mecânicos para serem produzidas. Tais dispositivos podem ser fluidizadores, homogeneizadores de alta pressão (HPH) e ultrassonicadores (sonicadores). Eles liberam altas forças e, assim, formam-se as nanogotículas (Anton, Benoit and Saulnier, 2008; Safaya and Rotliwala, 2020). Estes métodos são escalonáveis para a indústria, mas requerem grande quantidade de energia e, por conseguinte, os custos de produção são elevados. Os princípios de funcionamento dos equipamentos são a funcionalização de um moinho coloidal, ondas sonoras de alta frequência (acima de 20 kHz) e alta pressão a partir de uma bomba (de 500 a 50.000 psi) para um microfluidizador, sonicador e HPH, respectivamente. Os sonicadores são amplamente utilizados em laboratórios de pesquisa. Eles produzem ondas de pressão que geram cavitação no líquido, o que produz a redução do tamanho das gotículas em nanogotículas. Quanto maior o tempo de sonicação, menor é o tamanho das nanogotículas (McClements, 2011a; Safaya and Rotliwala, 2020).

Os métodos de alta energia podem ser usados com qualquer tipo de óleo e, de preferência, com aqueles que são bastante viscosos e que tenham um alto peso molecular. Assim, há uma menor necessidade de se utilizar uma alta concentração de surfactante (Safaya and Rotliwala, 2020). Entretanto, deve-se evitar o processamento de matérias-primas sensíveis ao calor, já que os métodos promovem um aumento da temperatura do sistema (Buza and Dizdar, 2017; Safaya and Rotliwala, 2020).

2.3.1.10.2 Método de baixa energia

As nanoemulsões são produzidas pelo método de baixa energia a partir da energia química interna do sistema. Tal energia é liberada durante a emulsificação e ocorre como consequência da mudança da curvatura espontânea das moléculas do surfactante, de negativo para positivo (O/A) ou positivo para negativo (A/O) (Jadhav *et al.*, 2014; Safaya and Rotliwala, 2020).

a) Emulsificação espontânea

O método é baseado no movimento dos componentes miscíveis na água como o solvente, surfactante e co-surfactante da fase orgânica na fase aquosa. O processo inicia com a adição da fase orgânica, como o óleo, e o surfactante na fase aquosa, na água e co-surfactante. A rápida migração dos componentes miscíveis na água para a fase aquosa leva a uma turbulência na interface das duas fases, conduzindo a um aumento da área interfacial entre óleo-água (Saberri, Fang and McClements, 2015; Jintapattanakit, 2017; Lefebvre *et al.*, 2017; Safaya and Rotliwala, 2020). Como consequência, há uma formação espontânea das gotas de óleo no momento em que a fase de microemulsão bicontínua se desintegra. A utilização de solventes pode promover tal processo tanto na presença quanto na ausência de surfactantes. A ordem de mistura dos componentes não demonstrou um efeito crítico no processo enquanto as nanoemulsões são formadas espontaneamente (Shafiq-un-Nabi *et al.*, 2007; Safaya and Rotliwala, 2020).

b) Composição de Inversão de Fase (PIC)

Composição de Inversão de Fase (PIC) é uma forma estendida da emulsificação espontânea. O método PIC produz nanoemulsões a temperatura ambiente e que não envolva a utilização de equipamento de alta energia como os métodos de alta energia ou o uso de solvente como o método de emulsificação espontânea. O agitador magnético é usado para misturar o sistema de óleo e surfactante à temperatura ambiente. A água é acrescentada gota a gota. Com o aumento da quantidade de água, inicialmente uma nanoemulsão A/O é formada, seguida por um ponto de inversão onde a nanoemulsão torna-se O/A. Deve-se ressaltar que não houve um grande consumo de energia no processo (Solè et al., 2010; Safaya and Rotliwala, 2020). A formação de uma nanoemulsão é atribuída à tensão interfacial, viscosidade, região de transição de fase, estrutura do surfactante bem como sua concentração. O PIC também é conhecido como inversão catastrófica, já que envolve o aumento do volume da fase dispersa (Forgiarini *et al.*, 2001; Safaya and Rotliwala, 2020).

c) Temperatura de transição de fase (PIT)

Shinoda e Saito (1969) observaram que a temperatura é a chave para a formação de uma nanoemulsão A/O produzida a partir do método PIT. Já no ano seguinte, eles analisaram as nanoemulsões A/O formuladas pelo método PIT e verificaram a importância do tamanho da cadeia hidrofílica para se obter uma emulsão estável (Saito and Shinoda, 1970; Safaya and Rotliwala, 2020). Surfactante, óleo e água são misturados e aquecidos gradualmente no PIT. Então, a solução é rapidamente resfriada ao se transferir a mistura para um banho de gelo, o que conduz a uma formação de uma nanoemulsão o/a. Observou-se que quando a temperatura de transição de fase do sistema é entre 20 a 65 °C mais elevada do que a temperatura de armazenamento, as nanoemulsões formadas são do tipo O/A. Enquanto que as nanoemulsões A/O são formadas entre as temperaturas de 10 a 40 °C mais baixas que a temperatura de armazenamento. Também é observado que as temperaturas próximas ao PIT são outro caminho para a estabilização do sistema, além dos co-surfactantes. A utilização de surfactantes não-iônicos (nos quais a geometria

molecular muda com a temperatura) nos sistemas feitos a partir do PIT formaram nanoemulsões estáveis (Rao and McClements, 2010; Safaya and Rotliwala, 2020). Em alguns casos, sais inorgânicos são usados para ajustar o PIT do sistema (Mei, Xu and Sun, 2011; Hasan, Leanpolchareanchai and Jintapattanakit, 2015; Safaya and Rotliwala, 2020). A completa solubilização da fase oleosa em microemulsões bicontínuas leva a uma nanoemulsão O/A com baixo tamanho da gotícula quando formuladas pela metodologia de PIT (Mei, Xu and Sun, 2011; Safaya and Rotliwala, 2020). A PIT geralmente apresenta uma alta eficiência de emulsificação e baixo índice de polidispersão quando comparado com o método PIC (Hasan, Leanpolchareanchai and Jintapattanakit, 2015; Safaya and Rotliwala, 2020).

2.3.1.11 Caracterização das nanoemulsões

As nanoemulsões podem ser caracterizadas por meio de métodos analíticos como espalhamento de luz dinâmico (DLS), microscopias eletrônicas, análise de viscosidade e microscopia de força atômica. O DLS é bastante utilizado para determinar o tamanho das gotículas e seu potencial zeta. Ao se medir o tamanho das gotículas em função do tempo, a estabilidade física da nanoemulsão pode ser verificada. O DLS tem sido bastante utilizado para medir a taxa de “Ostwald ripening” (Wooster, Golding and Sanguansri, 2008; Safaya and Rotliwala, 2020). Já no âmbito macroscópico, ensaios como viscosidade, condutividade e teste dielétrico caracterizam as nanoemulsões de forma eficaz. A viscosidade desta formulação é baixa quando o volume de água é grande, enquanto que a viscosidade é alta quando a quantidade de surfactante e co-surfactante é baixa. Mudanças na viscosidade ajudam na avaliação da estabilidade nos nanossistemas. Para prever se a nanoemulsão produzida for A/O ou O/A e monitorar o fenômeno de inversão de fase, testes de condutividade são bastante úteis (Chiesa *et al.*, 2008; Safaya and Rotliwala, 2020). Características estruturais e dinâmicas das nanoemulsões são avaliadas por medidas dielétricas. A forma da gota do nanossistema pode ser determinada por microscopias de força atômica ou por microscopias eletrônicas de varredura ou

transmissão. A estabilidade da nanoemulsão é provada por meio de uma série de testes como ensaio de centrifugação, ciclo de congelamento e descongelamento, testes de aquecimento e resfriamento e condições ambientais. Tais testes verificam o período de tempo no qual um sistema nanoemulsionado consegue permanecer estável sem ocorrer “Ostwald ripening”, coalescência, cremagem e sedimentação. Assim, pode-se ter uma ideia do tempo de prateleira da formulação (Craig *et al.*, 1995; Safaya and Rotliwala, 2020).

2.3.2 Justificativa e objetivos

Não foi encontrado na literatura o desenvolvimento de nanoemulsão à base de oleorresina de copaíba da espécie *Copaifera officinalis* por meio do método de ultrasonicassão pelo equipamento sonicador bem como a análise de efeitos biológicos de tal formulação em macrófagos murinos J774A.1 e em ratos Wistar. Então, o trabalho teve como objetivos gerais o desenvolvimento, a caracterização e a avaliação dos efeitos de nanoemulsões à base de oleorresina de copaíba (*Copaifera officinalis*) em linhagem de células de macrófagos murinos (J774A.1) *in vitro* e efeitos anti-inflamatórios em ratos Wistar. Já como objetivos específicos podem ser citados:

- Padronizar os parâmetros para o desenvolvimento de nanoemulsão à base de oleorresina de copaíba (NeCop);
- Caracterizar os parâmetros físico-químicos como diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão, potencial zeta, aspectos macroscópicos e superfície da nanoemulsão obtida;
- Avaliar a estabilidade do nanossistema desenvolvido em função do tempo;
- Analisar os efeitos da NeCop em relação à viabilidade celular, fragmentação de DNA, exposição às células e integridade de membrana nas células J774A.1 *in vitro* e
- Analisar os efeitos da NeCop de antinocicepção , antiedema e toxicidade em ratos Wistar.

2.3.3 Materiais e métodos

2.3.3.1 Materiais

Tabela 7 Lista de materiais utilizados para realizar os experimentos de produção, caracterização e análise de estabilidade da NeCop e os experimentos *in vitro*.

Material	Fabricante	Origem
Lecitina de ovo – Lipoid E 80	Lipoid	Alemanha
Tampão fosfato salino 1X, phosphate-buffered saline (PBS 1X)	Laborclin	Brasil
Células J447A.1	ATCC	Estados Unidos
Meio Dulbecco's Modified Eagle (DMEM)	Gibco	Estados Unidos
Soro Fetal Bovino (SFB)	Gibco	Estados Unidos
Antibiótico estreptomicina 100 µg/mL / penicilina 100 IU/mL	Gibco	Estados Unidos
Dimetil sulfoxido (DMSO)	Sigma	Estados Unidos
3-(4,5dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)	Invitrogen	Estados Unidos
Etanol absoluto (ETOH)	Sigma	Estados Unidos
Azul de tripan	Sigma	Estados Unidos
RNAse	Ludwig Biotecnologia	Brasil
Iodeto de propídeo	Probes – Thermo Fisher	Estados Unidos
Poch-100i™	Sysmex	Brasil
Chemwell-t	Labtest	Brasil
Ração normocalórica	Nuvilab, Nuvital	Colombo, Brasil
Carragenina	Sigma	Estados Unidos

2.3.3.2 Produção da nanoemulsão à base de oleorresina de copaíba

A nanoemulsão de oleorresina de copaíba (NeCop) foi produzida de acordo com o protocolo descrito por Ombredane e colaboradores (2020). Em um preparo típico, inicialmente foram misturados surfactante e óleo, quais sejam lecitina de ovo e oleorresina de copaíba, na proporção 2:1 (m:m) respectivamente. Estes componentes foram então dispersos em PBS, resultando um volume final de 15 mL e 0,33 de razão entre as massas da mistura surfactante/óleo e do meio dispersante. Na sequência, a dispersão formada foi sonicada (VibraCell 250, Sonics) por três minutos em banho de gelo, em pulso alternado de 1/1 segundo. Assim foi obtida uma emulsão com volume final de 5 mL e concentração de 16,24 mg de oleorresina/mL. A seguir, essa emulsão foi diluída com PBS para 2,16 mg de oleorresina/mL, volume final de 15 mL, e novamente sonicada com os mesmos parâmetros anteriores, resultando na formulação final de NeCop. A formulação branca (B) foi produzida de maneira idêntica, mas sem a oleorresina. As duas formulações foram armazenadas em temperatura de 4°C.

2.3.3.3 Análise macroscópica

As formulações tiveram seus aspectos macroscópicos analisados visualmente quanto à presença de coalescência, floculação, cremagem e sedimento um dia após produzidas.

2.3.3.4 Análise das características coloidais

Um dia após sua produção, as nanogotículas de NeCop e B foram ambas caracterizadas em relação ao diâmetro hidrodinâmico (DH), índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta (PZ) com equipamento Zetasizer (ZetaSizer Nano ZS®, Malvern Instruments, Reino Unido).

2.3.3.5 Análise de estabilidade coloidal e macroscópica

A análise de estabilidade das nanogotículas foi feita pelo monitoramento de suas características coloidais e aspecto macroscópico nos

tempos de 7, 15, 30, 60 e 90 dias após sua produção. As análises estatísticas foram realizadas pelo método Two-way ANOVA e pós-teste Tukey.

2.3.3.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A análise morfológica da nanoemulsão do óleo de copaíba foi realizada pela técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) com um microscópio JSM-7001F (Jeol, Japão). As amostras foram diluídas por 1:500 (v/v) em água destilada e 100 µL foram pingados em uma fita adesiva dupla face de carbono, a qual estava aderida em um “stub”. Então, as amostras foram contrastadas com 2% de vapor de ósmio durante meia hora e deixadas para secagem por 2 dias a temperatura ambiente. Após a completa secagem do material, houve a metalização com ouro no equipamento “Sputter Coater” (Leica, EM SCD 500, Áustria). As imagens foram adquiridas com magnificações de 6.000 vezes e 12.000 vezes com voltagem de 15,0 kV.

2.3.3.7 Ensaios *in vitro*

a) Ensaio de viabilidade celular

O ensaio de viabilidade celular foi realizado segundo o protocolo descrito por Mosmann (1983) com adaptações. Primeiramente, houve o plaqueamento das células. As células cultivadas foram expandidas (macrófagos J774A.1 – ATCC: TIB-67) em meio DMEM suplementado com 10% de SFB e 1% de antibiótico. Quando atingiram 70% de confluência, realizou-se a raspagem das células. O sobrenadante foi centrifugado por 5 minutos a 2000 RPM. O meio foi desprezado e o pellet ressuspendido com 1 mL de meio suplementado. A contagem das células em câmara de Neubauer foi realizada e as células foram plaqueadas em placas de 96 poços, na concentração de $2,0 \times 10^4$ células/mL.

Já o tratamento foi realizado 24 horas após o plaqueamento, nas concentrações de 5 µg/mL, 10 µg/mL, 15 µg/mL, 30 µg/mL, 45 µg/mL, 60 µg/mL, 90 µg/mL, 180 µg/mL e 360 µg/mL, com o objetivo de se fazer um “screening” para encontrar as melhores concentrações para os tratamentos dos ensaios posteriores. Os tratamentos foram a solução salina PBS 1X

(controle não tratado), NeCop, etanol na concentração menor que 1% (ETOH, solvente da oleorresina de copaíba livre) e a oleorresina livre de copaíba dissolvida em etanol (OL Cop).

Após 24 horas de tratamento, as células foram incubadas com a solução de MTT na concentração de 0,5 mg/mL (15 µL de MTT e 135 µL de meio DMEM) de 1 hora a 2 horas. Então, a solução foi descartada e 100 µL de DMSO foi adicionado em cada poço. A verificação da absorbância foi feita em um espectrofotômetro (Spectramax M2 Molecular Devices, Estados Unidos) a 595 nm.

As análises estatísticas foram realizadas pelo método Two-way ANOVA e pós-teste Tukey.

b) Integridade de membrana

O ensaio foi baseado na metodologia descrita por Joanitti, Azevedo and Freitas (2010). A integridade de membrana de células J774A.1 foi analisada após 24 horas de tratamento com PBS 1X, NeCop, B, ETOH e OL Cop na concentração de 15 µg/mL. As células foram coradas por uma solução de azul de tripan (0,4% em PBS 1X) na proporção de 1:1 (v/v). Em seguida, houve a contagem das células através de uma câmara de Neubauer por meio de um microscópio de luz invertido (Leica DM1 1, Leica, Alemanha). Somente as células que apresentam membrana plasmática lesionada conseguem interiorizar o corante.

c) Fragmentação de DNA

As células J774A.1 foram plaqueadas na concentração de 2.0×10^4 em placa de 24 poços. Após 24 horas, as células foram tratadas com PBS 1X, NeCop, B, ETOH e OL Cop na concentração de 15 µg/mL. Após 1 dia de tratamento, o sobrenadante de cada poço foi colocado em um microtubo e 400 µL de tripsina foram acrescentados em cada poço. Então, as células foram armazenadas em estufa por 5 minutos a 37°C e 5% de CO₂. O sobrenadante de cada tratamento foi ressuscitado após os 5 minutos, transferido para o microtubo correspondente, no qual o primeiro sobrenadante estava armazenado,

e centrifugado a 3.083 g por 5 minutos a 4°C. Então, o pellet foi ressuspendido e 1 mL de etanol (ETOH) 70% gelado foi acrescentado nos microtubos, os quais foram armazenados a uma temperatura de -20°C por pelo menos 24 horas. No dia da leitura no equipamento, os microtubos foram centrifugados novamente nas mesmas condições que anteriormente. Então, o sobrenadante foi descartado e 100 µL de PBS 1X com RNase (50µg/mL) foram adicionados. Logo após, os microtubos foram incubados, por 30 minutos, em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Em seguida, 100 µL de iodeto de propídeo (20µg/mL) foram acrescentados nos microtubos. Então, as amostras foram deixadas por meia hora à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. A seguir, houve a leitura das amostras no equipamento de citometria de fluxo (FACSVerse, BD, Estados Unidos). Para cada amostra, 10.000 eventos foram verificados e os resultados foram analisados pelo programa FlowJo® vX 0.7.

d) Exposição da NeCop às células J774A.1

Para o ensaio de exposição das nanogotículas às células J774A.1, tais células foram plaqueadas 2×10^4 em placas de 24 poços. Após 24 horas, as células foram tratadas com NeCop associada com aluminium chloride phthalocyanine (AICIPt) na concentração de 15 ug/mL e PBS 1X, como controle. Então, as células foram analisadas por citometria de fluxo (FACSVerse, BD, Estados Unidos). nos tempos de 2 horas, 1 hora e meia hora após a adição dos tratamentos nas células. A fluorescência da AICIPt foi detectada pelo comprimento de onda de 630 nm. Para cada amostra, 10.000 eventos foram verificados e o software FlowJo® vX 0.7 foi usado nas análises.

2.3.3.8 Ensaios *in vivo*

a) *Manutenção dos animais*

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade de Brasília

aprovou este estudo cujo protocolo é SEI nº 23106.058193/2021-48. Um total de 54 ratos Wistar machos, espécie *Rattus norvegicus* foram adquiridos do Biotério Central da Universidade Federal de Goiânia (UFG). Os animais tinham de 1 a 3 meses, possuíam massa corporal entre 100 e 300 g. Eles foram acomodados no biotério do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília em gaiolas de propileno próprias para ratos e em cada uma eram mantidos 3 ratos. Nas gaiolas havia maravalha autoclavada e ração normocalórica. Como enriquecimento ambiental foram utilizadas sementes de diferentes cereais e canos de PVC. Os ratos foram mantidos em temperatura ambiente (25 °C) em ciclo claro/escuro que se alternavam entre 12/12 horas. Os animais foram mantidos com água filtrada e ração *ad libitum*.

b) Indução de inflamação por injeção de carragenina

A substância indutora de dor/nocicepção, carragenina (Cg), foi administrada uma vez, intraplantar, no membro pélvico na dose de 100 µg/kg. A Cg foi diluída em PBS 1X.

c) Desenho experimental

Os 54 ratos foram distribuídos em 9 grupos (n=6 de cada grupo) para os seguintes tratamentos esquematizados na Figura 16:

- 1) Controle 1:** Tampão fosfato salino (PBS) 1X via oral (v.o) por 21 dias consecutivos + Salina injeção plantar (ipl) no membro pélvico direito; Carragenina ipl no membro pélvico esquerdo, a qual somente foi administrada uma vez, 3 horas antes da análise nociceptiva e de edema.
- 2) Controle 2:** Diluente v.o por 21 dias consecutivos + Dipirona (controle positivo de efeito analgésico) v.o + Carragenina ipl.
- 3) Controle 3:** Diluente v.o por 21 dias consecutivos + Dexametasona (controle positivo de efeito anti-inflamatório) ipl + Carragenina ipl.
- 4) Grupo óleo de copaíba livre - dose 100 mg/Kg:** óleo de copaíba na dose

de 500 mg/kg por v.o por 21 dias consecutivos + Carragenina ipl.

- 5) **Grupo óleo de copaíba livre - dose 400 mg/Kg:** óleo de copaíba na dose 1000 mg/Kg por v.o por 21 dias consecutivos + Carragenina ipl.
- 6) **Grupo Nanoemulsão à base de óleo de copaíba - dose 100 mg/Kg:** Nanoemulsão à base de óleo de copaíba na dose 500 mg/Kg por v.o por 21 dias consecutivos + Carragenina ipl.
- 7) **Grupo Nanoemulsão à base de óleo de copaíba - dose 400 mg/Kg:** Nanoemulsão à base de óleo de copaíba na dose 1000 mg/Kg v.o por 21 dias consecutivos + Carragenina ipl.
- 8) **Grupo Branco - dose 100 mg/Kg:** Nanoemulsão vazia por v.o por 21 dias consecutivos + Carragenina ipl.
- 9) **Grupo Branco - dose 400 mg/Kg:** Nanoemulsão vazia por v.o por 21 dias consecutivos + Carragenina ipl.

PBS 1X + Solução salina (injeção plantar)	Dipirona+ Carragenina	Dexametasona+ Carragenina
Oleoresina 100 mg/kg + Carragenina	Oleoresina 400 mg/kg + Carragenina	Nanoemulsão 100 mg/kg + Carragenina
Nanoemulsão 400 mg/kg + Carragenina	Branco 100 mg/kg + Carragenina	Branco 400 mg/kg + Carragenina

Figura 16 Representação esquemática dos tratamentos administrados aos ratos Wistar.

Após os 21 dias de tratamento, cada rato foi anestesiado com isoflurano inalatório e, em seguida, teve 1 mL de sangue extraído por punção cardíaca, a pele do membro pélvico foi retirada por dissecação pós eutanásia e o baço, fígado, 1 rim e 1 pulmão também foram extraídos, pós eutanásia.

A eutanásia foi realizada por meio de um fluxo de isoflurano a 4%, por via inalatória, até a sedação do rato. Em seguida, fluxo de 100% de gás carbônico, na ordem de 20% do volume da câmara/minuto, com manutenção do fluxo por 1 minuto após a morte clínica (Figura 17).

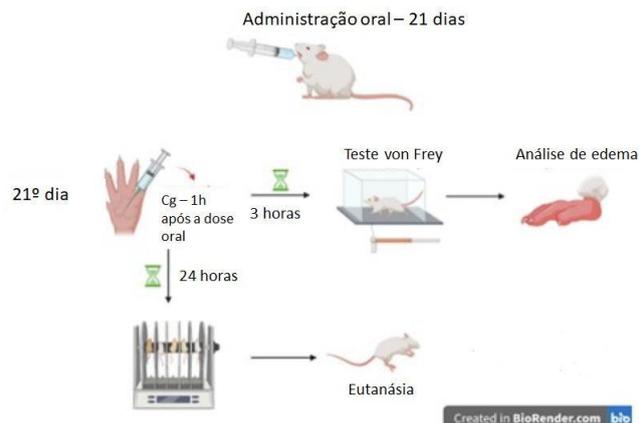


Figura 17 Representação esquemática da administração dos tratamentos nos ratos Wistar dos ensaios *in vivo*.

d) Hemograma

Primeiramente, 100 μL de sangue de cada rato foram puncionados do coração e transferidos para um tubo com EDTA 10%. Então, o sangue foi analisado em um equipamento automático de hematologia Sysmex pocH-100i™ (Curitiba, PR, Brasil) calibrado para ratos para aquisição de eritograma e leucograma. Além disso, o peso dos animais também foi aferido.

e) Análises bioquímicas do soro sanguíneo

Foram avaliados no soro sanguíneo marcadores de funções hepáticas e renais, bem como o perfil lipídico e a glicemia após a realização dos tratamentos citados anteriormente. Para tal, 800 μL de sangue foram obtidos por punção do coração e armazenados em tubos com gel separador. Então, as amostras foram centrifugadas por 30 minutos a 2000 RPM para separar o soro sanguíneo, o qual foi analisado por um equipamento bioquímico automático Chemwell-t. Foram estudados os parâmetros albumina, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), colesterol, creatinina, glicose, lipoproteína de baixa densidade (LDH), ureia e triacilglicerídeos.

f) Avaliação dos efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório

Os animais foram tratados previamente com a oleorresina de copaíba em sua forma livre bem como em sua forma nanoestruturada. O tratamento foi por V.O., diariamente por 21 dias (Caputo *et al.*, 2020). Os ratos foram divididos em grupos sendo que cada um recebeu diferentes doses (100 e 400 mg/Kg) de oleorresina livre ou nanoestruturada. Os controles positivos foram dipirona, um anti-inflamatório não esteroidal (AINE) e dexametasona, um glicocorticoide. Enquanto que os controles negativos foram solução salina, PBS 1X e a nanoemulsão vazia.

A dor/nocicepção foi avaliada por meio de testes comportamentais envolvendo a quantificação da sensibilidade dolorosa dos membros pélvicos (patas traseiras) dos animais a estímulos mecânicos. Serão avaliados os limiares basais. Após, houve a administração Ipl da Cg. Depois de 3 horas, os limiares nociceptivos foram verificados novamente. A comparação entre os efeitos da substância testada sobre a sensibilização induzida por Cg permite diferenciar os efeitos antinociceptivos e/ou anti-inflamatórios.

Então, a indução da inflamação, no membro pélvico, foi iniciada com a Cg. Para a avaliação da nocicepção, os animais foram acondicionados em gaiolas de acrílico e possuíam total liberdade de movimento. O teste consistiu em expor os membros pélvicos dos ratos à fonte de força de intensidade, conhecida pela avaliação do limiar nociceptivo mecânico, por meio da utilização de um Analgesímetro Digital ou Teste de von Frey Eletrônico (Insight, Brasil) (Frey, von, 1896; Cunha *et al.*, 2004). Durante a realização do teste, foi mensurada a força em g necessária para que o animal retire a pata, a qual foi interpretada como sendo uma reação dolorosa. Quanto menor a força para causar a retirada do membro, menor é o limiar doloroso.

Deve-se enfatizar em que nenhum momento nenhum animal foi contido e a retirada do membro da fonte de força foi livre. Ou seja, assim que a força suficiente para causar um efeito de nocicepção foi detectada, esperou-se que os

animais retirassem o membro pélvico. Como consequência, interrompe-se o processo nociceptivo imediatamente. A fonte de força não apresenta potencial para causar lesão tecidual, tem potencial apenas de estimular os neurônios sensoriais e desencadear uma resposta nociceptiva. Além disso, a dose de Cg causa inflamação com edema e sensibilização de nociceptores. Esta somente pode ser visualizada quando aplicado um estímulo mecânico no membro pelo equipamento de von Frey (Figura 18) (Cunha *et al.*, 2004).

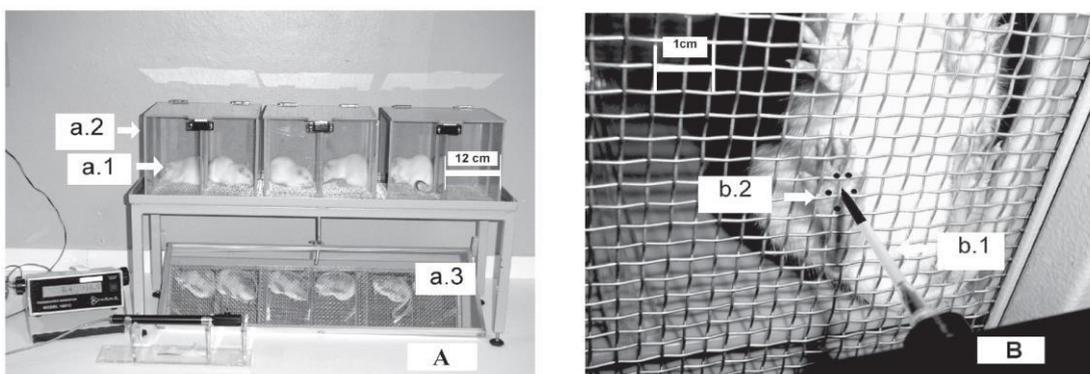


Figura 18 Aparato para teste de pressiómetro eletrônico e a área na qual a ponteira de polipropileno foi aplicada na pata. A) Ratos. a.1) em gaiolas de acrílico; a.2) gaiolas de volume 12x20x17 cm com chão de grade; a.3) espelho abaixo do chão, o qual mostra a pata dos animais. B) b.1) uma ponteira de polipropileno encaixada em um transdutor de força, a qual foi aplicada entre os 5 dedos - b.2) pontos pretos.

Após a avaliação nociceptiva feita, os aspectos relacionados ao edema induzido no membro pélvico dos ratos foram avaliados pelo equipamento Pletismômetro (Figura 19) (Ugo Basile, Itália) (Pereira *et al.*, 1998). O equipamento registra o volume de líquido deslocado em um sistema de vasos comunicantes em resposta à introdução do membro pélvico de animais experimentais em uma das cubas que compõe o sistema. A outra cuba contém um transdutor capaz de detectar quantidades mínimas de líquido deslocado. É um equipamento para a avaliação de edema que ocorre em processos inflamatórios. Assim, podem-se obter dados que auxiliem na diferenciação entre efeitos antinociceptivos e/ou inflamatórios (Pereira *et al.*, 1998).

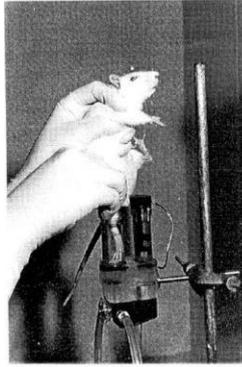


Figura 19 Edema de pata de rato sendo avaliado pelo pletismômetro de Ugo. Fonte: (Pereira et al. 1998).

Os experimentos foram feitos de forma cega. O experimentador que realizou as medidas não tinha conhecimento de quais tratamentos os grupos receberam, mas sabia o protocolo e os objetivos.

2.3.3.9 Análise estatística

As análises estatísticas foram feitas pelo software GraphPad – Prism 8, o teste realizado foi o One-way ANOVA e o pós-teste, Tukey.

2.3.4 Resultados e Discussão

2.3.4.1 Caracterização e análise de estabilidade da NeCop

a) Caracterização por DLS da NeCop

De acordo com a Tabela 8, a NeCop e o Branco (B) possuem valores semelhantes nos parâmetros analisados após 1 dia de produção das formulações. O diâmetro hidrodinâmico é em torno de 158 nm, o índice de polidispersão é cerca de 0,240 e o potencial zeta, -2,0 mV. Valentim e colaboradores (2018) também desenvolveram uma nanoemulsão à base de oleorresina de copaíba (*Copaifera officinalis*) e encontraram um valor do DH parecido (161.2 ± 0.808 nm), mas os valores do Pdl e do PZ foram diferentes (0.340 ± 0.007 e -22.1 ± 0.764 , respectivamente). Entretanto, o método de nanoemulsificação e o surfatante usados por Valentim são diferentes do descrito neste trabalho. Já Pasquel Reatégui e colaboradores encontraram o valor de DH

de 262 ± 2 nm também para uma nanoemulsão à base de oleorresina de copaíba (*C. officinalis*).

Tabela 8 Dados da caracterização em relação ao diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão e potencial zeta da NeCop e do B após um dia de formulados.

	Diâmetro hidrodinâmico	Índice de Polidispersão	Potencial Zeta
NeCop	159,3±0,75 nm	0,247±0,02	-5,9±0,09 mV
B	157,9±12,12 nm	0,237±0,01	-1,7±0,09 mV

Reátegui e colegas (2018) produziram a nanoemulsão à base de óleo de copaíba por meio da extração dos fluidos supercríticos de emulsões (SFEE). Tal processo é baseado na extração de solventes orgânicos a partir de gotas de uma emulsão ao usar gás carbônico supercrítico (SC-CO₂). Como vantagens podem-se citar ponto crítico moderado, baixa toxicidade e maior segurança para o meio ambiente (Jung and Perrut, 2001; Pasquel Reátegui *et al.*, 2018). Além disso, este método combina técnicas de emulsificação e o processo de precipitação de antissolvente supercrítico (SAS). Já o presente trabalho empregou a técnica de alta energia de ultrasonicação. Como vantagem ao método de Reátegui e colaboradores (2018), podem-se citar: 1) solventes orgânicos, os quais são prejudiciais ao meio ambiente, não são necessários no método proposto no presente trabalho, 2) são utilizadas somente matérias-primas biodegradáveis no processo, e 3) é um processo mais barato, pois utiliza-se somente um equipamento. Entretanto, o processo translacional para a indústria é mais trabalhoso, já que deve adequar-se o procedimento a outro equipamento, como um microfluidizador, por exemplo.

Então, a técnica de SFEE foi empregada por Reátegui e colegas (2018) para encapsular a oleorresina de copaíba. As matérias-primas utilizadas para a produção da emulsão foram o amido modificado Hi-Cap 100® como material para o núcleo, o acetato de etila 99,5% foi utilizado como solvente orgânico e o CO₂ com pureza a 99,9% foi o antissolvente supercrítico (Pasquel Reátegui *et al.*, 2018).

A dispersão não emulsionada produzida apresentou um diâmetro de 716 ± 3 nm enquanto que a emulsão apresentou um diâmetro de 262 ± 2 nm após 24 horas de formulada. Em um trabalho anterior do mesmo grupo foi

demonstrado que após um dia de produção, tal tipo de formulação apresenta uma alta estabilidade cinética (Reátegui *et al.*, 2017). Com esta informação, pode-se inferir que a emulsão produzida no presente trabalho pode ser caracterizada como uma nanoemulsão.

Já a nanoemulsão produzida por Valentim e colaboradores (2018) foi feita a partir de uma metodologia de baixa energia. A fase oleosa, constituída por um surfactante não-iônico (polissorbato 80) e a oleorresina de copaíba (*C. officinalis*), foi misturada até que uma fase clara, transparente e homogênea fosse observada. Em seguida, houve adição de água, gota a gota, sob homogeneização constante por um vórtex por 5 minutos. A razão óleo/surfactante é de 1:1, a concentração do óleo, 5.000 ppm e a massa final da formulação, 10 g. Tal processo é mais vantajoso do que o apresentado no presente trabalho, pois o método de sonicação demanda e libera alta energia. Tal fato não é favorável a óleos e oleorresinas, já que eles são constituídos de ácidos graxos, os quais podem sofrer oxidação quando em contato com calor.

Para a caracterização e a análise de estabilidade da nanoemulsão à base de oleorresina de copaíba o equipamento zetasizer foi utilizado, assim como o presente estudo. Entretanto, Valentim verificou a formulação por 7 dias após produzida, enquanto que este trabalho acompanhou a estabilidade por 90 dias. Além disto, este trabalho armazenou a nanoemulsão a $25.5 \pm 2.0^\circ\text{C}$. Para efeitos de comparação, a Tabela 9 dispõe os dados de sete dias de análise de estabilidade da NeCop e da nanoemulsão à base de oleorresina de copaíba produzida por Valentim e colaboradores (2018).

Tabela 9 Ilustração do Diâmetro Hidrodinâmico, Índice de Polidispersão e Potencial Zeta da nanoemulsão à base de oleorresina de copaíba (NeCop) e da nanoemulsão à base de oleorresina de copaíba do grupo de Valentim (2018) após 7 dias de produzidas.

	Diâmetro hidrodinâmico	Índice de Polidispersão	Potencial Zeta
Nanoemulsão à base de oleorresina de copaíba	162,87±3,80 nm	0,210±0,03	-5,49±0,22 mV
Nanoemulsão de oleorresina de copaíba do grupo de Valentim (2018)	132.4±1.2 nm	0.297±0.006	-21.3±0.643mV

Dias e colaboradores (2012) desenvolveram uma nanoemulsão à base de oleorresina de copaíba, mas de uma espécie diferente da utilizada neste trabalho: *Copaifera multijuga* Hayne. A metodologia utilizada foi baseada em uma mistura de baixa com alta energia. O surfactante Span 80® (1%, m/m) foi disperso na oleorresina (10%, m/m) e o Tween 20® (2%, m/m) foi disperso em água (q.s.p 100%, m/v) e assim formaram-se duas fases. Tais fases foram misturadas por meio de agitação magnética por 5 minutos à temperatura ambiente para que uma emulsão bruta fosse obtida. Em seguida, a emulsão foi transferida para o equipamento de homogeneização de alta pressão a 750 bar para formar a nanoemulsão. Este trabalho utilizou somente um equipamento e uma metodologia para formular a NeCop. O sonicador, o qual libera ondas ultrassônicas de alta energia, foi usado. Além disso, somente um surfactante, biodegradável, foi empregado: a lecitina de ovo. Então, para se utilizar na indústria, o método de sonicação é mais adequado, já que há somente um passo em tal metodologia.

A caracterização das nanogotículas foi feita por meio do DLS no equipamento zetasizer. Observou-se que o diâmetro hidrodinâmico obtido foi de 140 nm e o potencial zeta, de -23,2 mV. Já o DH observado na NeCop foi ligeiramente maior, $159,3 \pm 0,75$ nm, enquanto que o PZ também foi maior, $-5,9 \pm 0,09$ mV.

Lucca e colaboradores (2018) produziram nanoemulsões à base de oleorresina de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne) pela mesma metodologia de Dias e colaboradores (2012). Além do DH e PZ, o Pdl também foi caracterizado pelo zetasizer (Tabela 10). Foram produzidos dois tipos de nanoemulsões com as matérias-primas citadas: nanoemulsão com carga negativa (NCN) e nanoemulsão com carga positiva (PCN).

Tabela 10 Diâmetro Hidrodinâmico, Índice de Polidispersão e Potencial Zeta da Nanoemulsão à base de oleorresina de copaíba (NeCop) e da nanoemulsão à base de oleorresina de copaíba do grupo de Lucca (2018).

	Diâmetro hidrodinâmico	Índice de Polidispersão	Potencial Zeta
Nanoemulsão com Carga Negativa	247.53 ± 1.46 nm	0.051 ± 0.041	- 17.00 ± 0.96 mV
Nanoemulsão com Carga Positiva	198.83 ± 2.69 nm	0.085 ± 0.039	22.43 ± 2.90 mV

Os valores foram bem diferentes daqueles encontrados na NeCop, a qual foi produzida com oleorresina de *C. officinalis*.

b) Caracterização morfológica e de superfície das nanogotículas das nanoemulsões

A superfície das nanogotículas da NeCop foi caracterizada por meio de microscopia eletrônica de varredura. Pode-se observar que as nanogotículas apresentam uma forma esférica e variam de tamanho (Figura 20). Oliveira e colaboradores (2019) desenvolveram uma nanoemulsão à base de óleo de copaíba estabilizada com hidrofobina II (HFBII). O comportamento da nanoemulsão em diferentes pHs foi analisado também por meio de um MEV. Os valores de pH estudados foram 6,0 e 7,4, além de se adicionar 25 mM de cloreto de sódio. Foi observado que somente no pH 7,4, sem a presença de cloreto de sódio, as nanogotículas eram esféricas, como as que foram encontradas neste trabalho.

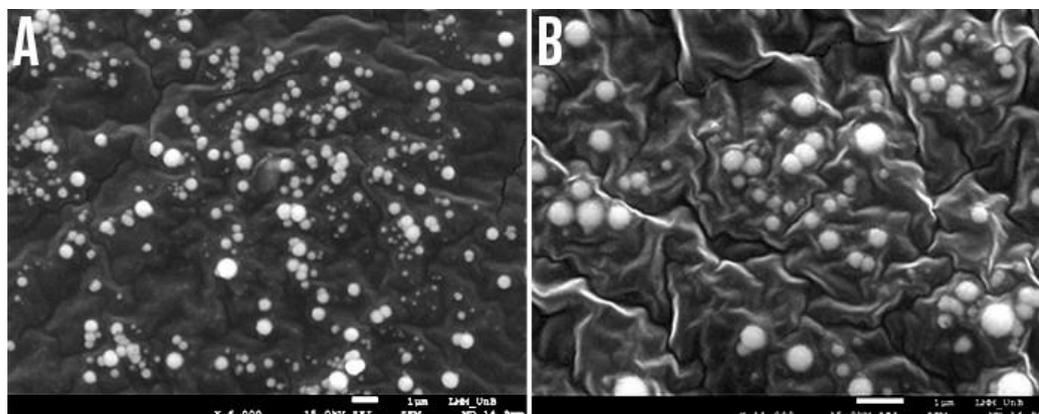


Figura 20 Micrografias de nanogotículas de nanoemulsões à base de óleo de copaíba. A) aumento de 6.000 vezes B) aumento de 11.000 vezes.

c) Caracterização macroscópica da NeCop

Um dia após o seu preparo, a NeCop e o B não apresentaram nenhum sinal macroscópico de instabilidade, como pode ser visto na Figura 21. A NeCop inclusive ficou similar àquela produzida pelo grupo de Valentim (2018) - Figura 22. A nanoemulsão feita por este grupo também não apresentou qualquer sinal de desestabilidade.



Figura 21 Fotografias da nanoemulsão à base de oleorresina de copaíba (A) e branco (B) feitos por nosso grupo. As fotos foram tiradas após 1 dia de produção das formulações.

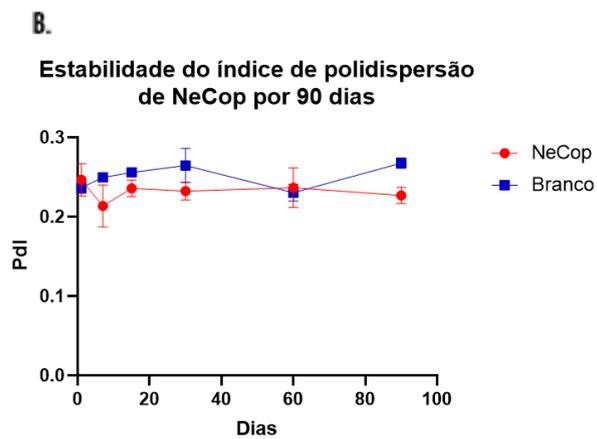
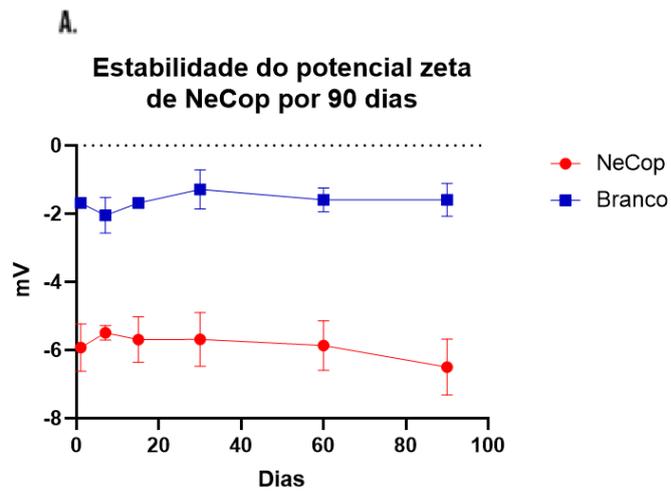


Figura 22 Fotografia da nanoemulsão à base de oleorresina de copaíba produzida pelo grupo de Valentim (2017).

d) Análise de estabilidade por DLS e macroscópica da NeCop

As formulações também permaneceram estáveis ao longo de 90 dias quanto aos parâmetros relacionados às nanogotículas (Figura 23) e aos parâmetros macroscópicos (Figura 24), assim como a nanoemulsão de Valentim e colaboradores (2018) que também permaneceu estável quanto aos parâmetros

das nanogotículas. Entretanto, o grupo de Valentim e colaboradores (2018) analisou a nanoemulsão por somente 7 dias após sua produção.



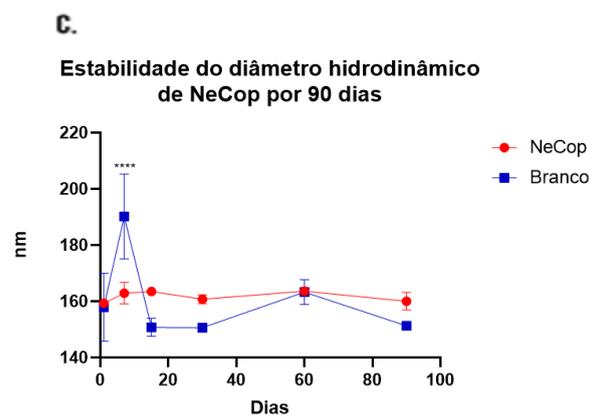


Figura 23 A) gráfico da estabilidade do diâmetro hidrodinâmico da NeCop por 90 dias, B) gráfico da estabilidade do índice de polidispersão da NeCop por 90 dias e C) gráfico da estabilidade do potencial zeta da NeCop por 90 dias



Figura 24 Aspectos macroscópicos de amostras da nanoemulsão à base de oleorresina de copaíba (A) e de amostras do branco (B) ao longo de 90 dias.

2.3.4.2 Ensaios *in vitro*

a) Ensaio de viabilidade celular – MTT

A fim de analisar como a NeCop se comporta em relação à viabilidade celular, o ensaio de MTT foi conduzido em células de macrófagos murinos (J774A.1). As concentrações de 5 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$, 15 $\mu\text{g/mL}$, 30 $\mu\text{g/mL}$, 45 $\mu\text{g/mL}$, 60 $\mu\text{g/mL}$, 90 $\mu\text{g/mL}$, 180 $\mu\text{g/mL}$ e 360 $\mu\text{g/mL}$ foram testadas por 24 horas nas células.

Foi observado que somente as concentrações de 5, 10 e 15 µg/mL da NeCop não diminuíram a viabilidade celular dos macrófagos (Figura 25). Pelo contrário, houve um ligeiro aumento desta viabilidade, fato também observado pelo tratamento com a oleorresina livre de copaíba. Então, pode-se concluir que os tratamentos, em tais doses e tempo, não foram tóxicos para as células J774A.1. Nigro e colaboradores (2020) produziram nanoemulsões à base de oleorresina de copaíba e realizaram o ensaio de MTT com os tratamentos nas concentrações de 10.000 µg/mL, 5.000 µg/mL, 2.500 µg/mL, 1.250 µg/mL, 630 µg/mL e 320 µg/mL por 24 horas em queratinócitos e fibroblastos. Todas as concentrações levaram a uma diminuição da viabilidade celular. Tal fato também foi observado neste trabalho, a concentração de 360 µg/mL diminuiu de forma estatisticamente considerável a viabilidade celular dos macrófagos murinos.

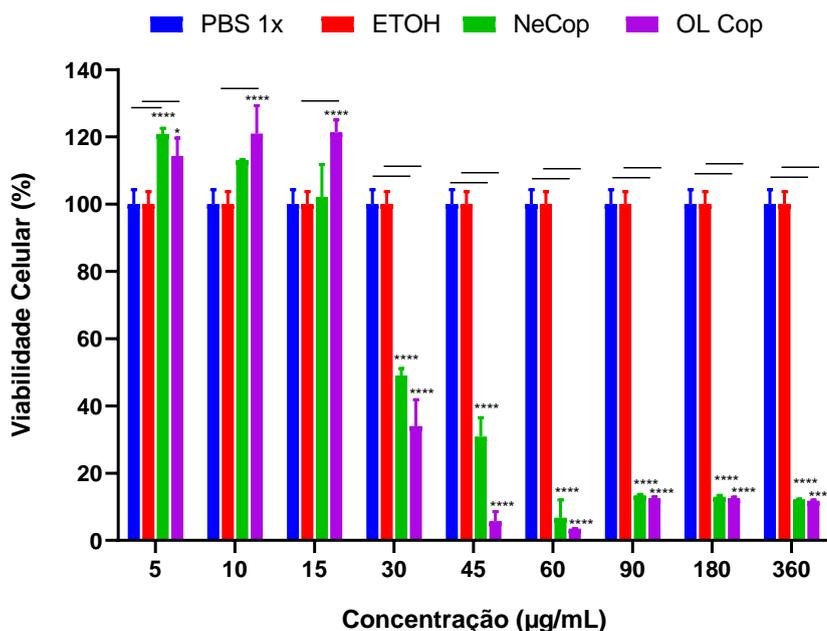


Figura 25 Gráfico referente ao ensaio de MTT do tratamento de 24 horas de NeCop em células J774A.1. PBS 1X: controle negativo; ETOH: etanol absoluto diluído em PBS 1X; NeCop: nanoemulsão à base de oleorresina de copaíba e OL Cop: óleo livre de copaíba ($p < 0,0001$).

b) Integridade de membrana plasmática de células J774A.1 de macrófagos murinos

As células de macrófago murino J774A.1 não sofreram uma significativa perda da integridade da membrana plasmática após 24 horas de tratamento com NeCop (Figura 26). Pode-se inferir que as células não estavam em processo de necrose, já que uma das características de tal morte celular é a ruptura da membrana plasmática (Golstein and Kroemer, 2007). Soares e colaboradores (2013) produziram uma oleorresina de copaíba comercial (*Copaifera* ssp.) e testaram a resina em macrófagos. Assim como neste estudo, a oleorresina não promoveu uma ruptura da membrana celular dos macrófagos.

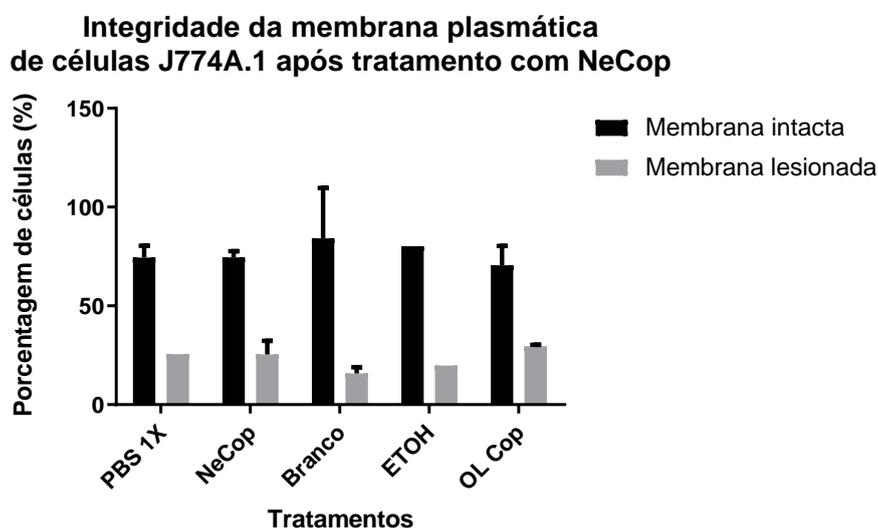


Figura 26 Gráfico da integridade de membrana das células J774A.1 após 24h de tratamento com nanoemulsão à base de oleorresina de copaíba. PBS 1X: controle negativo; ETOH: etanol absoluto diluído em PBS 1X; NeCop: nanoemulsão à base de oleorresina de copaíba; Branco: nanoemulsão vazia e OL Cop: óleo livre de copaíba.

c) Fragmentação de DNA

Foi observado que nenhum tratamento levou a uma fragmentação de DNA estatisticamente significativa. Ou seja, muito provavelmente, as células J447A.1 não estavam em processo de morte celular, nem em processo apoptótico mais especificamente (Figura 27).

A morte celular programada, ou apoptose, é o mecanismo principal pelo qual células com danos são eliminadas (Jacobson *et al.*, 1997; Vaux &

Korsmeyer, 1999; McIlroy *et al.*, 2000). Sinais que induzem apoptose são relativamente diversos e como exemplos, podem-se citar a ligação dos receptores de morte celular à superfície da célula, estresse oxidativo e danos ao DNA (Nagata, 1997; McIlroy *et al.*, 2000;). A quebra de um seletivo grupo de substratos por caspases “downstream” (Stroh & Schulze-Osthoff, 1998; McIlroy *et al.*, 2000) é responsável pelo desmantelamento de componentes celulares essenciais, os quais resultam em mudanças morfológicas e bioquímicas que caracterizam a morte celular por apoptose: rearranjo do citoesqueleto, perda da integridade de membrana, condensação do núcleo e fragmentação de DNA. A degradação do DNA nuclear é uma das características que melhor define a morte celular por apoptose (Wyllie, 1980; Earnshaw, 1995; McIlroy *et al.*, 2000).

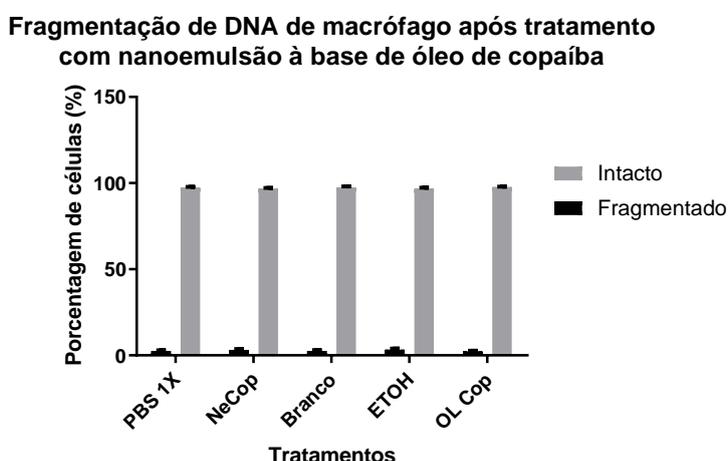


Figura 27 Análise da fragmentação de DNA de células J44A.1 após 24 horas de tratamento com nanoemulsão à base de oleorresina de copaíba. PBS 1X: controle negativo; NeCop: nanoemulsão da oleorresina; Branco: nanoemulsão vazia; ETOH: etanol, controle negativo da oleorresina e OL Cop: oleorresina livre de copaíba.

d) Exposição das nanogotículas da NeCop às células J774A.1

Observou-se no ensaio de exposição de nanogotículas de oleorresina de copaíba nas células J774A.1 que em meia hora após as células receberem o tratamento com a NeCop, houve uma internalização de 57,1% das nanogotículas. Já depois de 1 hora de tratamento, a porcentagem de internalização foi praticamente a mesma: 57,8%. Enquanto que em 2 horas de tratamento, as nanogotículas sofreram uma internalização pelas células de 67,8% (Figura 28).

Exposição de nanotículas de óleo de copaíba com macrófagos J774A.1

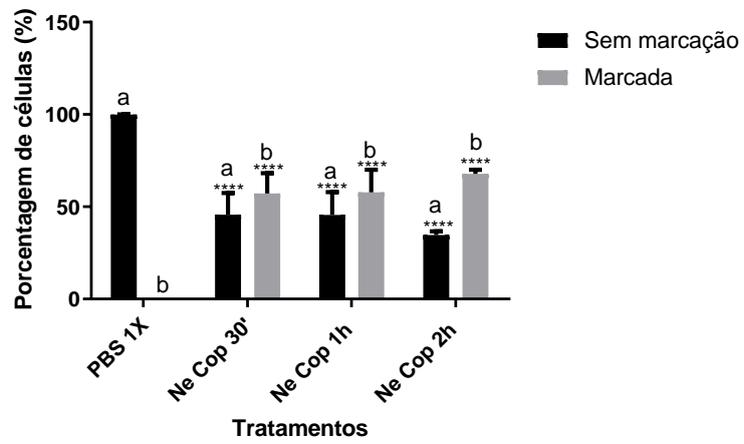


Figura 28 Representação da internalização das nanotículas de oleorresina de copaíba nas células J744A.1 de macrófago murino. Asteriscos indicam $p < 0,05$ vs PBS 1X.

2.3.3.3 Experimentos *in vivo*

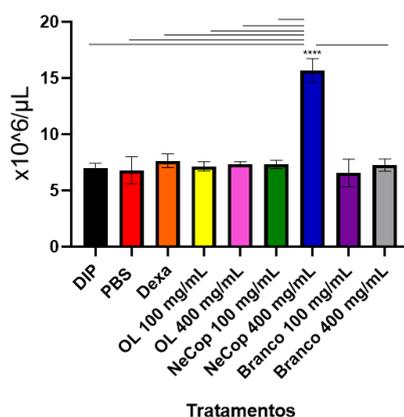
a) Análises hematológicas e sorológicas

Os exames de parâmetros sanguíneos são procedimentos de rotina em humanos e são bastante importantes para decisões clínicas (Williamson and Snyder, 2016). A partir deles, pode-se entender o estado de um paciente e verificar a presença de doenças, por exemplo. Outro ponto importante é a possibilidade de se analisar se um novo medicamento em desenvolvimento é tóxico ou não para as pessoas através de ensaios pré-clínicos *in vivo*. Assim, exames sorológicos e hematológicos foram conduzidos neste trabalho em ratos Wistar com a finalidade de observar se a oleorresina de copaíba e NeCop da espécie *Copaifera officinalis* apresentavam efeitos nocivos aos animais.

Em relação aos índices hematimétricos, foram realizadas a contagem de eritrócitos e leucócitos, bem como o hematócrito, e as concentrações de hemoglobina e de plaquetas. A Figura 29 representa o gráfico da contagem de glóbulos brancos e vermelhos. Observou-se que os ratos tratados com dexametasona apresentaram um maior número de leucócitos (leucocitose) em comparação com aqueles tratados com dipirona, oleorresina na concentração de 400 mg/mL, NeCop na dose de 100 mg/mL, e as nanoemulsões vazias (brancos) nas doses de 100 e 400mg/mL.

Já os ratos tratados com NeCop 400 mg/mL apresentaram o número de eritrócitos maior estatisticamente ($p < 0,0001$) em relação a todos os outros tratamentos (Figura 29). Ou seja, os ratos deste grupo estão policitêmicos e uma das causas que pode levar à policitemia é a desidratação (Marty and Marty, 2015).

A. Hemácias dos ratos Wistar após 21 dias de tratamento



B. Glóbulos Brancos dos ratos Wistar após 21 dias de tratamento

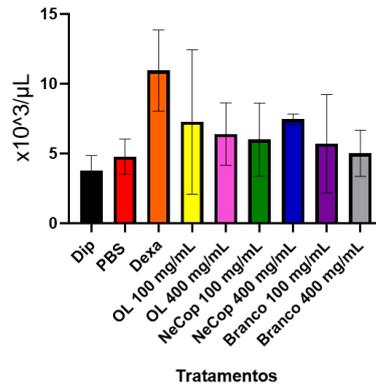


Figura 29 Gráfico do número de eritrócitos – A - e leucócitos (glóbulos brancos) – B - dos ratos Wistar após 21 dias de tratamentocom nanoemulsão à base de oleorresina de copaíba nas doses de 100 e 400 mg/mL. (DIP: dipirona, Dexa: dexametasona, OL: oleorresina de copaíba livre, NeCop: nanoemulsão à base de oleorresina de copaíba, Branco: nanoemulsão vazia). Asteriscos indicam $p < 0,0001$ entre os grupos indicados.

Como esperado, o hematócrito (porcentagem de eritrócitos) mostrou a mesma tendência que a contagem das células vermelhas. Os ratos tratados com NeCop 400 mg/mL apresentaram um hematócrito significativamente maior do que os ratos submetidos aos outros tratamentos (Figura 30). Tal fato também é indicativo de desidratação.

Hematócrito dos ratos Wistar após 21 dias de tratamento

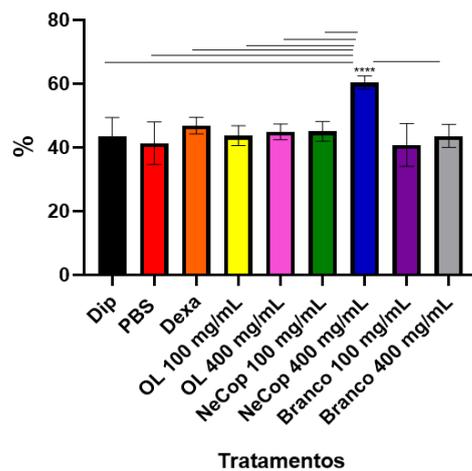


Figura 30 Gráfico da porcentagem das células vermelhas (hematócrito) dos ratos Wistar após 21 dias de tratamento com nanoemulsão à base de oleorresina de copaíba nas doses de 100 e 400 m/mL. (DIP: dipirona, Dexa: dexametasona, OL: oleorresina de copaíba livre, NeCop: nanoemulsão à base de oleorresina de copaíba Branco: nanoemulsão vazia). Asteriscos indicam $p < 0,0001$ entre os grupos indicados.

Tal como o hematócrito, a concentração de hemoglobina dos ratos tratados com NeCop 400 mg/mL estava elevada em comparação à dos animais submetidos aos outros tratamentos (Figura 31). Este fato também pode ser um indício de desidratação, de acordo com Marty & Marty (2015).

Hemoglobina dos ratos Wistar após 21 dias de tratamento

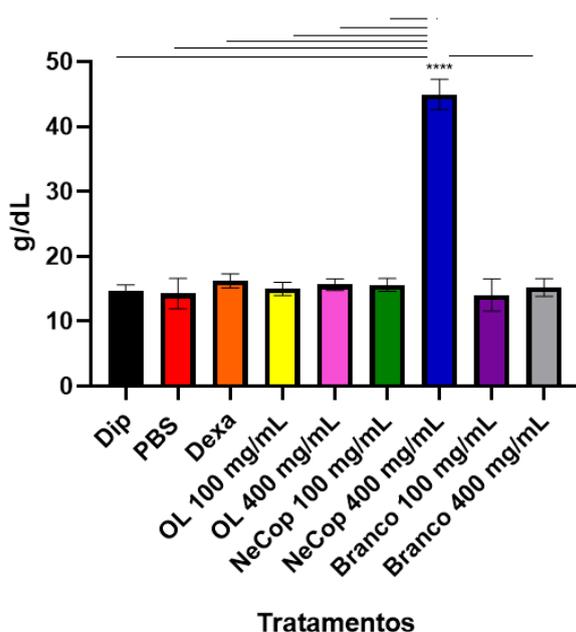


Figura 31 Gráfico da taxa de hemoglobina dos ratos Wistar após 21 dias de tratamento com nanoemulsão à base de oleorresina de copaíba nas doses de 100 e 400 mg/mL. (DIP: dipirona, Dexa: dexametasona, OL: oleorresina de copaíba livre, NeCop: nanoemulsão à base de oleorresina de copaíba Branco: nanoemulsão vazia). Asteriscos indicam $p < 0,05$ entre os grupos indicados.

Já o número de plaquetas dos ratos tratados com NeCop 400 mg/mL foi estatisticamente menor em relação aos tratamentos da oleorresina livre 400 mg/mL, NeCop 100 mg/mL e branco 400 mg/mL (Figura 32). Concentração de plaquetas diminuída pode significar uma leucemia aguda, anemia aplásica, uso de quimioterápicos, mas a causa mais plausível é efeito colateral de alguma substância que foi administrada para o animal ou pessoa (Marty and Marty, 2015).

Plaqueta dos ratos Wistar após 21 dias de tratamento

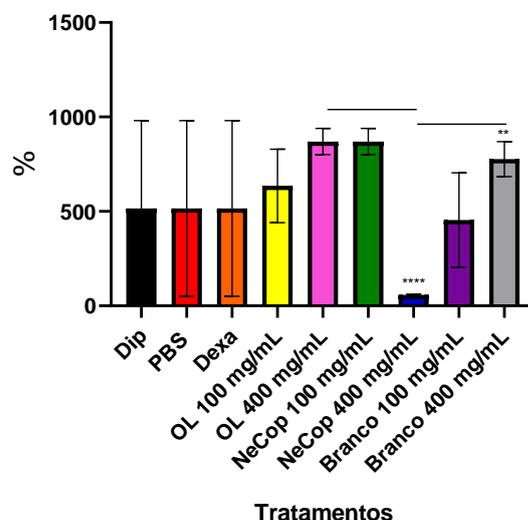


Figura 32 Gráfico do plaquetograma dos ratos Wistar após 21 dias de tratamento com nanoemulsão à base de oleorresina de copaíba nas doses de 100 e 400 mg/mL. (DIP: dipirona, Dexa: dexametasona, OL: oleorresina de copaíba livre, NeCop: nanoemulsão à base de oleorresina de copaíba, Branco: nanoemulsão vazia). Asteriscos indicam $p < 0,05$ entre os grupos indicados.

Para as análises bioquímicas em soro foram verificados a albumina, ALT, AST, colesterol, creatinina, glicose, lipoproteína de baixa densidade (LDH), ureia e triacilglicerídeos. A albumina é uma das proteínas mais importantes que circulam na corrente sanguínea. Apresenta meia vida de cerca de 20 dias e a sua concentração plasmática pode refletir tanto a sua velocidade de síntese quanto a sua degradação e o seu volume de distribuição. Tais fatores são regulados por fatores como nutrição, atividade hepática, pressão oncótica do soro, citocinas e hormônios (Williamson and Snyder, 2016).

A figura 33 representa o gráfico da albumina após o tratamento dos ratos por 21 dias. Comparações entre os tratamentos dipirona e dexametasona, PBS e oleorresina de copaíba 100 mg/mL, PBS e branco 400 mg/mL, e dipirona e branco 400 mg/mL foram estatisticamente diferentes entre si.

Albumina dos ratos Wistar após 21 dias de tratamento

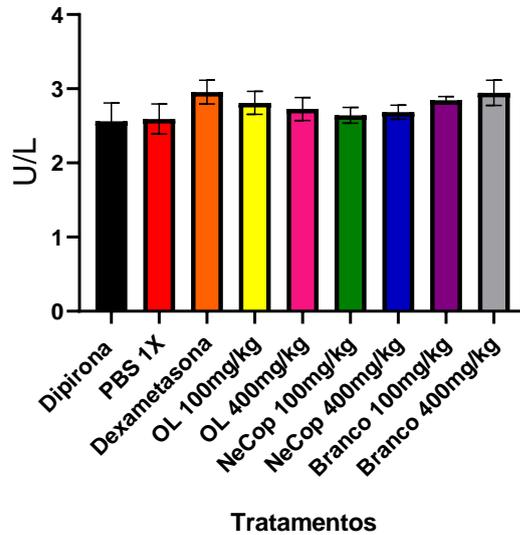
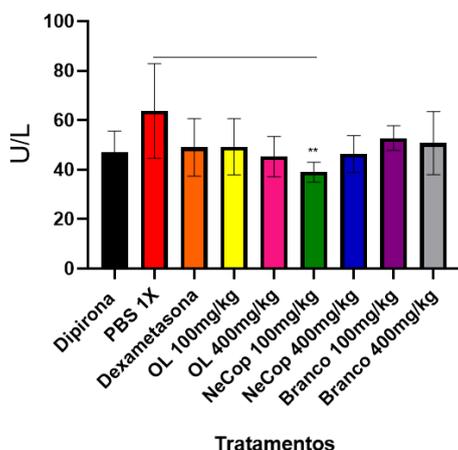


Figura 33 Gráfico da albumina dos ratos Wistar após 21 dias de tratamento com nanoemulsão à base de oleorresina de copaíba nas doses de 100 e 400 mg/mL. (OL: oleorresina de copaíba livre, NeCop: nanoemulsão à base de oleorresina de copaíba Branco: nanoemulsão vazia).

As transaminases aspartato aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) são enzimas cuja quantificação no sangue serve para a detecção de problemas hepatocelulares agudos ligados à administração de fármacos bem como a lesões hepáticas causadas por tais substâncias (Williamson and Snyder, 2016). A atividade de ALT foi significativamente menor em ratos tratados com NeCop 100 mg/mL em relação aos animais tratados com PBS (Figura 34A). Para a AST, houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos PBS com dipirona, OL e NeCop 400 mg/mL e NeCop 100 mg/mL (Figura 34B). Do ponto de vista biológico, a quantificação das atividades de AST e ALT realizada neste trabalho demonstrou que o óleo de copaíba livre ou em nanoemulsão não é hepatotóxico, visto que não causou um aumento nesses parâmetros.

A. ALT dos ratos Wistar após 21 dias de tratamento



B. AST dos ratos Wistar após 21 dias de tratamento

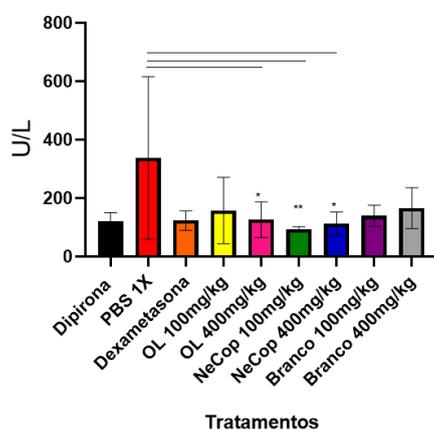


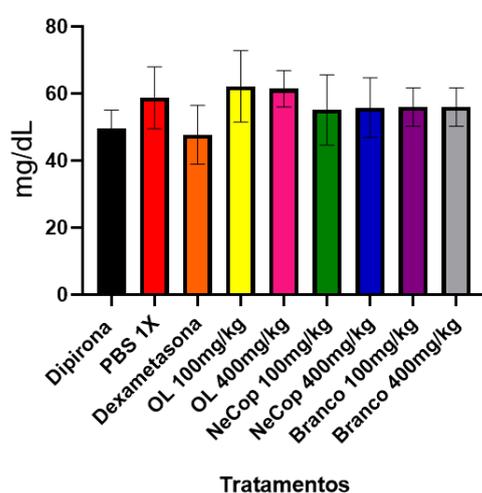
Figura 34 Gráficos da Alanina aminotransferase (ALT) - A - e Aspartato aminotransferase (AST) - B dos ratos Wistar após 21 dias de tratamentos com nanoemulsão à base de oleorresina de copaíba (NeCop) nas doses de 100 e 400 mg/mL). (OL: Oleorresina Livre). Asteriscos indicam $p < 0,05$ entre os grupos indicados.

O colesterol é um lipídeo esteroideal presente na corrente sanguínea associado a partículas lipoproteicas, como a lipoproteína de alta densidade (HDL) e a lipoproteína de baixa densidade (LDL). Esta molécula é fundamental para o bom funcionamento do organismo, já que faz parte da membrana plasmática, é precursora de ácidos biliares e de hormônios esteroideais, como progesterona, estrogênio e glicocorticoides (Williamson and Snyder, 2016). No entanto, a hipercolesterolemia, que consiste no aumento da concentração de colesterol no sangue, está ligada a doenças cardiovasculares (Williamson and Snyder, 2016).

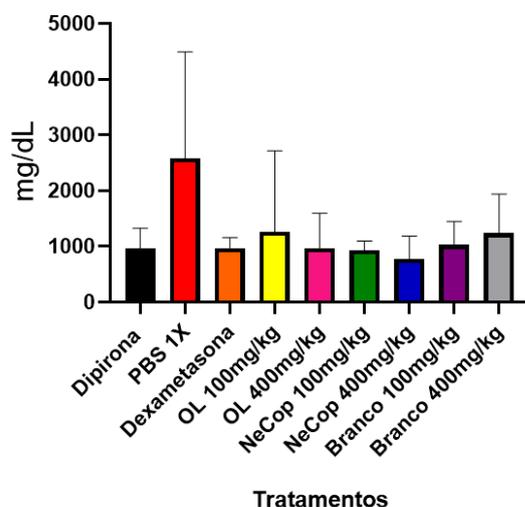
Os triacilglicerídeos são outro tipo de lipídeo, o qual serve de fonte de energia para o organismo. Geralmente são armazenados no tecido adiposo. A hipertriacilglicerolemia, que consiste em concentrações anormalmente altas de triacilglicerídeos na corrente sanguínea, é associada a um maior risco de doenças coronarianas e arteriosclerose (Williamson and Snyder, 2016) .

Com a administração de oleorresina e de uma nanoformulação lipídica, seria possível que houvesse alterações nas concentrações de colesterol, LDL e triacilglicerídeos no sangue de ratos tratados com tais substâncias. Entretanto, estes parâmetros permaneceram semelhantes aos dos outros grupos (Figura 35).

A. Colesterol dos ratos Wistar após 21 dias de tratamento



B. LDH dos ratos Wistar após 21 dias de tratamento



C. Triglicérides dos ratos Wistar após 21 dias de tratamento

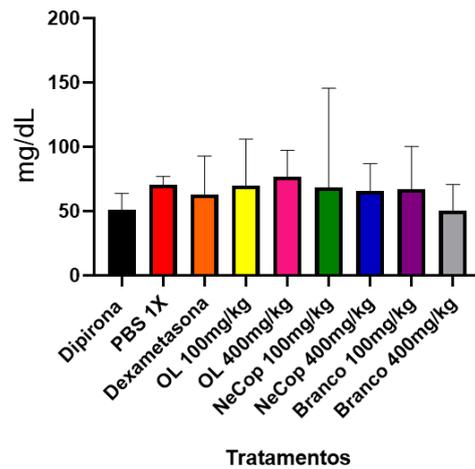


Figura 35 Lipidograma de ratos Wistar após 21 dias de tratamento com nanoemulsão à base de oleorresina de copaíba (NeCop) nas doses de 100 de 400 mg/mL. A – Colesterol; B – LDH e C – Triglicérides. (OL: Oleorresina Livre de copaíba).

A creatina é formada no fígado e é captada pelo músculo para armazenamento de energia no formato de fosfato de creatina. Este é metabolizado em creatinina, que vai para a corrente sanguínea e, por fim, é excretada pelos rins. Sua concentração no sangue pode estar aumentada em indivíduos com problemas renais e em algumas doenças como na esclerose lateral amiotrófica, miastenia gravis e hipertireoidismo (Williamson and Snyder, 2016). No caso dos tratamentos realizados neste trabalho, nenhum alterou esse parâmetro nos ratos (Figura 36).

Creatinina K dos ratos Wistar após 21 dias de tratamento

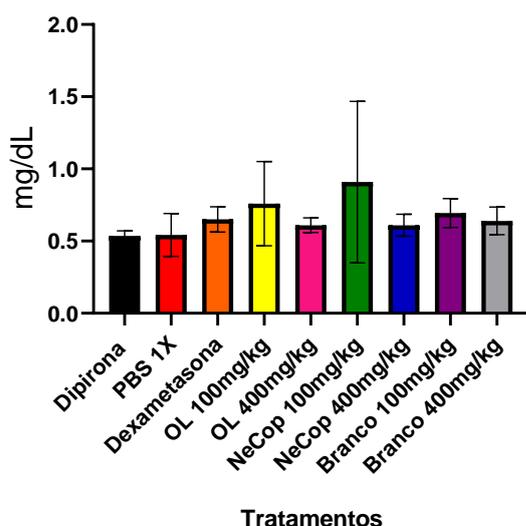


Figura 36 Gráfico da Creatinina dos ratos Wistar após 21 dias de tratamento com nanoemulsão à base de oleorresina de copaíba nas doses de 100 e 400 mg/mL. (OL: oleorresina de copaíba livre, NeCop: nanoemulsão à base de oleorresina de copaíba Branco: nanoemulsão vazia).

A glicemia é outro parâmetro importante para se analisar o bem-estar de um indivíduo. A glicose é um monossacarídeo do tipo aldo-hexose e, assim como os triacilglicerídeos, serve de fonte de energia para o organismo. Valores de glicemia alterados podem estar relacionados a distúrbios do metabolismo (Williamson and Snyder, 2016). Os tratamentos administrados para os ratos Wistar não levaram a nenhuma alteração na glicemia (Figura 37).

Glicose dos ratos Wistar após 21 dias de tratamento

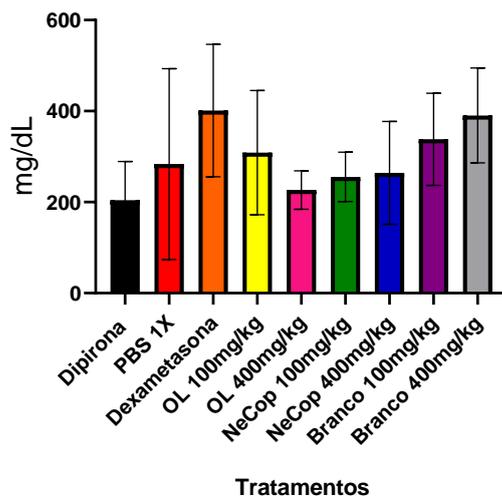


Figura 37 Gráfico da Glicose dos ratos Wistar após 21 dias de tratamento com nanoemulsão à base de oleorresina de copaíba nas doses de 100 e 400 mg/mL. (OL: oleorresina de copaíba livre, NeCop: nanoemulsão à base de oleorresina de copaíba, Branco: nanoemulsão vazia).

A ureia é proveniente do catabolismo de proteínas e ácidos nucleicos, sendo produzida principalmente no fígado. A sua quantificação constitui o teste de triagem mais comum para se avaliar a função renal (Williamson and Snyder, 2016). Assim como o colesterol, a creatinina, a glicose, o LDH e os triacilglicerídeos, a concentração de ureia no sangue não foi alterada de forma estatisticamente significativa pelos tratamentos (Figura 38).

Ureia dos ratos Wistar após 21 dias de tratamento

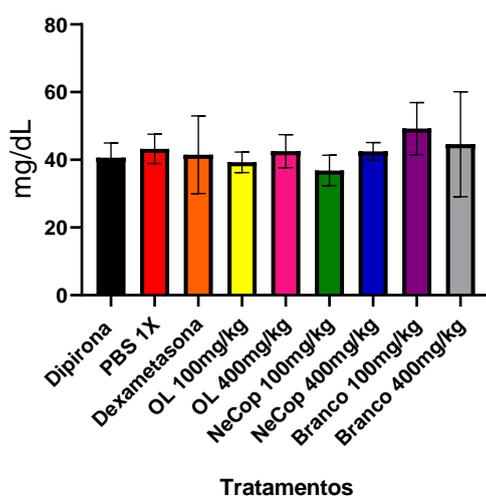


Figura 38 Gráfico da Ureia dos ratos Wistar após 21 dias de tratamento com nanoemulsão à base de oleorresina de copaíba nas doses de 100 e 400 mg/mL. (OL: oleorresina de copaíba livre, NeCop: nanoemulsão à base de oleorresina de copaíba, Branco: nanoemulsão vazia).

A partir dos dados dos exames dos índices hematimétricos e análises bioquímicas, observou-se que os ratos tratados com NeCop 400 mg/mL provavelmente estavam desidratados. Tal tratamento também pode ter causado algum efeito colateral nos ratos, mas mais ensaios seriam necessários para se afirmar esta constatação. Todos os tratamentos em todas as doses (oleorresinas livres de copaíba e nanoemulsões à base de oleorresina de copaíba) não alteraram nenhum outro parâmetro por 21 dias nos ratos Wistar. Pode-se inferir que não houve toxicidade aguda nos animais testados.

Um estudo conduzido com a oleorresina de copaíba da espécie *Copaifera reticulata Ducke*, em ratos que sofreram indução de inflamação na língua mostrou que não houve toxicidade oral aguda nos 5 ratos Wistar de cada grupo de tratamento. Eles receberam a dose máxima da oleorresina (2.000 mg/kg/dia). Nenhum rato morreu nem teve sinal de toxicidade durante o teste de 48 horas realizado (Teixeira *et al.*, 2017).

Já o estudo em pulmões de camundongos Balb/c que tiveram asma induzida com ovalbumina revelou que oleorresinas de copaíba de diferentes

espécies não produziram toxicidade subaguda em 15 fêmeas de 2 meses de idade. Parâmetros como glicose, creatinina, ureia, AST, ALT, fosfatase alcalina (ALK) e albumina foram analisados. A toxicidade subaguda foi analisada nas funções renais, hepáticas e nos efeitos na glicose por um tempo prolongado, como caracterizado pelos autores, de 12 dias. A oleorresina foi administrada por gavagem nas doses de 50 e 100 mg/kg. Não houve alteração nas funções analisadas (Caputo *et al.*, 2020).

b) Efeitos antinociceptivos e anti-inflamatórios

Nocicepção é um termo proveniente do latim “noceo”, que significa fazer mal, prejudicar, lesar. É um substantivo feminino muito utilizado em medicina e quer dizer “processo de percepção e transmissão de estímulos que causam dor” (Dicionário Priberam, 2022).

A nocicepção está diretamente relacionada à inflamação, a qual possui cinco sinais: rubor, calor, edema, dor e em um estágio mais avançado, perda de função. Por conseguinte, é importante o estudo destes sinais na avaliação de formulações anti-inflamatórias. O presente trabalho avaliou dois deles, a nocicepção e o edema.

Os tratamentos com as oleorresinas livres de copaíba, nas duas doses testadas, não levaram a uma analgesia estatisticamente significativa em relação ao controle negativo com carragenina (PBS+carragenina). Entretanto, as nanoemulsões NeCop 100 mg/mL e NeCop 400 mg/mL não apresentaram analgesia significativa em comparação com o controle PBS+carragenina (Figura 39).

Análise de dor por analgesímetro de dor Von Frey de ratos Wistar

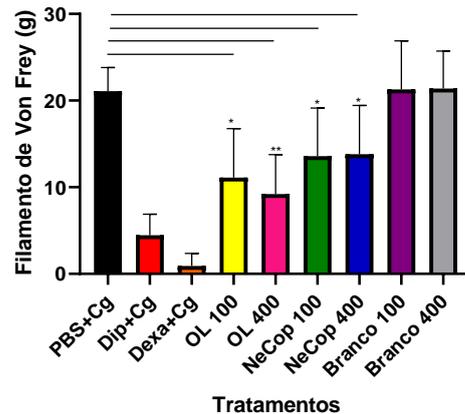


Figura 39 Gráfico referente ao efeito nociceptivo dos ratos Wistar após 3 horas de administração de carragenina. (Cg: carragenina, Dip: dipirona, Dexa: dexametasona, OL: oleorresina de copaíba livre, NeCop: nanoemulsão à base de oleorresina de copaíba, BL: nanoemulsão vazia). Asteriscos indicam $p < 0,0001$ entre os grupos indicados.

De acordo com Dalenogare e colaboradores (2019), a oleorresina possui o ácido kaurenóico, uma das substâncias com potenciais antinociceptivos e anti-inflamatórios. Tal grupo caracterizou a oleorresina de copaíba de *Copaifera officinalis* e testou esta matéria vegetal bem como o ácido kaurenóico a fim de analisar os efeitos adversos em camundongos. Foram utilizados no experimento camundongos Swiss machos e fêmeas com cerca de 30 g. Eles foram submetidos a um modelo de dor de inflamação crônica induzida por injeção do Adjuvante Completo de Freund's (CFA) na pata. Diferentes doses da oleorresina e do ácido kaurenóico induziram efeitos antinociceptivos 1 hora após a administração dessas substâncias nos camundongos. Além disso, a oleorresina e o ácido kaurenóico, que foram administrados intragastricamente, levaram a uma menor nocicepção também 1 hora após o tratamento (Dalenogare *et al.*, 2019). Outro sinal da inflamação avaliado foi o edema nas patas de membros pélvicos dos ratos. De acordo com a Figura 40, os tratamentos com a oleorresina livre de copaíba e as nanoemulsões não alteraram o edema em comparação aos controles positivos dipirona (Dip) com carragenina (Cg) e dexametasona (Dexa) com Cg

Análise de edema de pata de ratos Wistar após 21 dias de tratamento

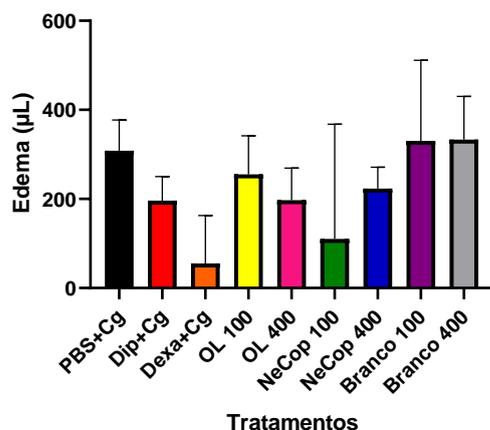


Figura 40 Gráfico referente ao edema de pata dos ratos Wistar após 3 horas de administração de carragenina (Cg: carragenina, Dip: dipirona, Dexa: dexametasona, OL: oleorresina de copaíba livre, NeCop: nanoemulsão à base de oleorresina de copaíba, Branco: nanoemulsão vazia).

Tal resultado é peculiar, pois esperava-se que pelo menos as oleorresinas livres diminuíssem o edema de forma significativa. De acordo com Teixeira e colegas (2017), a oleorresina de copaíba de *Copaifera reticulata* Ducke teve um efeito modulatório em língua de rato inflamada. Tal efeito pode ser referente ao β -cariofileno, o qual é o principal terpeno da oleorresina (59,89%) utilizada neste trabalho. Além disso, a literatura tem mostrado que uma alta concentração do composto é responsável primariamente pela característica anti-inflamatória da oleorresina (Sachetti *et al.*, 2009; Teixeira *et al.*, 2017). O mecanismo de ação descrito é a ligação do composto aos receptores CB2. Tais receptores, quando ativados, estimulam a secreção de citocinas pró-inflamatórias e, por conseguinte, há um aumento da resposta dos linfócitos T e B (Custódio & Veiga-Junior, 2012; Gertsch *et al.*, 2008, Teixeira *et al.*, 2017)

Ao avaliar a resposta da oleorresina em língua de rato inflamada, Teixeira e colaboradores (2017) observaram que o tratamento levou a uma redução do edema da língua. Entretanto, não foi estatisticamente significativo, quando comparado ao grupo controle. Além disso, foi observado que o tratamento teve um efeito anti-inflamatório, levou à diminuição da intensidade do infiltrado inflamatório crônico em relação ao grupo controle e a resposta foi similar ao grupo tratado com dexametasona (Teixeira *et al.*, 2017).

Já Lucca e colaboradores (2018) analisaram efeitos de um hidrogel que contém oleorresina de copaíba de *Copaifera multijuga* Hayne na inflamação. Foram utilizados camundongos machos Swiss adultos e 30 ratos machos Wistar. A dose da oleorresina no hidrogel foi de 200 mg/mL. O edema foi induzido na orelha direita dos camundongos e na pata dos ratos por meio do ácido aracdônico (solução em etanol (0.2 mg/ μ L) na dose de 2 mg/orelha (10 μ L). Com os ensaios, observou-se que a oleorresina nanoemulsionada em hidrogel possui atividade anti-inflamatória tópica (Lucca *et al.*, 2018).

O edema de pata foi induzido por administração intraplantar de formalina a 10%. É de conhecimento geral que a formalina leva a uma resposta edematosa de 2 fases. A primeira delas (normalmente depois de 5 minutos da indução do edema) leva à liberação da substância P e bradicinina. Nesta fase, considera-se o surgimento de uma dor neuropática. Já na segunda fase, histamina, serotonina, prostaglandinas e bradicininas atuam no local da indução e há o surgimento da inflamação (Sadeghi *et al.*, 2014; Lucca *et al.*, 2018).

Também foi observado que a oleorresina de copaíba livre e as nanoemulsões incorporadas no hidrogel inibiram significativamente o edema em comparação ao grupo controle inflamado, com efeito semelhante ao produzido pelo fármaco controle, cetoprofeno, um AINE (Lucca *et al.*, 2018).

Foi observado que as formulações e a oleorresina reduziram a produção de ácido aracdônico. Assim, a oleorresina pode estar envolvida na inibição da COX e LOX como os medicamentos tradicionais para a inflamação (Lucca *et al.*, 2018).

Outro trabalho de Lucca e colaboradores (2017), precursor do trabalho citado anteriormente, produziu dois tipos de nanoemulsão à base de oleorresina de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne): uma nanoemulsão com PZ positivo e outra com PZ negativo. As nanoemulsões foram administradas por via tópica na orelha de camundongos Swiss antes de 1 hora que o edema de orelha fosse induzido por meio do ácido aracdônico. Foi observado que a nanoemulsão à base de oleorresina de copaíba negativa mostrou uma atividade antiedema mais intensa em relação à nanoemulsão positiva, a qual foi estatisticamente igual ao controle positivo cetoprofeno. Entretanto, tal forma farmacêutica apresenta

pouca viscosidade para ser aplicada por via tópica. Então, o grupo decidiu incorporar a formulação em um hidrogel, já que é um material que tem a capacidade de aderir à pele. Como é um material aquoso, com toque úmido e agradável, não possui afinidade por óleo, então é ideal a incorporação da oleorresina de copaíba em uma nanoemulsão para que esta também seja incorporada pelo hidrogel (Lucca *et al.*, 2017).

Os testes de nocicepção/dor e de edema do presente trabalho não levaram a uma melhora da nocicepção e do edema nos ratos. Algumas diferenças podem ser citadas em relação aos trabalhos de Lucca. Primeiramente, a espécie dos trabalhos é diferente: enquanto que a utilizada neste trabalho foi a *Copaifera officinalis*, a espécie usada por Lucca e colaboradores foi a *Copaifera multijuga* Hayne. Entre uma mesma espécie pode ocorrer variação na concentração dos componentes, quiçá haverá diferenças entre espécies distintas (Leandro *et al.*, 2012). Lucca e colaboradores utilizaram a metodologia de Dias *et al.* (2012) para formular a nanoemulsão à base de oleorresina de copaíba. O protocolo envolve duas etapas, uma de baixa e outra de alta energia: a agitação magnética e a utilização do equipamento de homogeneização de alta pressão a 750 bar. Já o presente trabalho utilizou o protocolo de Ombredane *et al.* (2020), o qual é constituído de somente uma etapa, de alta energia, que é a sonicação. Outra diferença foi a forma farmacêutica de administração da nanoemulsão. Enquanto que Lucca e colaboradores incorporaram a nanoemulsão em um hidrogel, este trabalho usou a nanoemulsão livre. Por fim, a via de administração foi diferente, este trabalho usou a via oral para administrar a NeCop para os ratos e aquele usou a via tópica. Há algumas diferenças importantes entre os dois trabalhos e, por isso, este trabalho não apresentou uma diferença no nível de nocicepção e edema que os trabalhos de Lucca demonstraram.

2.3.5 Conclusão

Nanoemulsão à base de oleorresina de copaíba (NeCop) foi formulada com sucesso pelo método de alta energia. Além disso, tanto a NeCop quanto o B permaneceram estáveis em relação a aspectos das nanogotículas, como DH, Pdl e PZ e a aspectos macroscópicos como coalescência, floculação,

cremagem, sedimentação e “Ostwald ripening”. Por meio de um microscópio eletrônico de varredura, pode-se observar a superfície da formulação, a qual apresenta uma estrutura esférica. Já em relação à interação da NeCop com as células de macrófago murino (J774A.1), observou-se que a viabilidade celular apresenta um ligeiro aumento com o tratamento por um dia nas concentrações de 5, 10 e 15 µg/mL e que não há ruptura da membrana plasmática. Porém, *in vivo*, não houve efeito anti-inflamatório mediado pelas formulações administradas por via oral aos ratos. Estudos futuros podem usar modelos de inflamação diferentes, doses maiores da oleorresina ou mesmo outras vias de administração para que seja evidenciado eventual efeito anti-inflamatório desta nanoemulsão.

2.3.6 Referências bibliográficas:

ALGHUTHAYMI, M. A. *et al.* Myconanoparticles: synthesis and their role in phytopathogens management. <http://mc.manuscriptcentral.com/tbeq>, v. 29, n. 2, p. 221–236, 2015.

ANTON, N.; BENOIT, J. P.; SAULNIER, P. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates-A review. **Journal of Controlled Release**, v. 128, n. 3, p. 185–199, 24 jun. 2008.

ANTON, N.; VANDAMME, T. F. Nano-emulsions and micro-emulsions: Clarifications of the critical differences. **Pharmaceutical Research**, v. 28, n. 5, p. 978–985, maio 2011.

BARRADAS, T. N. *et al.* Hydrogel-thickened nanoemulsions based on essential oils for topical delivery of psoralen: Permeation and stability studies. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 116, p. 38–50, 1 jul. 2017.

BARRADAS, T. N.; SILVA, K. G. DE H. E. Nanoemulsions of essential oils to improve solubility, stability and permeability: a review . **Environmental Chemistry Letters**, v. 19, p. 1153–1171, 2020.

BAYDA, S. *et al.* The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical–Physical Applications to Nanomedicine. **Molecules**, v. 25, n. 1, p. 1–33, 2020.

BUZA, N.; DIZDAR, M. **Cmbebih 2017**. [s.l: s.n.]. v. 62

CAPUTO, L. S. *et al.* Copaiba oil suppresses inflammation in asthmatic lungs of BALB/c mice induced with ovalbumin. **International Immunopharmacology**, v. 80, p. 1–10, 1 mar. 2020.

CHATTERJEE, P.; KUMAR, S. Current developments in nanotechnology for cancer treatment. **Materials Today: Proceedings**, v. 48, p. 1754–1758, 1 jan. 2022.

CHEBIL, A. *et al.* Ostwald ripening of nanoemulsions stopped by combined interfacial adsorptions of molecular and macromolecular nonionic stabilizers. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 425, p. 24–30, 20 maio 2013.

CHIESA, M. *et al.* Thermal conductivity and viscosity of water-in-oil nanoemulsions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 326, n. 1–2, p. 67–72, 15 ago.

2008.

CRAIG, D. Q. M. *et al.* An investigation into the mechanisms of self-emulsification using particle size analysis and low frequency dielectric spectroscopy. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 114, n. 1, p. 103–110, 31 jan. 1995.

CUNHA, T. M. *et al.* An electronic pressure-meter nociception paw test for mice. **Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 3, p. 401–407, 2004.

CUSTÓDIO, D. L.; VEIGA-JUNIOR, V. F. True and common balsams. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 6, p. 1372–1383, 2012.

D'AGUA NATURAL. **Creme de Massagem Cafeína 7 Ativos | 300g - D'água Natural**. Disponível em: <<https://daganatural.com.br/produto/creme-de-massagem-cafeina-7-ativos-300g/>>. Acesso em: 12 abr. 2022.

DALENOGARE, D. P. *et al.* Antinociceptive activity of *Copaifera officinalis* Jacq. L oil and kaurenoic acid in mice. **Inflammopharmacology**, v. 27, n. 4, p. 829–844, 1 ago. 2019.

DASGUPTA, N.; RANJAN, S.; GANDHI, M. Nanoemulsion ingredients and components. **Environmental Chemistry Letters**, v. 17, n. 2, p. 917–928, 17 dez. 2018.

DELGADO, A. V. *et al.* Measurement and interpretation of electrokinetic phenomena. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 309, n. 2, p. 194–224, 15 maio 2007.

DERJAGUIN, B.; LANDAU, L. Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and of the adhesion of strongly charged particles in solutions of electrolytes. **Progress in Surface Science**, v. 43, n. 1–4, p. 30–59, 1 maio 1993.

DIAS, D. DE O. *et al.* Optimization of headspace solid-phase microextraction for analysis of β -caryophyllene in a nanoemulsion dosage form prepared with copaiba (*Copaifera multijuga* Hayne) oil. **Analytica Chimica Acta**, v. 721, p. 79–84, 6 abr. 2012.

DICIONÁRIO PRIBERAM. **Nociceção - Dicionário Online Priberam de Português**. Disponível em: <<https://dicionario.priberam.org/nocicep%C3%A7%C3%A3o>>. Acesso em: 21 maio. 2022.

EARNSHAW, W. C. Nuclear changes in apoptosis. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 7, n. 3, p.337–343, 1 jan. 1995.

FEYNMAN, R. P. There's Plenty of Room at the Bottom. **Engineering and Science magazine**, v. XXIII, n. 5, p. 1–13, 1960.

FORGIARINI, A. *et al.* Formation of nano-emulsions by low-energy emulsification methods at constant temperature. **Langmuir**, v. 17, n. 7, p. 2076–2083, 3 abr. 2001.

FREY, M. VON. **Untersuchungen über die sinnesfunctionen der menschlichen haut. 1. abhandlung: Druckempfindung und schmerz (1896)**. Disponível em: <<https://archive.org/details/untersuchungen00frey>>. Acesso em: 4 jun. 2022.

GERTSCH, J. *et al.* Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 26, p. 9099–9104, 1 jul. 2008.

GOLSTEIN, P.; KROEMER, G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 32, n. 1, p. 37–43, jan. 2007.

GRUMEZESCU, A. **Emulsion**. 1^a ed. Cambridge: Academic Press, 2016.

GUDIKANDULA, K.; CHARYA MARINGANTI, S. Synthesis of silver nanoparticles by chemical and biological methods and their antimicrobial properties. **Journal of Experimntal Nanoscience**, v. 11, n. 9, p. 714–721, 2016.

HASAN, H. M.; LEANPOLCHAREANCHAI, J.; JINTAPATTANAKIT, A. Preparation of Virgin Coconut Oil Nanoemulsions by Phase Inversion Temperature Method. **Advanced Materials Research**, v. 1060, p. 99–102, dez. 2015.

ISAILOVIĆ, T. M. *et al.* Natural Surfactants-Based Micro/Nanoemulsion Systems for NSAIDs—Practical Formulation Approach, Physicochemical and Biopharmaceutical Characteristics/Performances. **Microsized and Nanosized Carriers for Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs: Formulation Challenges and Potential Benefits**, p. 179–217, 1 jan. 2017.

JACOBSON, M. D.; WEIL, M.; RAFF, M. C. Programmed Cell Death in Animal Development. **Cell**, v. 88, n. 3, p. 347–354, 7 fev. 1997.

JADHAV, C. *et al.* Investigation of effect of non-ionic surfactant on preparation of griseofulvin non-aqueous nanoemulsion. **Journal of Nanostructure in Chemistry**, v. 5, n. 1, p. 107–113, 18 dez. 2014.

JAFARI, S. M. **Nanoencapsulation technologies for the food and nutraceutical industries**. [s.l.] Elsevier, 2017.

JAIN, H.; CHELLA, N. Methods to improve the solubility of therapeutical natural products: a review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 19, p. 111–121, 2021.

JEEVANANDAM, J. *et al.* Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations. **Beilstein Journal of Nanotechnology**, v. 9, n. 1, p. 1074, 3 abr. 2018.

JINTAPATTANAKIT, A. Preparation of nanoemulsions by phase inversion temperature (PIT) method. **Pharmaceutical Sciences Asia**, v. 45, n. 1, p. 1–12, 2017.

JOANITTI, G. A.; AZEVEDO, R. B.; FREITAS, S. M. Apoptosis and lysosome membrane permeabilization induction on breast cancer cells by an anticarcinogenic Bowman–Birk protease inhibitor from *Vigna unguiculata* seeds. **Cancer Letters**, v. 293, n. 1, p. 73–81, 1 jul. 2010.

JUNG, J.; PERRUT, M. Particle design using supercritical fluids: Literature and patent survey. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 20, n. 3, p. 179–219, 1 ago. 2001.

KABAL'NOV, A. S.; PERTZOV, A. V.; SHCHUKIN, E. D. Ostwald ripening in two-component disperse phase systems: Application to emulsion stability. **Colloids and Surfaces**, v. 24, n. 1, p. 19–32, 1 maio 1987.

KAMALY, N. *et al.* Development and in vivo efficacy of targeted polymeric inflammation- resolving nanoparticles. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 16, p. 6506–6511, 16 abr. 2013.

KHAN, IBRAHIM; SAEED, K.; KHAN, IDREES. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 12, n. 7, p. 908–931, 1 nov. 2019a.

KHAN, S. *et al.* A review on nanotechnology: Properties, applications, and mechanistic insights of cellular uptake mechanisms. **Journal of Molecular Liquids**, v. 348, p. 1–15, 15 fev. 2022.

KHOT, L. R. *et al.* Applications of nanomaterials in agricultural production and crop protection: A review. **Crop Protection**, v. 35, p. 64–70, 1 maio 2012.

LAMMERS, T. *et al.* Personalized Nanomedicine. p. 4889–4895, 2012.

LEFEBVRE, G. *et al.* Spontaneous nano-emulsification: Process optimization and modeling for the prediction of the nanoemulsion's size and polydispersity. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 534, n. 1–2, p. 220–228, 20 dez. 2017.

LEOPOLDO, C. DE J.; VECHIO, G. H. DEL. NANOTECNOLOGIA E SUAS APLICAÇÕES: uma revisão quanto aos seus conceitos, potencial de uso, riscos e tendências. **Interface Tecnológica**, p. 144–154, 18 dez. 2020.

LG. **Smart TV LG 75” 4K NanoCell 75NANO80SPA WiFi Bluetooth | LG**. Disponível em: <<https://www.lg.com/br/tvs/lg-75nano80spa>>. Acesso em: 22 mar. 2022.

LI, Y. **Conheça os novatos da vacina de mRNA com o objetivo de derrotar a Covid-19 | CAS. (2020)** Disponível em: <<https://www.cas.org/pt-br/resource/blog/covid-mrna-vaccine>>. Acesso em: 1 mar. 2022.

LI, Y.-M.; WANG, Y.-Y.; CHENG, B.-N. In-vitro cytotoxicity of biosynthesized gold nanoparticles against thyroid cancer cell lines. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 16, n. 7, p. 1523–1528, 2017.

LOZANO, R. *et al.* Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. **The Lancet**, v. 380, n. 9859, p. 2095–2128, 15 dez. 2012.

LUCCA, L. G. *et al.* Nanoemulsification potentiates in vivo antiedematogenic effect of copaiba oil. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 13, n. 5, p. 583–590, 1 maio 2017.

LUCCA, L. G. *et al.* Anti-inflammatory Effect from a Hydrogel Containing Nanoemulsified Copaiba oil (*Copaifera multijuga* Hayne). **AAPS PharmSciTech**, v. 19, n. 2, p. 522–530, 2018.

MAJNO, G. **Cells, tissues, and disease : principles of general pathology** . [s.l.: s.n.].

MARTY, E.; MARTY, R. M. **Hematologia Laboratorial**. 1^a ed. São Paulo: Érica, 2015.

MCCLEMENTS, D. J. Edible nanoemulsions: fabrication, properties, and functional performance.

Soft Matter, v. 7, n. 6, p. 2297–2316, 7 mar. 2011a.

MCCLEMENTS. Edible nanoemulsions: Fabrication, properties, and functional performance. **Soft Matter**, v.7, n. 6, p. 2297–2316, 21 mar. 2011b.

MCCLEMENTS, D. J.; JAFARI, S. M. General Aspects of Nanoemulsions and Their Formulation. *In: Nanoemulsions: Formulation, Applications, and Characterization*. [s.l.] Academic Press, 2018. p. 3–20. 2018.

MCILROY, D. *et al.* An auxiliary mode of apoptotic DNA fragmentation provided by phagocytes. **Genes & Development**, v. 14, n. 5, p. 549–558, 1 mar. 2000.

MEDZHITOV, R. Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 771–776, 2010.

MEI, Z.; XU, J.; SUN, D. O/W nano-emulsions with tunable PIT induced by inorganic salts. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 375, n. 1–3, p. 102–108, 5 fev. 2011.

MELESON, K.; GRAVES, S.; MASON, T. G. Formation of Concentrated Nanoemulsions by Extreme Shear. **Soft Materials**, v. 2, n. 2–3, p. 109–123, 2007.

MESSARAH, M. *et al.* Hepatoprotective role and antioxidant capacity of selenium on arsenic-induced liver injury in rats. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 64, n. 3, p. 167–174, 1 mar. 2012.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MRINMOY DE; GHOSH, P. S.; ROTELLO, V. M. Applications of Nanoparticles in Biology. **Advanced Materials**, v. 20, n. 22, p. 4225–4241, 18 nov. 2008.

NANOX. **Vestuário & Artigos Têxteis** | Nanox. Disponível em: <<https://www.nanox.com.br/textil>>. Acesso em: 12 abr. 2022a.

____. **Embalagens Tecnológicas** | Nanox. Disponível em: <<https://www.nanox.com.br/embalagens-tecnologicas>>. Acesso em: 12 abr. 2022b.

____. **Utilidades & Utesílios Antimicrobianos** | Nanox. Disponível em: <<https://www.nanox.com.br/utilidades-domesticas-industriais>>. Acesso em: 12 abr. 2022c.

NAGATA, S. Apoptosis by death factor. **Cell**, v. 88, n. 3, p. 355–365, 7 fev. 1997.

NATHAN, C.; DING, A. Nonresolving Inflammation. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 871–882, 19 mar. 2010.

NIGRO, F. *et al.* Development, characterization and in vitro toxicity evaluation of nanoemulsion-loaded hydrogel based on copaiba oil and coenzyme Q10. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 586, p. 124132, 5 fev. 2020.

NORLING, L. V. *et al.* Humanized nano pro-resolving medicines mimic inflammation-resolution and enhance wound healing. **Journal of immunology**, v. 186, n. 10, p. 5547, 15 maio 2011.

OHSAKI, A. *et al.* The isolation and in vivo Potent Antitumor activity of clerodane diterpenoid from the oleoresin of the brazilian medicinal plant, *copaifera langsdorfi* desfon. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 4, n. 24, p. 2889–2892, 22 dez. 1994.

OHSHIMA, H.; MAKINO, K. **Colloid and Interface Science in Pharmaceutical Research and Development**. [s.l.] Elsevier B.V., 2014.

OLIVEIRA, C. M. *et al.* Hydrophobin-stabilized nanoemulsion produced by a low-energy emulsification process: A promising carrier for nutraceuticals. **Food Hydrocolloids**, v. 89, p. 749–757, 1 abr. 2019.

OMBREDANE, A. S. *et al.* Nanoemulsion-based systems as a promising approach for enhancing the antitumoral activity of pequi oil (*Caryocar brasiliense* Cambess.) in breast cancer cells. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 58, p. 101819, 1 ago. 2020.

OPREA, A. E. Nanotechnology Applications in Food: Flavor, Stability, Nutrition and Safety. **Indian Food Industry**, v. 24, n. 4, p. 19–31, 2017.

PASQUEL REÁTEGUI, J. L. *et al.* Production of copaiba (*Copaifera officinalis*) oleoresin particles by supercritical fluid extraction of emulsions. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 140, p. 364–371, 1 out. 2018.

PEREIRA, L.; SOUZA M. *et al.* Os efeitos do ultra-som na hyperalgesia e no edema de ratos artríticos. **Fisioterapia e Pesquisa**, v. 5, n. 2, p. 83–96, 1998.

PICHOT, R.; WATSON, R. L.; NORTON, I. T. Phospholipids at the interface: current trends and challenges. **International journal of molecular sciences**, v. 14, n. 6, p. 11767–11794, 2013.

QIAN, C.; MCCLEMENTS, D. J. Formation of nanoemulsions stabilized by model food-grade emulsifiers using high-pressure homogenization: Factors affecting particle size. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 5, p. 1000–1008, 1 jul. 2011.

RAO, J.; MCCLEMENTS, D. J. Stabilization of phase inversion temperature nanoemulsions by surfactant displacement. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 58, n. 11, p. 7059–7066, 9 jun. 2010.

RAO, J.; MCCLEMENTS, D. J. Food-grade microemulsions, nanoemulsions and emulsions: Fabrication from sucrosemonopalmitate & lemon oil. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 6, p. 1413–1423, 1 ago. 2011.

REÁTEGUI, J. L. P. *et al.* Production of Copaiba oleoresin particles from emulsions stabilized with modified starches. **Industrial Crops and Products**, v. 108, p. 128–139, 1 dez. 2017.

RIEHMANN, K. *et al.* Nanomedicine – challenge and perspectives. **Angewandte Chemie**

(International ed. in English), v. 48, n. 5, p. 897, 19 jan. 2009.

SABERI, A. H.; FANG, Y.; MCCLEMENTS, D. J. Thermal reversibility of vitamin E-enriched emulsion-based delivery systems produced using spontaneous emulsification. **Food Chemistry**, v. 185, p. 254–260, 15 out. 2015.

SACHETTI, C. G. *et al.* Avaliação da toxicidade aguda e potencial neurotóxico do óleo-resina de copaíba (*Copaifera reticulata* Ducke, Fabaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 4, p. 937–941, 2009.

SADEGHI, HEIBATOLLAH *et al.* Anti-inflammatory Activity of *Stachys Pilifera* Benth. **Iran Red Crescent Med J**, v. 16, n. 9, p. 1–8, 2014.

SAFAYA, M.; ROTLIWALA, Y. C. Nanoemulsions: A review on low energy formulation methods, characterization, applications and optimization technique. **Materials Today: Proceedings**, v. 27, p. 454–459, 1 jan. 2020.

SAITO, H.; SHINODA, K. The stability of W/O type emulsions as a function of temperature and of the hydrophilic chain length of the emulsifier. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 32, n. 4, p. 647–651, 1 abr. 1970.

SAKAMOTO, K. *et al.* **Cosmetic Science and Technology: Theoretical Principles and Applications - 1st Edition**. 1^a ed. Cambridge: Elsevier, 2017.

SALEM, M. A.; EZZAT, S. M. Nanoemulsions in Food Industry . *In: Some new aspects of colloidal systems in foods*. [s.l: s.n.]. p. 31–51.

SALLVE. **Antioxidante Hidratante: Vitamina C 10% + Ácido Hialurônico - Sallve** . Disponível em: <<https://www.sallve.com.br/collections/loja/products/antioxidante-hidratante>>. Acesso em: 22 mar. 2022.

SALVADOR-MORALES, C. *et al.* Spontaneous Formation of Heterogeneous Patches on Polymer–Lipid Core–Shell Particle Surfaces during Self-Assembly. **Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)**, v. 9, n. 4, p. 517, 25 fev. 2013.

SCHULZ, P. A. Há mais história lá embaixo - um convite para rever uma palestra. **Revista Brasileira de Ensino na Física** , v. 40, n. 4, p. 1–5, 2018.

SERHAN, C. N. *et al.* Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 21, n. 2, p. 332, fev. 2007.

SERHAN, C. N. Novel Lipid Mediators and Resolution Mechanisms in Acute Inflammation: To Resolve or Not? **The American Journal of Pathology**, v. 177, n. 4, p. 1591, 2010.

SHAFIQ-UN-NABI, S. *et al.* Formulation development and optimization using nanoemulsion technique: A technical note. **AAPS PharmSciTech**, v. 8, n. 2, p. E17, 6 abr. 2007.

SHINODA, K. and SAITO, H. (1969) The Stability of O/W Type Emulsions as Functions of Temperature and the HLB of Emulsifiers: The Emulsification by PIT-Method. **Journal of Colloid & Interface Science**, 30, 258-263.

SINGH, S. *et al.* Applications of Nanotechnology in Agricultural and their Role in Disease Management. **Research Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 5, n. 1, p. 1–5, 1 jan. 2015.

SOARES, D. C. *et al.* Trans- β -caryophyllene: An effective antileishmanial compound found in commercial copaiba Oil (*Copaifera* spp.). **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 1–14, 2013.

SOLANS, C. *et al.* Nano-emulsions. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 10, n. 3–4, p. 102–110, out. 2005a.

SOLÉ, I. *et al.* Nano-emulsions prepared by the phase inversion composition method: Preparation

variables and scale up. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 344, n. 2, p. 417–423, 15 abr. 2010.

STROH, C.; SCHULZE-OSTHOFF, K. Death by a thousand cuts: an ever increasing list of caspase substrates. **Cell death and differentiation**, v. 5, n. 12, p. 997–1000, 1998.

SUTRADHAR, K. B.; AMIN, L. Nanoemulsions: Increasing possibilities in drug delivery. **European Journal of Nanomedicine**, v. 5, n. 2, p. 97–110, 1 jul. 2013.

TANIGUCHI N.; ARAKAWA C.; KOBAYASHI T. On the basic concept of nano-technology; Proceedings of the International Conference on Production Engineering; Tokyo, Japan. 26–29 aug. 1974.

TAYLOR, P. Ostwald ripening in emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 75, n. 2, p. 107–163, 16 abr. 1998.

TEIXEIRA, F. B. *et al.* Copaiba oil-resin (*Copaifera reticulata* Ducke) modulates the inflammation in a model of injury to rats' tongues. **Complementary and Alternative Medicine**, v. 17, n. 313, p. 1–8, 2017.

TENCHOV, R. **Compreendendo a nanotecnologia em vacinas para covid-19 | CAS**. Disponível em: <<https://www.cas.org/pt-br/resource/blog/understanding-nanotechnology-covid-19-vaccines>>. Acesso em: 1 mar. 2022.

TIAN, Y.; CHEN, L.; ZHANG, W. Influence of Ionic Surfactants on the Properties of Nanoemulsions Emulsified by Nonionic Surfactants Span 80/Tween 80. **<https://dx.doi.org/10.1080/01932691.2015.1048806>**, v. 37, n. 10, p. 1511–1517, 2 out. 2016.

VALENTIM, D. S. S. *et al.* Effects of a nanoemulsion with *Copaifera officinalis* oleoresin against monogenean parasites of *Colossoma macropomum*: A Neotropical Serrasalmidae. **Journal of Fish Diseases**, v. 41, n. 7, p. 1041–1048, 1 jul. 2018.

VAUX, D. L.; KORSMEYER, S. J. Cell Death in Development. **Cell**, v. 96, n. 2, p. 245–254, 22 jan. 1999.

VEKARIYA, K. K.; KAUR, J.; TIKOO, K. ER α signaling imparts chemotherapeutic selectivity to selenium nanoparticles in breast cancer. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 8, n. 7, p. 1125–1132, 1 out. 2012.

VERWEY, E. J. W. Electrical double layer and stability of emulsions. **Transactions of the Faraday Society**, v. 35, p. 192–203, 1 jan. 1940.

VERWEY, E. J. W.; OVERBEEK, J. T. G. Theory of the Stability of Lyophobic Colloids. **Nature** **1948** **162:4113**, v. 162, n. 4113, p. 315–316, ago. 1948.

WATKINS, K. Emerging Infectious Diseases: a Review. **Current Emergency and Hospital Medicine Reports**, v. 6, n. 3, p. 93, set. 2018.

WEISS, C. *et al.* Toward Nanotechnology-Enabled Approaches against the COVID-19 Pandemic. **ACS Nano**, v. 14, p. 6383–6406, 2020.

WHO, W. H. O. **The top 10 causes of death**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>>. Acesso em: 1 mar. 2022.

WILLIAMSON, M. A.; SNYDER, L. M. **Wallach | Interpretação de Exames Laboratoriais**. 10^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.

WILSON, R. J. *et al.* Nanoemulsions for drug delivery. **Particuology**, v. 64, p. 85–97, 1 maio 2022.

WOOSTER, T. J.; AUGUSTIN, M. A. The emulsion flocculation stability of protein–carbohydrate diblock copolymers. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 313, n. 2, p. 665–675, 15 set.

2007.

WOOSTER, T. J.; GOLDING, M.; SANGUANSRI, P. Impact of oil type on nanoemulsion formation and ostwald ripening stability. **Langmuir**, v. 24, n. 22, p. 12758–12765, 18 nov. 2008.

WYLLIE, A. H. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. **Nature**, v. 284, n. 5756, p. 555–556, 1980.

XIAO, Z. *et al.* DNA Self-Assembly of Targeted Near-Infrared-Responsive Gold Nanoparticles for Cancer Thermo-Chemotherapy. **Angewandte Chemie (International Ed. in English)**, v. 51, n. 47, p. 11857, 19 nov. 2012.

XU, X. *et al.* A self-illuminating nanoparticle for inflammation imaging and cancer therapy. **Science Advances**, v. 5, n. 1, p. 1–16, 2019.

YANGA, J.; CAO, W.; RUI, Y. Interactions between nanoparticles and plants: phytotoxicity and defense mechanisms. <http://mc.manuscriptcentral.com/tjpi>, v. 12, n. 1, p. 158–169, 2017.

ZARE, B. *et al.* Isolation and characterization of a fungus for extracellular synthesis of small selenium nanoparticles. **Nanomedicine Journal**, v. 1, n. 1, p. 13–19, 1 out. 2013.

ZHANG, W.; KOHANE, D. S. Keeping Nanomedicine on Target. **Nano letters**, v. 21, n. 1, p. 5, 13 jan. 2021.

ZHU, S. *et al.* Research trend of nanoscience and nanotechnology – A bibliometric analysis of Nano Today. **Nano Today**, v. 39, p. 1–10, 1 ago. 2021.

CAS Number: 90000-12-8 INCI: *Copaifera officinalis* Resin Oil

Itens Controlados	Especificações
Aparência	Líquido Límpido
Cor	Incolor a Amarelo Palha
Impurezas	Isento
Odor	Característico
Densidade (20°C)	0,880 – 0,915
Índice de Refração (20°C)	1,496 – 1,506
Rotação Ótica	[-33° ; -7°]
Principal componente (valor aproximado)	Beta-cariofileno = 51%
Obtenção	Destilação a vapor do bálsamo de copaíba
Origem	Brasil
Obs.: não contem OGM nem foi utilizado para teste em animais.	

Recomendações Especiais	
Manuseio	Perigos mínimos, máscara e luvas recomendável. Não ingerir. Evitar contato com a pele, olhos e mucosa. Se isso ocorrer, lavar imediatamente com água límpida em abundância. Em caso de derramamento, absorver o material derramado com material absorvente (areia, terra).
Incêndio	Caso haja fogo, utilizar extintor de pó químico seco e água em forma de neblina, não utilizando jatos de água para não espalhar o produto. Flash Point = 100°C.
Explosividade	Nenhum perigo em condições normais.
Uso	Este produto destina-se ao uso profissional / industrial e como é elaborado a partir de substâncias naturais pode apresentar pequenas variações de cor e cromatografia sem causar qualquer problema na performance do produto.
Armazenamento	Armazenar em local seco, longe de umidade e do calor, protegido da luz, em recipiente original bem vedado. Não reutilizar a embalagem vazia.
Transporte	Produto não enquadrado na portaria 204/97 em vigor sobre transporte de produtos perigosos.

As informações contidas nesta publicação representam o melhor de nosso conhecimento. Entretanto, nada aqui mencionado deve ser entendido como garantia de uso. Os consumidores devem efetuar seus próprios ensaios para determinar a viabilidade da aplicação.

Engenheira Química Responsável: Alice Lasthaus CRQ: IV 04330754

Anexo 2

Certificado de autorização para o trabalho com ratos Wistar da Comissão de Ética no Uso Animal da Universidade de Brasília.

 Universidade de Brasília Comissão de Ética no Uso Animal	
Brasília, 28 de junho de 2021.	
CERTIFICADO	
<p>Certificamos que o projeto intitulado "AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTINOCICEPTIVA DE NANOEMULSÕES A BASE DE ÓLEOS DERIVADOS DA BIODIVERSIDADE BRASILEIRA <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i>", SEI n.º 23106.058193/2021-48, sob responsabilidade da Professora Graziella Anselmo Joanitti, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, e foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília, na 155ª reunião ordinária, realizada em 8/6/2021. Este projeto foi aprovado para utilização de: <i>Rattus norvegicus</i>, sendo 108 machos, com procedência do Biotério do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade de Brasília ou do biotério da Universidade Federal de Goiânia. O presente certificado é válido pelo período de 9/7/2021 a 20/12/2023.</p>	
	Dr. José Luiz Jivago de Paula Rôlo Coordenador da CEUA – UnB
	
<small>*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.</small>	

Anexo 3

Histórico Acadêmico

Cursos

- 1) 2022 – Curso teórico-prático “Fitoquímica em um dia” – 10 horas – Universidade de Brasília, Brasil.
- 2) 2019 - Boas Práticas em Cultura de Células – 40 horas – Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ), Brasil.

Publicações de artigos científicos

- 1) 2022 - Tong-Xin Zong; Ariane Pandolfo Silveira; José Athayde Vasconcelos Moraes; **Marina Carvalho Sampaio**; Luis Alexandre Muehlmann; Juan Zhang; JIANG, C.; LIU, S. . Recent Advances in Antimicrobial Nano-Drug Delivery Systems. *Nanomaterials*, v. 12, p. 1-26, 2022.
- 2) 2018 - Cesar Romero Soares Sousa; Adriana Lima de Holanda; Anna Beatriz Alvez Nunes; Graziela Silveira Araújo Alves; **Marina Carvalho Sampaio**. NANOTECNOLOGIA E NANOCIÊNCIA: CONSIDERAÇÕES HISTÓRICA E INTERDISCIPLINAR. *HEGEMONIA (BRASÍLIA)*, v. 25, p. 150-178, 2018.

Artigo científico aceito para publicação

- 1) 2022 – Alicia S. Ombredane; Lídia R. A. Silva; Victor H. S. Araujo; Patrícia L. Costa; Lucas C. Silva; **Marina C. Sampaio**; Milena C. F. Lima; Valdir F. Veiga Junior; Ivo J.C. Vieira; Ricardo B. Azevedo; Graziella A. Joanitti. Pequi oil (*Caryocar brasiliense* Cambess.) nanoemulsion alters cell proliferation and damages key organelles in triple-negative breast cancer cells *in vitro*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 153, p. 1-12, 2022.

Capítulo de livro aceito para publicação

- 1) - **Marina Carvalho Sampaio**, Vitória Regina Pereira da Silva, Alicia Simalie Ombredane, Natália Ornelas Martins, Andreia Camargo Pinheiro, Marcella Lemos Brettas Carneiro e Graziella Anselmo Joanitti. Nanotecnologia aplicada a fitoterápicos: perspectivas para o SUS. In: Cicilia Raquel Maia Leite; Luciana Alves Fernandes; Mário Fabrício Fleury Rosa; Mayla dos Santos Silva; Pedro Canísio Binsfeld, Sebastião Junio Menezes Campos; Suélia de Siqueira R. Fleury Rosa. (Org.). Ecosistema de pesquisa, desenvolvimento e inovação tecnológica em saúde. 1ed. Brasília: Secretaria Municipal de Saúde de Goiânia e Universidade de Brasília, v.1, p.229-262.