

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
DE RIBEIRÃO PRETO**

**Desenvolvimento de microcápsulas contendo  
a fração volátil de copaíba por spray-drying:  
estudo de estabilidade e avaliação farmacológica**

**MÔNICA FREIMAN DE SOUZA RAMOS**

0036 1300X 10 kV

10µ

**Ribeirão Preto - SP  
2006**

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

**MÔNICA FREIMAN DE SOUZA RAMOS**

**Desenvolvimento de microcápsulas contendo a fração volátil de copaíba por  
*spray-drying*: estudo de estabilidade e avaliação farmacológica.**

**Ribeirão Preto**

**2006**

**MÔNICA FREIMAN DE SOUZA RAMOS**

**Desenvolvimento de microcápsulas contendo a fração volátil de copaíba por  
*spray-drying*: estudo de estabilidade e avaliação farmacológica.**

Tese apresentada a Faculdade de Ciências  
Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade  
de São Paulo para obtenção do título de Doutor  
em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Fármacos e  
Medicamentos

Orientador: Prof. Dr. Osvaldo de Freitas

**Ribeirão Preto  
2006**

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ramos, Mônica Freiman de Souza

Desenvolvimento de microcápsulas contendo a fração volátil de copaíba por *spray-drying*: estudo de estabilidade e avaliação farmacológica. Ribeirão Preto, 2006.

132 p. : il. ; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto /USP – Área de concentração: Fármacos e Medicamentos.

Orientador: Freitas, Osvaldo de

1. Oleorresina de copaíba. 2. Microencapsulação. 3. Atividade inflamatória.

*Sim! Eu quero encontrar o Santo  
Graal, mas agora sei que este  
encontro é parte de um trabalho  
constante e diário.....  
..... o mais importante é seguir  
passo a passo construindo uma  
obra,  
minha vida .....*

*Carlos Ribeiro*

*“A realidade de hoje foi o sonho de ontem; o  
sonho de hoje será a realidade de amanhã; em  
todas as épocas zombou-se dos sonhadores”*

*Záلكind Piatigórsky*

*Dedico esta Tese à meus pais  
(Alice e Francisco) e minha tia  
(Ninha) que me apoiaram e  
sempre me ensinam que não é só  
fazer é preciso acreditar.....  
amo vocês.*

*À meus irmãos Marcelo e Paulo,  
meus exemplos de determinação e  
luta...*

## **AGRADECIMENTOS**

*Seria difícil encontrar palavras que pudessem expressar o carinho, a gratidão e a amizade que encontrei em todos os momentos desta jornada, mas espero que elas possam representar um pouco do muito que tenho a agradecer à tantas pessoas maravilhosas.*

*Ao Prof. Osvaldo, pela orientação, apoio e dedicação, mas acima de tudo pela amizade e pelo exemplo de profissional e de pessoa humana.....e também pelo aprendizado de que a ciência está além das bancadas.....*

*Ao Ricardo....meu melhor Amigo, não encontro palavras!.....foram tantas conversas.....quanto cresci....quanto aprendi....seu apoio incondicional muitas vezes foi tudo.....vou sentir falta.....*

*A Nath minha amiga sempre presente, você foi incrível.....tantas vezes as coisas ficaram mais fáceis depois de longas conversas.*

*A todos meus companheiros de Laboratório Camila Redigueri, Priscila, Renata, Alexandre, Flávia, Katiana, Marcos Brushii Rosiane, Vânia (minha aluninha querida), e Camilinha (sua sinceridade é tudo .....) pela convivência, pelo carinho e pelas muitas risadas...algumas vezes elas foram tudo.*

*A Alessandra e Maria Paula, vocês duas são maravilhosas, minhas amigas, sempre presentes, nossa....não tenho o que dizer...vou sentir falta de vocês...*

*Ao Dr. Antonio Carlos Siani pela colaboração em grande parte deste trabalho.*

*Ao Prof. Luiz Alexandre, Prof. Gino e Prof. Alberto pelas conversas e convívio no laboratório me mostraram que a ciência esta além das bancadas.*

*A Mirian minha grande amiga....não vou encontrar palavras para agradecer o seu apoio, a ajuda e a sua amizade.....*

*Ao Marcos Jun....amigo querido..... a quem eu devo muito desta conquista.... pelo enorme apoio, pela amizade e pelo carinho....foi muito bom ter trabalho com você.....*

*As irmãs e oblatas do Colégio Vita et Pax, seu carinho, sua atenção e dedicação fizeram com que minha moradia em Ribeirão fosse inesquecível....vou sentir saudades.....Mary muito obrigada você é especial...*

*Ao Zé Maria, Paulo, Zé Orestes, Eduardo, Franklin, Áurea pela ajuda imprescindível, sem ela muitas vezes seria difícil.....foi muito bom conviver com vocês...*

*As funcionárias da secretária de Pós-Graduação, Ana, Rosana pela ajuda e atenção.*

*A Ana Silvia e João.....pelo apoio que me deram em Campinas , mas especialmente pelo carinho e pela amizade que conquistei.....Campinas sempre me lembra vocês...*

*Ao grupo de Laboratório de Farmacologia Aplicada de Farmanguinhos, Fiocruz, pela ajuda indescritível em toda a parte farmacológica.....obrigado gente!....vocês foram demais.....Em especial a Socorro e Carlos.....vocês foram incríveis.....*

*A Elaine.....nossa o que vou dizer a você!!!!.....obrigada amiga.....sua ajuda foi indescritível...*

*Ao André...hoje você está longe...mas.....muito obrigada por tudo.... carinho e pela amizade, brincadeiras....*

*Ao Marcelo e o Vagner.... do antigo Laboratório PN4....valeu gente!*

*Aos amigos que fiz e conheci aqui, Eduardo, Barbosa, Ana Flávia, Daoud, Viriato, Orlando.... como foi bom estar com vocês.*

*Ao pessoal do Laboratório de Controle de Qualidade da Faculdade de Engenharia de Alimentos de Campinas (Renata, Izabela, Karina) pelo apoio em muitos experimentos, pela força quando ficava aí...*

*A todos aqueles que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização deste trabalho.*

*A Deus, que é fonte infinita em minha vida.*



## RESUMO

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

A oleorresina de copaíba é amplamente utilizada em diferentes regiões do país, especialmente na região amazônica. Sua atividade cicatrizante e antiinflamatória são as mais difundidas na medicina popular. Entretanto, são raras na literatura científica as descrições destas atividades, bem como a indicação da composição responsável pela atividade. Os objetivos deste estudo foram a otimização da obtenção da fração volátil da oleorresina de copaíba, por extração com arraste à vapor, sua microencapsulação em goma arábica por atomização e secagem em *spray-dryer*, avaliação química, morfológica e farmacológica (atividade antiinflamatória *in vivo*). A fração volátil representou 14,5% da oleorresina, sendo o  $\beta$ -cariofileno (70%) e o  $\alpha$ -humuleno (8,7%) seus constituintes majoritários. A eficiência do processo de microencapsulação da fração volátil em goma arábica foi em média de 95%. Os estudos de estabilidade da fração volátil livre e microcapsulada, nas temperaturas de 25°C e 40°C em ambiente de umidade relativa de 50%, mostraram que o  $\beta$ -cariofileno sofreu oxidação, gerando principalmente óxido de cariofileno, e em menor extensão outros compostos oxigenados. A microencapsulação da fração volátil minimizou, porém não impediu a oxidação e a perda de massa. Os ensaios da atividade farmacológica *in vivo* mostraram que a fração volátil inibiu expressivamente o processo inflamatório agudo, induzido por carragenina ou zimosan, com ED<sub>50</sub> de 32mg/Kg. A fração microencapsulada inibiu a resposta inflamatória na mesma magnitude que a fração volátil livre, mostrando que o processo de microencapsulação não alterou a atividade, possibilitando seu uso como forma farmacêutica ou intermediária na preparação de outras. O  $\beta$ -cariofileno inibiu a resposta inflamatória na dose de 32 mg/Kg, na mesma magnitude que a fração volátil, o que nos permite atribuir a este, a atividade antiinflamatória observada.

Palavras-chave: fração volátil, oleorresina de copaíba, microencapsulação,  $\beta$ -cariofileno, antiinflamatório.

## SUMMARY

Ramos, M. F. S. **Development of microcapsules containing the volatile fraction of copaiba by spray-drying: study of stability and pharmacological evaluation.** 2006. 132f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

The oilresin of copaiba is extensively used in different regions of Brazil, especially in the Amazon region. Its healing and anti-inflammatory activities are widely known in folk medicine. However, descriptions of these activities and the indication of the compound responsible for these activities are rare in the literature. The objective of the present study was to optimize the derivation of the volatile fraction of the oilresin of copaiba by vapor extraction, its microencapsulation in Arabic gum by atomization and drying with a spray-dryer, and chemical, morphological and pharmacological evaluation (anti-inflammatory activity *in vivo*). The volatile fraction represented 4.5% of the oilresin, with  $\beta$ -caryophyllene (70%) and  $\alpha$ -humulene (8.7%) being its major constituents. The efficiency of the microencapsulation process of the volatile fraction in Arabic gum was on average 95%. The study of stability of the free and microencapsulated volatile fraction at the temperature of 25°C and 40°C in the presence of 50% humidity showed that  $\beta$ -caryophyllene underwent oxidation, mainly generating caryophyllene oxide and, to a lesser extent, other oxygenated compounds. Microencapsulation of the volatile fraction minimized but did not prevent oxidation and loss of mass. The *in vivo* assays of pharmacological activity showed that the volatile fraction significantly inhibited the acute inflammatory process induced by carrageenan or zymosan, with an ED50 of 32 mg/kg. The microencapsulated fraction inhibited the inflammatory response to the same extent as did the free volatile fraction, showing that the microencapsulation process did not alter the activity, a fact that permits its use as a pharmaceutical or intermediate form in the preparation of other formulations.  $\beta$ -Caryophyllene at the dose of 32 mg/kg inhibited the inflammatory response to the same extent as did the volatile fraction, a fact that permits us to attribute to this compound the anti-inflammatory activity observed.

Key-words: volatile fraction, copaiba oilresin, microencapsulation,  $\beta$ -caryophyllene, anti-inflammatory.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química do $\beta$ -cariofileno.....	7
Figura 2. Estruturas obtidas no processo de microencapsulação.....	14
Figura 3. <i>Spray Drying</i> Niro Atomizer (FEA, Unicamp-SP).....	27
Figura 4. Perfil cromatográfico da oleorresina de copaíba.....	39
Figura 5. Perfil cromatográfico da fração volátil obtida por arraste a vapor.	42
Figura 6. Representação das estruturas químicas dos sesquiterpênos da fração volátil.....	43
Figura 7. Curva analítica do $\beta$ -cariofileno e do óxido de cariofileno obtidas por CGAR-DIC.....	44
Figura 8. Teor de óleo total nas amostras de microcápsulas com a fração volátil (MFV) nas concentrações 10%, 20 e 30%.....	46
Figura 9. Curva de distribuição do tamanho de partícula das microcápsulas.....	47
Figura 10. Fotomicrografia panorâmica obtida por microscopia eletrônica de varredura (MEV) de microcápsulas de goma arábica-fração volátil de copaíba 10%.....	48
Figura 11. Fotomicrografia obtida por MEV de cortes de microcápsulas de goma arábica-fração volátil de copaíba .....	50
Figura 12. Imagens de corte obtidos por microscopia confocal a laser de microcápsulas de goma arábica contendo a fração de volátil da oleorresina de copaíba.....	52
Figura 13. Curva analítica do $\beta$ -cariofileno e do óxido de cariofileno para quantificação das microcápsulas .....	53
Figura 14. Efeito do processo de oxidação nas microcápsulas contendo a fração volátil (60 dias) .....	55
Figura 15. Representação gráfica do percentual de fração volátil retida nas microcápsulas e do o percentual residual de massa de fração volátil livre, após dias nas duas temperaturas e m ambiente de umidade relativa de 50%.....	58
Figura 16. Representação das estruturas químicas dos principais constituintes oxigenados da fração volátil após 60 dias a 50% de UR e temperaturas de 25 °C e 40 °C.....	61

Figura 17. Representação gráfica da cinética de redução do $\alpha$ -cariofileno nas microcápsulas de fração volátil nas temperaturas de 25 °C e 40°C.....	63
Figura 18. Representação gráfica da cinética de formação do óxido de cariofileno nas microcápsulas de fração volátil nas temperaturas de 25 °C (A) e 40 °C (B).....	64
Figura 19. Curva analítica do $\beta$ -cariofileno para quantificação da fração volátil.....	65
Figura 20. Curva analítica do óxido de cariofileno para quantificação da fração volátil.....	66
Figura 21. Efeito do processo de oxidação do $\beta$ -cariofileno a óxido de cariofileno , na fração volátil na temperatura de 25 °C e 40 °C a 50% UR.....	67
Figura 22. Representação gráfica da cinética de formação do óxido de cariofileno na fração volátil nas temperaturas de 25 °C e 40 °C...	71
Figura 23. Efeito da fração volátil microencapsulada (MFV) e fração volátil não encapsulada (FV) sobre o recrutamento de leucócitos induzido por zimosan.....	78
Figura 24. Efeito da microcápsula contendo a fração volátil (MFV) e fração volátil não encapsulada (FV) sobre a pleurisia induzida por carragenina .....	79
Figura 25. Efeito da microcápsula contendo a fração volátil (MFV) e fração volátil não encapsulada (FV) sobre o edema de pata induzido por zimosan .....	80
Figura 26. Efeito da microcápsula contendo a fração volátil (MFV) e fração volátil não encapsulada (FV) sobre o edema de pata induzido por carragenina .....	82
Figura 27. Efeito da $\beta$ -cariofileno (70 mg/Kg)na pleurisia induzida por zimosan em camundongos.....	83
Figura 28. Efeito da $\beta$ -cariofileno (70mg/Kg) na pleurisia induzida por carragenina em camundongos.....	84
Figura 29. Avaliação da curva dose-resposta da fração volátil (FV) na pleurisia induzida por zimosan .....	86
Figura 30. Avaliação da curva dose-resposta da oleorresina (OB) na pleurisia induzida por zimosan.....	88

Figura 31. Representação gráfica do número de leucócitos totais pelo log da concentração de diferentes doses da fração volátil.	89
Figura 32. Efeito da microcápsula contendo a fração volátil, da fração volátil não encapsulada e do $\alpha$ -cariofileno na dose de 32mg/Kg sobre o recrutamento de leucócitos induzido por zimosan.....	92
Figura 33. Efeito da microcápsula contendo a fração volátil e da fração volátil não encapsulada sobre o recrutamento de leucócitos induzido por carragenina (4h) na dose de 32mg/Kg .....	93
Figura 34. Efeito da microcápsula contendo a fração volátil e da fração volátil não encapsulada (FV) sobre o recrutamento de leucócitos induzido por carragenina (48h) na dose de 32mg/Kg .....	94

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Compostos caracterizados na oleorresina e na fração volátil de copaíba por espectrometria de massas.....	41
Tabela 2 - Percentual de contribuição relativo dos constituintes identificados na fração volátil da microencapsulada ao final do estudo de estabilidade (60 dias).....	59
Tabela 3 - Percentual de contribuição relativo dos constituintes identificados na fração volátil de copaíba ao durante o estudo de estabilidade por 60 dias.....	69
Tabela 4 - Avaliação do efeito do $\alpha$ -cariofileno e da fração volátil sobre a viabilidade celular e sobre a produção de óxido nítrico <i>in vitro</i> .....	95

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Oleorresina de Copaíba .....</b>	<b>4</b>
<b>1.2. Microencapsulação .....</b>	<b>13</b>
<b>1.3. Goma Arábica .....</b>	<b>17</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>21</b>
<b>2.1. Objetivo geral .....</b>	<b>21</b>
<b>2.1.2. Objetivos específicos.....</b>	<b>21</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>22</b>
<b>3.1. Identificação química dos componentes da oleorresina de copaíba .....</b>	<b>23</b>
<b>3.2. Obtenção da fração volátil da oleorresina de copaíba.....</b>	<b>24</b>
<b>3.3. Determinação da densidade da fração volátil de copaíba .....</b>	<b>24</b>
<b>3.4. Determinação do índice de refração da fração volátil de copaíba.....</b>	<b>24</b>
<b>3.5. Identificação química e padronização quantitativa da fração volátil de copaíba .....</b>	<b>25</b>
<b>3.6. Preparação das microcápsulas por <i>spray-dryer</i> .....</b>	<b>26</b>
<b>3.7. Determinação da umidade das microcápsulas.....</b>	<b>27</b>
<b>3.8. Eficiência de encapsulação.....</b>	<b>28</b>
<b>3.8.1. Determinação do óleo total das microcápsulas .....</b>	<b>28</b>
<b>3.8.2. Determinação do óleo de superfície .....</b>	<b>28</b>
<b>3.9. Determinação do tamanho de partícula .....</b>	<b>29</b>
<b>3.10. Morfologia das microcápsulas .....</b>	<b>30</b>
<b>3.10.1. Microscopia eletrônica por varredura (MEV) .....</b>	<b>30</b>
<b>3.10.2. Microscopia laser confocal .....</b>	<b>30</b>
<b>3.11. Estudo de estabilidade .....</b>	<b>31</b>
<b>3.11.1. Fração volátil .....</b>	<b>31</b>
<b>3.11.2. Microcápsulas .....</b>	<b>32</b>
<b>3.12. Avaliação Farmacológica .....</b>	<b>33</b>
<b>3.12.1. Animais .....</b>	<b>33</b>
<b>3.12.2. Tratamento com as Amostras .....</b>	<b>34</b>
<b>3.12.3 Avaliação da Atividade Antiinflamatória .....</b>	<b>34</b>
<b>3.12.3.1. Indução da pleurisia.....</b>	<b>34</b>
<b>3.12.3. 2. Quantificação do extravasamento protéico .....</b>	<b>35</b>
<b>3.12.3.3. Contagem de Leucócitos.....</b>	<b>35</b>

3.12.3.4. Edema de pata .....	36
3.12.5 Produção de óxido nítrico.....	36
3.12.5.1. Avaliação da citotoxicidade .....	36
3.12.5.2. Avaliação da produção de óxido nítrico .....	37
3.12.6. Análise Estatística.....	37
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	39
4.1. Identificação química dos componentes da oleorresina de copaíba .....	39
4.2. Obtenção da fração volátil de copaíba .....	40
4.3. Identificação química dos componentes da fração volátil de copaíba.....	40
4.4. Análise da densidade e do índice de refração da fração volátil.....	42
4.5. Padronização quantitativa da fração volátil da oleorresina de copaíba...	44
4.6. Eficiência do processo de microencapsulação.....	45
4.6.1. Determinação do conteúdo de óleo na superfície e de óleo total das microcápsulas .....	45
4.7. Determinação do tamanho de partícula .....	46
4.8. Morfologia das microcápsulas .....	48
4.8. Estudo de estabilidade .....	53
4.8.1. Microcápsulas .....	53
4.8.2. Fração volátil .....	65
4.10. Atividade Farmacológica .....	74
5. CONCLUSÃO .....	103
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	106



# ***Introdução***

---

## **1. INTRODUÇÃO**

A utilização de plantas medicinais para fins terapêuticos é descrita desde os primórdios da civilização. Esta arte milenar ultrapassou todas as barreiras e obstáculos durante o desenvolvimento sócio cultural e chegou até os dias atuais, sendo utilizada pela população como recurso na terapêutica (DI STASI, 1996). O conhecimento popular sobre o uso e a eficácia das plantas medicinais contribuíram, de forma decisiva, para a divulgação de seus efeitos medicinais, tornando-os prescritos com freqüência, apesar de não terem seus constituintes químicos conhecidos (MACIEL, 2002). Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), estima-se que cerca de 80% da população mundial, especialmente nos países subdesenvolvidos ou considerados em desenvolvimento, utilizam este tipo de medicamento devido à falta de acesso aos medicamentos sintéticos (CALIXTO, 2000).

A Fitoterapia constitui uma terapia medicinal que vem crescendo notadamente nos últimos anos, mas vale ressaltar que este não é um acontecimento dos tempos atuais, pois foi a partir do conhecimento e utilização de espécies vegetais na cura de doenças que os químicos medicinais isolaram as primeiras moléculas puras para uso na terapêutica, como a morfina, que foi isolada em 1803 e é utilizada até os dias de hoje (YUNES; PEDROSA; CHECHINEL-FILHO, 2001). Desta época até os dias atuais, a indústria farmacêutica desenvolveu uma enorme variedade de fármacos sintéticos, empregando as mais diferentes técnicas entre elas, a biologia molecular e as técnicas genéticas, a química combinatória e a química computacional.

Contudo, a química computacional não conseguiu, pelo menos até o presente, o seu objetivo de ser a fonte primária e única de diversidade de estruturas

moleculares. Como a diversidade estrutural é fundamental na pesquisa para atingir diferentes alvos biológicos, os cientistas voltaram aos estudos de produtos naturais, considerando que durante milhões de anos da evolução biológica a seleção natural realizou um processo de química combinatória realmente inigualável (CHECHINEL FILHO; YUNES, 2001).

Um dos maiores problemas relacionados aos estudos de Fitoterapia frente à comunidade científica, é que esta utiliza extratos vegetais que são misturas complexas de compostos. Tal fato encontra, no paradigma da química medicinal moderna ocidental seu principal entrave. A estratégia ocidental descreve como passo inicial na busca de novos fármacos a determinação de alvo biológico, acreditando que exista um simples e único ativo com efeitos farmacológicos definidos, e aconselha o uso de somente um composto para evitar possíveis interações medicamentosas (CHECHINEL FILHO; YUNES, 1998). Em contraste, o paradigma oriental estabelece, em sua etapa inicial, a avaliação farmacológica dos extratos indicados pela medicina popular, e subseqüentemente as diferentes etapas até a obtenção de um fitoterápico ou mesmo de um fitofármaco.

Isto não quer dizer necessariamente que a estratégia ocidental adotada não tenha êxito, haja vista o quanto avançamos, na cura das mais diferentes doenças no decorrer do último século. No entanto, não podemos deixar de observar que muitos estudos científicos suportam e confirmam a eficácia e segurança do uso terapêutico de determinadas plantas medicinais (CHECHINEL FILHO; YUNES, 1998; YAMADA, 1998; GILBERT; ALVES, 2003), como os resultados encontrados por Tyler (1997) um emérito farmacologista americano, que em seus estudos empregando *Hypericum sp* no tratamento de depressão leve e moderada, afirmou que esta espécie apresenta compostos químicos que atuam em conjunto para aliviar

as depressões leves. A principal vantagem desta ação combinada é a redução de efeitos colaterais e secundários, uma vez que a resposta não é devida a uma simples e forte ação. Talvez isto explique porque na Alemanha se prescreve 200 vezes mais o *Hypericum* do que o fármaco fluoxetina no tratamento de depressões leves.

O estudo de produtos naturais, portanto, mostra aspectos importantes e que contribuem sobremaneira para o desenvolvimento da química medicinal e de fitoterápicos, quais sejam:

- uma diversidade de estruturas moleculares,
- sua possibilidade de uso como misturas, extratos brutos de plantas medicinais, constituindo os fitoterápicos, ou como compostos puros (fitofármacos), ou ainda como protótipos de novos fármacos,
- e um terceiro aspecto, não menos importante que é permitir identificar alvos biológicos, como por exemplo, o estudo do taxol, que mostrou que a estabilidade dos microtúbulos era uma boa aproximação para atacar o problema da citotoxicidade (CHECHINEL FILHO; YUNES, 2001).

O mercado farmacêutico mundial de fitoterápicos movimenta hoje cerca de 50 bilhões de dólares. Contudo no Brasil esse mercado começou a se expandir recentemente e movimenta em torno de 500 milhões de dólares por ano. Apesar destas cifras, e considerando que somos detentores de uma das maiores biodiversidades do planeta, pouco ainda é realmente desenvolvido no país nesta área (MARQUES, 2003). É fato que, para o desenvolvimento de um produto farmacêutico fitoterápico, muitas são as etapas a serem realizadas, e o Brasil vem

no decorrer dos anos buscando seu domínio e aprofundamento no desenvolvimento tecnológico nesta área, contudo ainda há um longo caminho a ser percorrido para atingirmos tal objetivo.

### 1.1. Oleorresina de Copaíba

Entre os produtos naturais utilizados no país, o óleo de copaíba tem uma grande representação social e econômica, especialmente na região amazônica, onde é nativo e largamente empregado.

É denominado óleo de copaíba, a oleorresina<sup>1</sup> obtida por extração do tronco de espécies do gênero *Copaifera* (família Leguminosae, sub-família Caesalpinoideae) (LEWIS, 2003). Este gênero possui 72 espécies descritas, sendo 16 delas encontradas somente no Brasil (INDEX KEWENSIS, 1996).

A origem do nome copaíba parece vir do tupi *cupa-yba*, “árvore de depósito”. As copaíbas são árvores nativas da região tropical da América Latina e da África Ocidental. No Brasil são encontradas facilmente na região Amazônica e Centro-Oeste, sendo as espécies mais abundantes: *Copaifera officinalis* L., *C. guianensis* Desf., *C. reticulata* Ducke, *C. multijuga* Hayne, *C. confertiflora* Bth, *C. langsdorffii* Desf., *C. coriacea* Mart., e *C. cearensis* Huber ex Ducke (VEIGA Jr.;PINTO, 2002).

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

---

<sup>1</sup> seiva vegetal formada por resina dissolvida em azeite vegetal (Michaelis, Moderno Dicionário Língua Portuguesa).

Para a retirada do óleo destas árvores já foram utilizados diferentes métodos, entre eles, alguns que levavam a morte imediata do vegetal (VEIGA Jr., 2002).

Atualmente, a extração do óleo pela incisão de trado, a cerca de 1 m de altura da base da árvore, é a prática mais empregada. Após a coleta, o orifício é vedado com argila para impedir a infestação da árvore por fungos e cupins (ALENCAR, 1982). Esta prática garante também que, de um mesmo espécime, possa ser coletado óleo várias vezes ao ano, sem danos à espécie vegetal. As espécies botânicas mais freqüentemente utilizadas na obtenção de óleo são: *C. reticulata* (70%), *C. guianensis* (10%), *C. multijuga* (5%), *C. officinalis* (5%) (LAWRENCE, 1980).

A utilização do óleo de copaíba já era bem difundida entre os índios quando os primeiros exploradores portugueses chegaram ao Brasil, e acredita-se que sua primeira descrição como cicatrizante e antiinflamatório date da época do descobrimento (VEIGA Jr.; PINTO, 2002). Sua utilização se perpetua até os dias de hoje, especialmente na região Amazônica onde seu uso é tão extenso que a copaíba destaca-se como a planta medicinal mais utilizada e conhecida pela população. Em 1982 a produção deste óleo na Amazônia brasileira foi estimada em 200 ton/ano (ALENCAR, 1982). Dados mais recentes do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística mostram que este valor vem aumentando tendo, atingido em 2002, 408 toneladas (IBGE, 2005). Este óleo tem sua mais intensa aplicação na indústria de perfumes, como fixador e na indústria de cosméticos, sendo utilizado também na indústria de vernizes (VEIGA Jr.; PINTO, 2002). Esta importância se reflete também no número considerável de patentes relacionadas à copaíba, na sua grande maioria relacionadas a fins cosméticos e de perfumaria (KOSE CORPORATION, 2001; KAO CORPORATION, 2002; LION CORPORATION, 2000; SHISEIDO CO. LTD., 1996;

AVEDA CORPORATION, 2000; US425501805), algumas a produtos para repelência e sanitários (RIFUSE:KK, 2001; HAYASE; RIFUSE; SUZUKI, 2002; HAYASE; RIFUSE; DAIHO; SUZUKI, 2004). São poucas, entretanto, com fins na terapêutica (BEVERLY M. SPARLING, 1950; GEROLANO; GIMENES, 1986; ICHIMARU PHARCOS CO LTD. 1995; HARGER, 2002), dentre estas temos somente duas patentes nacionais (GEROLANO; GIMENES, 1986 e HARGER, 2002), o que demonstra a necessidade emergente de que as pesquisas realizadas no país, além de gerarem produção científica, que ainda é uma demanda no país, também possam ser orientadas à produção de recursos e tecnologia.

O óleo de copaíba é constituído por misturas de sesquiterpenos e diterpenos. A composição destes componentes pode variar entre espécies ou mesmo interespecies. Alguns autores relacionam esta variação com fatores bióticos externos como danos provocadas por insetos e fungos (LANGENHEIM, 1990).

A fração volátil desta oleorresina é obtida por destilação por arraste à vapor e constitui, em média, 15% do valor total da oleorresina, tendo como principal componente o  $\beta$ -cariofileno (Figura 1). Este sesquiterpeno é encontrado na grande maioria dos óleos essenciais, especialmente no óleo de cravo e na oleorresina de copaíba, sendo esta última, a maior fonte natural conhecida deste composto (TAYLOR, 2002).

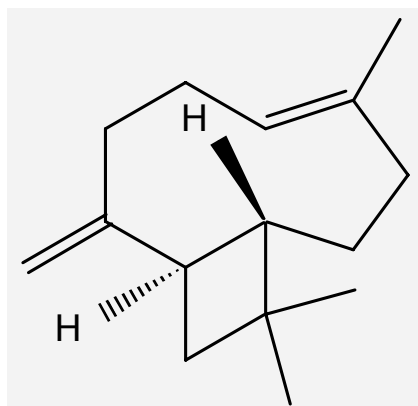


Figura 1. Estrutura química do  $\beta$ -cariofileno.

O óleo de copaíba que chega ao mercado geralmente não é extraído de uma única espécie, em sua grande maioria é composto por uma mistura de óleos obtidos de diferentes espécies de *Copaifera*. Além disso, é comum sua adulteração por óleos graxos e ou álcool (VEIGA Jr., 1997).

A análise por cromatografia em fase gasosa de alta resolução mostrou que a oleorresina apresenta duas regiões bem definidas cromatograficamente: uma referente à região dos sesquiterpenos e outra à dos diterpenos (PATITUCCI, 1995). Esta metodologia permitiu avaliar o perfil de diferentes amostras de óleos de copaíba e constatar adulterações e supor misturas de óleos de diferentes espécies, mostrando ser uma técnica eficaz no controle da autenticidade desta oleorresina (VEIGA Jr. et al., 1997). Outras metodologias analíticas tem sido utilizadas para o controle da oleorerina de copaíba, como: determinação de acidez e do teor de



ésteres (VASCONCELOS; GODINHO 2002) e a análise termogravimétrica (VASCONCELOS; GODINHO, 2001).

Na medicina tradicional o óleo de copaíba é indicado para as mais diferentes enfermidades: estimulante, diurético, laxativo, expectorante, antiséptico do aparelho urinário, antireumático, antiulcerogênico (PIO CORREIA, 1984). Na literatura científica é descrito seu efeito antimicrobiano (MAZURELLA; SICURELLA, 1960; OPDYKE, 1976), anti-helmíntico (PELLEGRINO, 1967; GILBERT et al., 1972), na proteção contra a penetração de cercárias de *S. mansoni* (GILBERT et al., 1972). Souza Jr. et al. (2000) e Paiva et al. (2004a) descreveram o efeito protetor da oleorresina nas colites induzidas por ácido acético em ratos. Este último também descreve o efeito da oleorresina de *C. langsdorffii*, na atenuação de lesões intestinais (PAIVA et al. 2004b), sugerindo que o efeito protetor em ambos os estudos seja devido em parte, as ações antioxidantes e lipoperoxidativas da oleorresina.

Tem sido investigado sua ação em processos de natureza odontológica em função de seu caráter antimicrobiano e antiinflamatório (BANDEIRA, 1999b). A oleorresina incorporada ao cimento dentário apresentou potencial irritativo discreto quando comparado a aquele causado pelo eugenol (agente antimicrobiano) (RIBEIRO, 1989). Estudos de biocompatibilidade de pastas compostas com a oleorresina ou sua fração volátil e hidróxido de cálcio mostraram inicialmente efeito irritante. Contudo, potencializaram as propriedades do hidróxido de cálcio na compatibilidade tecidual e na capacidade indutora de formação de tecido mineralizado, sendo estes efeitos mais acentuados na pasta contendo a fração volátil (BANDEIRA et al., 1999a). Estes resultados corroboram aqueles de Pinheiro (1993), onde o cimento obturador com óleo de copaíba, óxido de zinco e hidróxido

de cálcio mostrou maior eficiência nas infiltrações apicais em obturações de canais radiculares do que outras amostras de cimento dentário largamente empregadas.

Acredita-se que seu efeito antimicrobiano deve-se principalmente aos componentes voláteis, que estão presentes na oleorresina, uma vez que é bem descrito o efeito antimicrobiano destes compostos (MUROI; KUBO 1993; SHAFIN et al., 2002). A oleorresina de *Copaiba langsdorfii* Desf. reduziu, em ratos, a implantação e crescimento do sarcoma de Walker (MORAES;MORAES, 1997). Mais recentemente, Lima et al. (2003) descreveram que a oleorresina de *Copaíba multijuga* Hayne reduziu o crescimento de ou a proliferação de células de melanona (B16F10) *in vitro*. O  $\beta$ -cariofileno e o  $\alpha$ -humuleno eram os componentes majoritários, representando 57% e 8,28% (teor relativo) da composição química da oleorresina. Kubo et al. (1996) relataram a atividade do  $\beta$ -cariofileno e o óxido de cariofileno em linhagens celulares de tumores sólidos. Entretanto, estudos de Legault et al. (2003) sugerem que esta atividade esteja relacionada ao  $\alpha$ -humuleno, que foi fortemente ativo contra inúmeras linhagens de células tumorais, enquanto o  $\beta$ -cariofileno mostrou-se inativo. Estes autores sugerem que a atividade observada seja devido à diminuição de glutathiona intracelular, com concomitante aumento da produção de espécies de oxigênio reativas, ressaltando ainda que o  $\alpha$ -humuleno foi menos tóxico contra células normais do que contra as células tumorais.

Esta atividade também vem sendo investigada na fração diterpênica. O kolavenol, um diterpeno de esqueleto clerodano, foi duas vezes mais ativo, aumentando a sobrevivência dos animais portadores de carcinoma IMC, quando comparado ao fármaco de referência (o 5-fluoracil) (OHSAKI, 1994). Costa-Lotufo et al. (2002), demonstraram em ensaios *in vitro* que o ácido kaurenóico isolado da

oleorresina de copaíba inibiu em 95% a proliferação de células leucêmicas humanas e em 45% as de mama e cólon.

A utilização da oleorresina em processos de cicatrização, especialmente na região amazônica, é muito difundida. Brito et al. (1998) avaliaram este efeito com a oleoresina de *C. reticulata* e observaram um retardo na contração e epitelialização da ferida, bem como perda de pelos e formação de escaras em torno da ferida. Resultados similares foram descritos por Henriques et al. em feridas pós-operatórias (anotações pessoais). Entretanto, Paiva et al. (2002) estudando os efeitos da oleorresina de *C. langsdorffii* em lesões e feridas em pele de ratos, descreveram uma aceleração no processo de cicatrização. Nenhum dos autores descreve a composição da química da oleoresina, o que nos leva a crer que os resultados conflitantes possam ser atribuídos a diferenças entre as amostras avaliadas. Contudo, vale ressaltar que Woisky (2001), em seus estudos de toxicidade aguda e sub-crônica, destaca que a fração resinosa (diterpênica) é mais tóxica que a fração volátil. Estudos de toxicidade da oleoresina ainda são escassos na literatura. Chen-Chen e Sena (2002) relatam a atividade mutagênica e tóxica da oleoresina de *C. langsdorffii* em teste de análise de frequência de microtúbulos em eritrócitos policromáticos na medula óssea de ratos em doses de 2,11mL/Kg a 6,76mL/Kg.

A atividade antiinflamatória da oleorresina é, sem dúvida, a mais difundida na medicina popular e tem sido investigada no meio científico. Basile et al. (1998) mostraram, em modelo animal, a ação antiinflamatória de óleos comerciais de copaíba, estimando a DL50 em 3,79 mL/Kg. O óleo de *C. cearensis* Huber avaliado por Fernandes, Pereira e Paulo (1992) apresentou atividade antiinflamatória maior que o bisabolol, o ácido copálico e o éster metílico do ácido solidago, substâncias presentes neste óleo e que foram avaliados isoladamente. Woisky (2001) avaliando

diferentes amostras de oleorresina e suas frações, volátil e resinosa, no edema de pata induzido por carragenina, nistatina ou miconazol, constatou a atividade antiinflamatória da oleorresina, não observando diferença significativa entre a oleorresina e suas frações. Assim como, a inibição observada em todas as amostras foi menor (no caso da dexametazona) ou semelhante (nistatina e miconazol) que os padrões de referência empregados no estudo. Faz-se necessário ressaltar que as amostras avaliadas no estudo de Woisky apresentaram diferenças na sua composição química e, segundo o autor a amostra com menor teor de  $\beta$ -cariofileno (entretanto, com alto teor de bisaboleno) foi a que apresentou uma maior eficácia na atividade avaliada. Veiga Jr. et al. (2001) estudando a *C. multijuga* Hayne, mostraram que a fração rica em hidrocarbonetos apresentou melhores resultados, que a fração de álcoois sesquiterpênicos e ácidos diterpênicos, na redução do edema de pata induzido por bradicinina ou carragenina.

Os resultados relatados acima nos sugerem que a ação antiinflamatória esteja relacionada com o conteúdo de sesquiterpenos. Contudo, é sabido que este conteúdo pode variar de 30-90% na oleorresina (TAYLOR, 2002), o que poderia explicar as diferenças entre os resultados encontrados pelos autores.

Os estudos de Martin et al. (1993) mostram que o  $\beta$ -cariofileno apresentou ação antiinflamatória por inibição do edema de pata induzido por carragenina e PGE1, sugerindo que este sesquiterpeno tenha participação importante na ação antiinflamatória.

O efeito protetor da oleorresina de copaíba sobre a mucosa gástrica (PAIVA et al., 1998) corroboram os resultados obtidos por Tambe et al. (1996), que demonstraram que o  $\beta$ -cariofileno reduz as lesões da mucosa gástrica causadas pelo álcool ou ácido clorídrico, sem afetar a secreção gástrica. Também é relatada

uma potente ação como anestésico local para este composto, em comparação com a procaína (GHELARDINI et al., 2001).

A busca de moléculas com atividade antiinflamatória é um desafio incessante para as indústrias, pois esta classe de medicamentos apresenta uma alta diversidade de uso, como por exemplo em hemorróidas, reumatismos, acne, lesões dérmicas, úlceras entre outras. Como resultados disto, as vendas de antiinflamatórios e analgésicos nos Estados Unidos excederam 223 milhões de dólares em 2000, com estimativas para 241 milhões em 2005, sendo a classe de medicamentos com o maior número de pedido de patentes relacionadas ao desenvolvimento de produtos utilizados na medicina tradicional (DARSHAN; DORESWAMY, 2004). Segundo dados da Abifarma (Associação Brasileira da Indústria Farmacêutica), os antiinflamatórios não esteroidais (AINES) representam o quarto maior mercado da indústria farmacêutica brasileira. Os antiinflamatórios existentes no mercado apresentam diversos efeitos colaterais, entre os quais os mais graves são ulceração gástrica, hemorragia e reações de hipersensibilidade. Além disto, como são desenvolvidos e registrados pela indústria farmacêutica internacional, representam um alto custo para a população de países em desenvolvimento, como o Brasil. Sendo assim, a busca de novos antiinflamatórios com efeitos colaterais reduzidos, além de baixo custo, mostra-se de extrema relevância.

## **1.2. Microencapsulação**

A microencapsulação é o processo pelo qual sólido, líquido ou mesmo gases, são envolvidos por uma fina membrana de polímeros naturais ou sintéticos,

biodegradáveis ou não, com os objetivos de aumentar a estabilidade, protegendo substâncias de condições agressivas do meio como: luz, umidade, exposição ao ar etc.; permitir a incorporação de materiais incompatíveis entre si, em um mesmo produto; aumentar a vida útil do produto; e também promover a liberação modificada do encapsulado. O diâmetro das partículas obtidas por este processo pode variar de 1-5000  $\mu\text{m}$  e a espessura da parede de 2- 30% do peso total da partícula (TOOD, 1970; BAKAN, 2001).

A origem deste processo remonta ao final da década de 50, como um substituto "limpo" para o papel e as tiras de carbono utilizadas nas máquinas industriais, onde os papéis eram impregnados de microcápsulas que continham corantes e com a pressão da máquina eram liberados permitindo a cópia (ANSEL; POPOVIVK; ALLEN, 2000). As primeiras patentes surgiram nos Estados Unidos em 1956, mas foi a partir de 1970 que surgiu um maior interesse e aplicabilidade para esta técnica LUZZI, 1970). Hoje, inúmeras são as aplicações descritas para as microcápsulas: em agricultura, para liberação lenta de fungicidas e fertilizante (BOH et al., 1999); na indústria de cosméticos com vasta utilização em cremes hidratantes e emolientes, depilatórios, fotoprotetores, produtos para cabelo e maquiagem (VINETSKY; MAGDASSI, 1999; HAWKIWS; BLEDSOE; DUNCAN, 2000); na indústria alimentícia, a encapsulação de aromas tem sido de enorme importância para a estabilidade e o melhoramento do sabor dos alimentos, na encapsulação de vitaminas lipossolúveis, lactobacilos entre outros produtos (SHAHIDI; HAN, 1993; GOUIN, 2004) e na indústria farmacêutica, as microcápsulas têm um amplo espectro de atuação, quer seja para o mascaramento de sabor desagradável de certos fármacos, redução da toxicidade, vetorização de fármacos e materiais de diagnóstico

e liberação prolongada de fármacos (ALPAR; EYLES; WILLIAMSON, 1998; GURSOY; KARAKUS; OKAR, 1999; QUENELLE et al., 1999).

Dá-se o nome de "núcleo" à substância, sólida ou não, que se deseja encapsular e de "revestimento" ao filme coesivo que envolve o núcleo. Este último deve ser quimicamente compatível e não reativo com o material encapsulado e deve apresentar propriedades como flexibilidade, dureza e impermeabilidade adequada à finalidade do produto desejado.

No processo de microencapsulação podem-se produzir dois tipos básicos de estruturas: sistema do tipo "reservatório", onde uma partícula mononucleada está envolvida por uma fina parede (microcápsula), Figura 2A; sistema matricial, onde o material encapsulado está uniformemente distribuído no seio do encapsulante (microesfera ou micropartícula), Figura 2B. O tipo de partícula pode influenciar na quantidade de material retido e no comportamento de liberação.

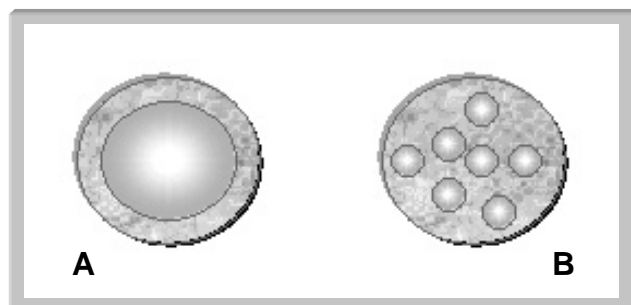


Figura 2. Estruturas obtidas no processo de microencapsulação: microcápsula (A); microesfera ou micropartícula (B).

O processo de encapsulação pode ser descrito em três etapas:

- 1) formação de uma parede ou "casca" em torno do material de núcleo;
- 2) conservação total e íntegra do material do núcleo dentro desta parede;
- 3) liberação do material encapsulado em tempo certo e com controle da taxa de liberação (VERSIC, 1988a).

São descritos diferentes métodos para preparação de microcápsulas, que podem ser divididos em métodos mecânicos e físico-químicos e químicos. Entre os métodos mecânicos estão: a suspensão no ar, centrifugação multiorifício, revestimento em turbinas, atomização com secagem (*spray drying*), e os métodos físico-químicos compreendem a evaporação do solvente, fusão-emulsificação e coacervação ou separação de fases. Os métodos químicos envolvem a policondensação interfacial, polimerização interfacial e geleificação (BAKAN, 2001; MAGIL, 1991; OLIVEIRA; SCARPA; BUENO, 1992; RÉ, 1998).

A seleção do método de encapsulação depende do custo da operação, da sensibilidade do encapsulado, do tamanho desejado para a microcápsula, das propriedades físicas e químicas do encapsulado e da parede, da aplicação do produto e do mecanismo de liberação (RÉ, 1998).

A escolha do material de cobertura é um fator determinante na eficiência do processo de encapsulação. Inúmeros materiais são descritos, entre eles encontram-se: resinas solúveis na água, resinas insolúveis na água, ceras e resinas entéricas (BAKAN, 2001). Sua aplicação depende essencialmente do processo escolhido, da finalidade do produto e do material de núcleo a ser encapsulado.

Inúmeros são os trabalhos na literatura sob encapsulação de aromas (*flavours*) (ANANDARAMAN; REINECCIUS, 1986; INGLET; GELBMAN;



REINECCIUS, 1988; ROSENBERG; KOLPEMAN; TALMON, 1990; NEAU et al., 1993; GOUBET; QUERE; VOILEY, 1998; BERTOLINI, SIANI; GROSSO, 2000). Em sua grande maioria, compostos voláteis são encapsulados em agentes de cobertura sólidos com o intuito de aumentar sua proteção, controle de liberação do componente ativo, redução da evaporação e promover uma maior facilidade de manipulação. Entre os métodos mais empregados destaca-se a técnica de encapsulação por *spray drying*, coacervação e extrusão (VERSIC, 1988b; RISCH, 1988; RIBEIRO et al., 1997).

A secagem por *spray drying* é a técnica mais comumente empregada para a obtenção de microcápsulas. Esta técnica se baseia na aspensão de um fluido (líquido, dispersão ou pasta) em uma corrente de ar aquecido. As principais variáveis envolvidas no processo são: temperaturas do ar de entrada e saída, fluxo de ar ou do fluido de arraste, distribuição da temperatura e umidade, tempo de residência e geometria da câmara (WENDEL: ÇELIK, 1997). Este processo apresenta a como vantagens a possibilidade de transformar líquidos em sólidos; a secagem de compostos sensíveis ao calor, insumos biológicos e farmacêuticos; operação contínua permitindo produção em larga escala com boa eficiência; produção de partículas relativamente uniformes e esféricas; e baixo custo comparado a outros processos (RÉ, 1998).

A escolha do material de cobertura, bem como a natureza do material de núcleo são fatores determinantes para plena eficiência do processo. A espessura do material de cobertura também influencia a estabilidade e retenção do material do núcleo como demonstrado por Reineccius e Anandaraman (1986) que empregando maltodextrinas com diferentes números de equivalentes de dextrose observaram um aumento da retenção de óleo essencial de laranja quanto maior o número de

equivalentes contidos no polímero. Resultados semelhantes foram descritos por Rosenberg (1990) para diferentes ésteres.

Um outro parâmetro muito importante na retenção do aroma é a velocidade de migração através da parede do suporte, a qual está embasada na teoria de Thijssen (1971), que descreve que a perda dos voláteis durante o processo de secagem é independente da volatilidade relativa do aroma, sendo controlada pela velocidade de migração dos compostos para a superfície. Nesse caso, a polaridade do aroma é o fator determinante, ou seja, quanto maior a polaridade, mais facilmente ele migrará para a superfície do suporte durante o processo de secagem, reduzindo portanto, a retenção (VOILEY, 1995; RÉ, 1998).

A integridade da superfície da parede da microcápsula, bem como sua porosidade também são fatores a serem considerados, para uma maior retenção do aroma. Técnicas de microscopia óptica, eletrônica de varredura e confocal têm sido ferramentas importantes para observações de superfície e de estruturas interna das microcápsulas (RAMADAN; TAWASHI, 1990; RÉ, 1998; LAMPRECHT, 2000).

### **1.3. Goma Arábica**

Esta goma é também chamada de goma acácia, é um colóide vegetal obtido da exsudação de troncos e galhos de plantas da família das Acácias. Existem muitas espécies de acácias distribuídas nas regiões semidesérticas do continente africano, porém somente algumas delas produzem goma, sendo a principal fonte a espécie *Acacia Senegal* L. (THEVENET, 1988).

A goma é exudata das árvores em largos nódulos estriados, sua coleta é manual e realizada principalmente duas vezes durante a estação seca. A quantidade

produzida por cada árvore não excede 300g. A goma arábica é vendida em seu estado natural ou após processamento tecnológico. A goma bruta é previamente limpa para remoção de pedaços de tronco, areia e pequenas impurezas. Os pós de goma grau alimentício não podem conter mais que 0,5% de resíduos. Quando a goma é submetida a processos como o peneiramento, decantação, centrifugação, concentração, pasteurização e atomização seguida de secagem em *spray-drying*, obtém-se um produto de alta qualidade e rápida hidratação, porém de maior custo (NUSSINOVITH, 1997).

O Sudão domina o comércio e a produção (80-90%) de goma no mercado mundial, com uma produção anual de 40.000-50.000 t/ano. Entretanto, sua produção sofre constantes flutuações devido aos eventos climáticos e políticos da região, o que gera também alterações em seu preço no mercado, que podem variar de US\$1500 a 5000/t (VERBEKEN; DIERCKX; DEWETTINCK, 2003).

A goma arábica é um polissacarídeo complexo, ácido e com massa molecular em torno de 500.000 daltons. A obtida da espécie *A. Senegal* L. constituída principalmente de arabinose, galactose, raminose, ácido glicorônico e 0,34% de nitrogênio, contido em uma fração glicoproteica de baixo peso molecular, representando entre 5 -10% da composição da goma. Esta fração protéica é a responsável pela propriedade emulsificante da goma (THEVENET, 1988; NUSSINOVITH, 1997).

Devido a estrutura altamente ramificada, a goma arábica é facilmente dispersível em água em concentrações de até 50%, porém com baixa viscosidade aparente (THEVENET, 1995), formando emulsões estáveis (SAHINI; HAN, 1993).

Esta goma tem sido considerada padrão de excelência como material encapsulante de aromas ricos em monoterpenos (REINECIUS, 1988), devido a sua

propriedade emulsificante, que garante uma boa capacidade de retenção para muitos compostos voláteis durante o processo de secagem por atomização. (WESTING; REINECCIUS; CAPAROSO, 1988).

Com base nas características da goma arábica, associada a sua utilização na microencapsulação de voláteis monoterpênicos, uma das propostas deste trabalho foi a utilização da goma arábica como material de parede na microencapsulação da fração volátil do óleo de copaíba, rica em compostos sesquiterpênicos.

# ***Objetivos***

---

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Viabilizar a utilização da oleorresina de copaíba como insumo farmacêutico por microencapsulação de sua fração volátil e avaliação farmacológica.

#### 2.1.2. Objetivos específicos

- Otimização do processo de obtenção da fração volátil a partir da oleorresina de copaíba.
- Identificação dos componentes presentes na fração volátil por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa.
- Avaliação química quantitativa da fração volátil, especialmente o teor de  $\beta$ -cariofileno, por cromatografia em fase gasosa.
- Obtenção de microcápsulas por *spray drying* empregando como polímero encapsulante a goma arábica.
- Avaliação da eficiência de encapsulação por análise química quantitativa da fração volátil.
- Avaliação da morfologia das microcápsulas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia laser confocal.
- Avaliação da estabilidade química e morfológica das microcápsulas após serem submetidas a condições de estresse (25°C e 40°C à 50% UR) por período de 60 dias.
- Avaliação da atividade antiinflamatória da fração volátil e das microcápsulas.

# ***Material e Métodos***

---

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Identificação química dos componentes da oleorresina de copaíba

A oleorresina de copaíba adquirida da Central de Cooperativas de Rio Branco em 2000, coletada entre 1999 e 2000, na região de Tarauacá, AC, foi analisada por cromatografia em fase gasosa de alta resolução acoplada a espectrometria de massa (CGAR-EM).

Uma solução 2 mg de oleorresina em diclorometano (2 mL) foi tratada com solução de diazometano em éter (preparado a partir de Diazald®; Aldrich). Em seguida, o solvente foi evaporado e o resíduo dissolvido em 100µl de diclorometano, para injeção no cromatógrafo.

As análises foram realizadas em um cromatógrafo HP Hewlett-Packard 6890 acoplado a um detector de massas Agilent 5973 Network, com injetor tipo split/splitless (270 °C) com divisão de vazão de 1:20, utilizando-se uma coluna capilar HP-5 (30m x 0,25mm x 0,25µm de espessura do filme). A vazão foi de 2 mL/min para o hélio como gás de arraste sob fluxo constante, com temperatura inicial de 110 °C, mantida por 2 minutos, e seguida de aquecimento, primeiramente à taxa de 5 °C/min até 140 °C e, em seguida de 20 °C/min até 290°C. O volume de injeção foi de 1,0 µL. Os componentes individuais da oleorresina foram caracterizados por comparação dos espectros de massa com a biblioteca do aparelho (Wiley Library Software 7N), e os Índices de Retenção foram calculados com referência a uma seqüência linear de n-alcanos C8-C36 (ADAMS, 1995).



### **3.2. Obtenção da fração volátil da oleoresina de copaíba**

Uma massa de aproximadamente 920 g de óleo de copaíba foi transferida para balão de 5000 mL, 2000 mL de água foram adicionados, e o aquecimento iniciado até a ebulição da mistura. A fração volátil do óleo de copaíba foi obtida por arraste a vapor por 8h, empregando o aparato modificado de Clevenger (GOTTLIEB, 1960). Em seguida, a fração coletada foi submetida à uma destilação simples, utilizando-se uma manta de aquecimento e vidraria convencional.

### **3.3. Determinação da densidade da fração volátil de copaíba**

A densidade foi determinada segundo técnica descrita na USP XIV. Inicialmente foi feita a calibração do picnômetro com água à 25 °C, por pesagem do picnômetro em balança analítica calibrada. Em seguida, foi realizada a determinação da densidade da fração volátil da oleoresina nas mesmas condições. Todos os procedimentos foram realizados em triplicata.

### **3.4. Determinação do Índice de Refração da fração volátil de copaíba**

Uma pequena gota da fração volátil foi colocada sob a superfície do refratômetro (Abbé), previamente calibrado com água destilada ( $\eta_D^{20}$  1,3330), e o índice determinado sob luz de sódio no comprimento de 589,3 nm (raia D) e temperatura de 20 °C, segundo descrição da Farmacopéia Brasileira (1998).

### **3.5. Identificação dos constituintes e quantificação da fração volátil de copaíba (padronização química)**

Os componentes da fração volátil foram identificados por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massa, e quantificados por cromatografia em fase gasosa de alta resolução com detecção por ionização em chama (CGAR-DIC) nas mesmas condições descritas no item 3.1., excetuando-se a etapa de metilação. A quantificação do  $\beta$ -cariofileno na fração volátil foi realizada por padronização externa, utilizando a metodologia descrita por Tappin et al. (2004). O mesmo procedimento foi utilizado para determinar o teor de óxido de cariofileno na fração.

A curva analítica do  $\beta$ -cariofileno foi obtida a partir de soluções volumétricas nas seguintes concentrações: 1 mg/mL; 3,24 mg/mL; 5,50 mg/mL; 7,88 mg/mL e 10,0 mg/mL. Uma amostra de 4,04 mg/mL da fração volátil foi analisada para determinação do teor de  $\beta$ -cariofileno. Para o óxido de cariofileno, foram utilizadas soluções nas seguintes concentrações: 0,1 mg/mL; 0,3 mg/mL; 0,5 mg/mL e 0,7 mg/mL para a obtenção da curva analítica; sendo analisada uma solução na concentração de 115,9 mg/mL. Para ambos os compostos, as soluções foram obtidas em diclorometano.

Para a determinação do teor de  $\beta$ -cariofileno e de seu óxido, amostras de concentrações próximas ao ponto médio da curva analítica foram injetadas, após a injeção da amostra da fração volátil, nas seguintes concentrações: 5,50 mg/mL ( $\beta$ -cariofileno) e 4,04 mg/mL (fração volátil); e 0,561 mg/mL (óxido de cariofileno) e 115,9 mg/mL (fração volátil).

### 3.6. Preparação das microcápsulas

Foram preparados três lotes de dispersões goma arábica:fração volátil em água destilada (p/p), nas seguintes proporções: 7:3, 8:2 e 9:1. Primeiramente foi dispersa a goma arábica em água com auxílio de um agitador mecânico convencional (Heidolph RZR-1) a 450 rpm. Em seguida, foi adicionada a fração volátil e homogeneizada em Turrax a 12000 rpm por 3 minutos. A dispersão foi atomizada e seca em um *spray-dryer* Niro Atomizer (Figura 3), equipado com uma câmara de secagem cone cilíndrica de 176,8 cm de altura. O diâmetro externo da seção cilíndrica da câmara é de 200,6 cm e o diâmetro externo medido na base da região cônica, 150 cm. O sistema de atomização é do tipo disco rotatório (Modelo FU11-BAA06), de diâmetro 12,2 cm que operou a 6400 rpm. A vazão de alimentação da amostra foi torno de 5,4 L/h. As temperaturas empregadas no processo de secagem foram de 180 -185 °C e 75 -80 °C na entrada e saída, respectivamente.

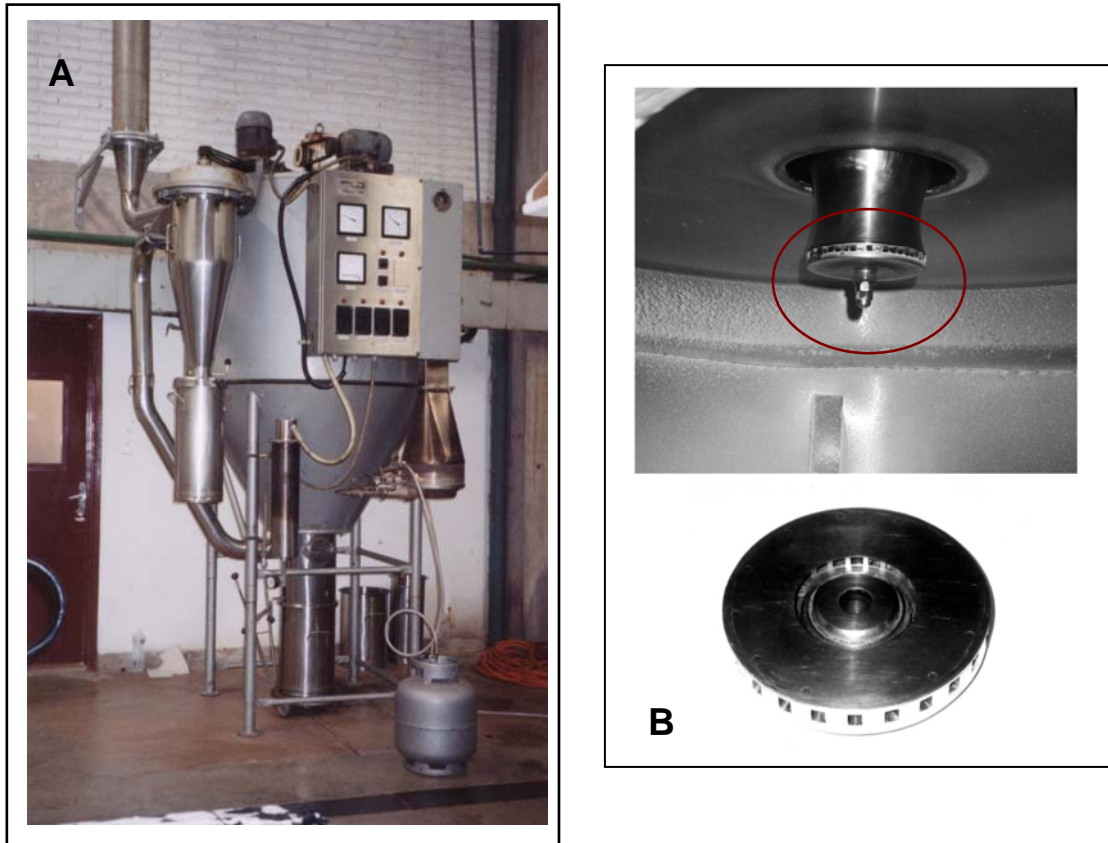


Figura 3. *Spray Drying* Niro Atomizer (FEA, Unicamp-SP) (A), atomizador rotatório (B).

### 3.7. Determinação da umidade das microcápsulas

O teor de umidade nas microcápsulas foi determinado pela extração com tolueno de cerca de 40 g de cada uma das amostras segundo a técnica de destilação azeotrópica (USP XXIV, 2000). A extração foi realizada por um período de 3h e as amostras analisadas em triplicata. O teor foi calculado pela relação do volume de água obtido em função da massa de amostragem.

### 3.8. Eficiência de encapsulação

#### 3.8.1. Determinação do óleo total das microcápsulas

Cerca de 20 g de microcápsulas foram colocadas em um balão de 500 mL, ao qual foram adicionados 150 mL de água destilada, seguindo-se uma extração por arraste a vapor com auxílio do aparato de Clevenger por um período de 6 h. A determinação da fração total retida nas microcápsulas foi obtida pelo volume de óleo recolhido no aparato, multiplicado pela densidade da fração (ANKER; REINECCIUS, 1988). Todo procedimento foi realizado em triplicata para cada amostra. O percentual de fração total recolhida foi calculada segundo a expressão:

$$FV_T (\%) = 100 \cdot P_{FVa} / P_{FVe}$$

onde:

$FV_T$  é o percentual de fração volátil obtido

$P_{FVa}$  é o peso de fração volátil na amostra

$P_{FVe}$  é a quantidade (peso) teórica esperada de fração na microcápsula assumido a retenção total.

#### 3.8.2. Determinação do óleo de superfície

O procedimento para determinação do óleo de superfície foi baseado na metodologia descrita por Anker e Reneccius (1988), com algumas modificações. Amostras de 10 g de microcápsulas foram colocadas em um cartucho de celulose

(Whatman 33 mm x 100 mm), e este foi acondicionado em um aparelho de soxhlet, onde se procedeu a extração com 125 mL de n-pentano por 4 h e 30 min. Ao término da operação, deixou-se o sistema atingir a temperatura ambiente e, em seguida, adicionou-se 1 mL de uma solução 3 mg/mL de nonadecanoato de metila (Aldrich), usado como padrão interno. O volume do balão foi reduzido a 1 mL, com o auxílio de um fluxo de argônio. Uma alíquota de 1  $\mu$ L foi injetada no sistema CGAR-DIC nas condições descritas no item 3.5. A quantidade de óleo presente na superfície das microcápsulas foi determinada por quantificação interna, correlacionando-se as áreas resultantes dos sinais da amostra com o sinal do padrão interno. Todo o procedimento foi realizado em triplicata.

### **3.9. Determinação do tamanho de partícula**

A análise granulométrica das partículas foi determinada por microscopia óptica com luz incidente (microscópio Olympus, U-LBD-2, Japão), e os diâmetros das micropartículas foram avaliados com auxílio do programa Image Pro-Plus.

As partículas foram dispersadas sobre uma lâmina de vidro com auxílio de uma bomba a vácuo (Nevoni, Brasil) em ambiente fechado. A distribuição do tamanho das partículas foi expressa em % de frequência e % de frequência acumulada, sendo utilizadas uma média de 1000 partículas para análise de cada amostra.

### **3.10. Morfologia das microcápsulas**

#### **3.10.1. Microscopia eletrônica por varredura (MEV)**

As amostras de microcápsulas foram distribuídas sobre uma fita dupla-face, aderidas a um suporte de metal, revestidas sob atmosfera de argônio, com ouro coloidal e analisadas em microscópio eletrônico de varredura JSM T330A - JEOL® em aumento de 300 e 8000 vezes.

#### **3.10.2. Microscopia confocal a laser**

A incorporação dos dois corantes de fluorescência foi adaptada da metodologia descrita por Lamprecht, Schäfer e Lehr (2000), onde 6mL de uma solução de isotiocianato de fluoresceína (FITC; Aldrich) (1mg/mL), foi adicionada a dispersão de 70mL de goma arábica, ficando sob agitação e em ausência de luz por 1h. Cerca de 0,05% de vermelho nilo foi disperso previamente na fração volátil, e mantido ao abrigo de luz. A fração volátil foi adicionada à dispersão, submetida à homogeneização em Turrax (12000 rpm) por 3 min e em seguida dispersão foi atomizada e seca em um mini spray-dryer Buchi modelo 191, nas condições:

Temperatura de entrada: 150 °C

Temperatura de saída: 80 °C

Fluxo de ar: 4,5 KgF/cm<sup>2</sup>

Vazão de alimentação da mostra (L/h): 0,24

Percentual de aspiração: 95%

Durante todo o processo de secagem o equipamento foi mantido coberto evitando incidência de luz na amostra, para que o material perde-se o mínimo de fluorescência possível.

As amostras de microcápsulas previamente associadas ao corante vermelho Nilo (Nilo red; Aldrich) e ao fluorocromo FITC, foram hidratadas com volume de água suficiente para o perfeito umedecimento do material, que foi então distribuído entre uma lâmina e lamínula. Assim preparado, o material foi submetido a um dispositivo de varredura confocal a laser Fluoview V3.3 (Olympus, Japão) acoplado a um microscópico *up-right* BX51 (Olympus). As imagens foram adquiridas por excitação em laser de 488 nm, utilizando-se filtros de emissão em 510-530 nm para o FITC e excitação em laser 530 nm com filtros de emissão em 560-600 nm para o vermelho Nilo. As aquisições das imagens foram feitas em seqüência (e não simultaneamente), com o intuito de inibir a sobreposição de emissão do vermelho Nilo sobre o FITC.

### **3.11. Estudo de estabilidade**

#### **3.11.1. Fração volátil**

Uma amostra de cerca de 25 g da fração volátil foi submetida a temperaturas de 25 °C e 40 °C sob condições de 50% de umidade relativa (UR), por um período de 60 dias. As amostras foram colocadas em placas de Petri descobertas, no interior de uma câmara climática FANEN Modelo 345. O peso inicial da amostra foi determinado, sendo a sua variação acompanhada durante todo o estudo, assim como o aspecto visual do material.

A determinação quantitativa do teor de  $\beta$ -cariofileno e óxido de cariofileno foi realizada por padronização interna e externa, por CGAR-DIC. O nonadecanato de metila foi utilizado como padrão interno.

Para a padronização externa foram construídas curvas analíticas para o  $\beta$ -cariofileno e para o óxido de cariofileno, com soluções de: 1,01 mg/mL, 2,02 mg/mL,



6,06 mg/mL, 8,08 mg/mL e 10,10 mg/mL, utilizadas para o primeiro. No caso do óxido de cariofileno, foram necessárias duas curvas analíticas: a primeira, cuja concentração das soluções foi 0,10 mg/mL, 0,20 mg/mL, 0,40 mg/mL, 0,61 mg/mL, 0,81 mg/mL; e a segunda, com 1,01 mg/mL, 20,3 mg/mL, 4,06 mg/mL, 6,08 mg/mL, 8,11 mg/mL e 10,14 mg/mL. As soluções da fração volátil, com concentração de 7 mg/mL, foram preparadas em acetona, já contendo o padrão interno (nonadecanoato de metila, 0,05 mg/mL) e analisadas em triplicata, nas condições descritas no item 3.1., exceto que no injetor foi utilizado *splitless* por 0,5 minuto. Cada análise incluiu a injeção paralela de uma solução de  $\beta$ -cariofileno e uma de óxido de cariofileno, de concentrações próximas à dos pontos médios das curvas analíticas.

### **3.11.2. Microcápsulas**

Cerca de 5 g de microcápsulas de cada amostra (GA10, GA20 e GA30) foram submetidas a temperaturas de 25 °C e 40 °C, sob condições 50% de umidade relativa, por um período de 60 dias. As amostras foram colocadas em placas de Petri descobertas, em câmara climática FANEN Modelo 345.

As determinações quantitativas dos teores de  $\beta$ -cariofileno e de óxido de cariofileno nas microcápsulas foram baseadas na metodologia descrita por Anker e Reneccius (1988), com modificações. Amostras de 150 mg de microcápsulas foram dissolvidas em 85  $\mu$ L de água destilada, em um recipiente hermeticamente lacrado, e agitadas com auxílio de um vórtex (Mistral Mixer 1190) até a completa dissolução. Em seguida, 4 mL de uma solução de nonadecanoato de metila em acetona (0,05 mg/mL; padrão interno) foram adicionados ao recipiente, com auxílio de uma seringa volumétrica calibrada (GAS-TIGHT AG FIXA, Agilent). A solução foi novamente

agitada, e uma alíquota de 1  $\mu$ L foi submetida à análise por CGAR-DIC, nas condições descritas no item 3.11.1.

Como na determinação da fração volátil (item acima), todas as análises foram acompanhadas por uma injeção de uma solução de concentração próxima ao ponto médio da curva analítica do  $\beta$ -cariofileno e do óxido de cariofileno.

Para elaboração da curva analítica do  $\beta$ -cariofileno foram utilizadas soluções de concentração 9,92 mg/mL, 7,93 mg/mL, 6,35 mg/mL, 3,17 mg/mL, 1,58 mg/mL e 0,79 mg/mL, em diclorometano; e para a curva analítica do óxido 12,6 mg/mL, 9,60 mg/mL, 7,69 mg/mL, 3,84 mg/mL, 1,92 mg/mL, 0,96 mg/mL. Todas as análises foram realizadas em triplicatas.

## **3.12. Avaliação Farmacológica**

### **3.12.1. Animais**

Foram utilizados camundongos Swiss, machos, pesando entre 18 e 25 gramas fornecidos pelo Biotério Central da Fundação Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro, RJ) e mantidos no biotério do Departamento de Farmacologia Aplicada, Farmanguinhos até o momento do uso. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada ( $20 \pm 5$  °C) e ciclos claro/escuro de 12 horas, tendo livre acesso à água e ração. Antes de iniciar os experimentos, os animais passaram por um período de adaptação ao ambiente e preparação de 06 dias. Nos três primeiros dias receberam água contendo vermífugo (Mebendazol, 20 mg/1000 mL) e os três últimos para eliminação do vermífugo. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as normas do Comitê de Ética de Experimentação Animal da Fundação Oswaldo Cruz, RJ.

### **3.12.2. Tratamento com as amostras**

Todas as amostras foram administradas por via oral, num volume final de 200µL. A fração volátil não encapsulada (FV), o β-cariofileno (t-car) e a oleorresina de copaíba (OB) foram diluídas em solução de DMSO 1%, enquanto que as microcápsulas, contendo a fração volátil (MFV), e o diclofenaco de sódio (DS) (Far-Manguinhos-Fiocruz) foram diluídas em água. A dose de microcápsulas foi calculada com base no conteúdo da fração volátil.

### **3.12.3 Avaliação da Atividade Antiinflamatória**

#### **3.12.3.1. Indução da pleurisia**

A pleurisia foi induzida pela técnica de Spector (1956), modificada por Henriques et al. (1990), para sua utilização em camundongos. Aos animais foi administrado, por via endovenosa, solução de azul de Evans (25 mg/Kg de peso corporal), visando sua ligação à albumina plasmática, possibilitando assim, a quantificação colorimétrica do extravasamento protéico para a cavidade torácica.

Vinte e três horas depois foram administradas, por via oral, as preparações MFV, FV, OB e t-car em diferentes doses, de acordo com o desenho experimental realizado. A dose de 100 mg de diclofenaco de sódio (DS) foi empregada como referência. Uma hora depois, foram administradas, na cavidade torácica direita dos camundongos, através de uma seringa com agulha (13 x 5 gauge), soluções de 100 uL de zimosan (Sigma; 100 µg/cavidade) ou carragenina (Sigma; 300 µg/cavidade). O grupo controle recebeu, por via intratorácica, solução salina (NaCl 0,9%) estéril. Após 4 horas, os animais foram sacrificados por asfixia com dióxido de carbono, e suas cavidades torácicas abertas e lavadas com 1 mL de PBS heparinizado (40

UI/mL). O volume recolhido foi medido com auxílio de pipeta automática. Em todos os experimentos foram utilizados 8 animais em cada grupo de estudo.

### **3.12.3. 2. Quantificação do extravasamento protéico**

O fluido recolhido da cavidade pleural dos animais foi centrifugado a 2500 RPM durante 10 minutos. Duzentos microlitros do sobrenadante livre de células foram recolhidos e distribuídos em uma placa de cultura de 96 poços, de maneira que cada poço correspondesse ao lavado pleural de um camundongo. Em seguida a placa foi levada para leitura da absorbância a 600 nm em um leitor de microplacas (SOFTmax PRO 190; Molecular Devices).

### **3.12.3.3. Contagem de Leucócitos**

A contagem do número total de leucócitos no fluido da cavidade pleural foi realizada em uma câmara de Neubauer, por microscopia óptica convencional (aumento de 200X), após diluição (1:100) de uma alíquota do lavado pleural em líquido de Türk (solução de ácido acético 2%).

Para a contagem diferencial de leucócitos foram utilizados citoesfregaços, preparados em citocentrífuga (Shandon), corados pelo método de May-Grunwald-Giemsa e visualizados por microscopia óptica convencional (aumento de 1000X). Nas lâminas foram contados e diferenciados 3 tipos celulares: neutrófilos, mononucleares e eosinófilos.

Os resultados foram expressos como número de leucócitos ( $\times 10^6$ ) por cavidade.

#### **3.12.3.4. Edema de pata**

Cada grupo experimental de 8 animais recebeu por via oral as preparações teste: MFV, FV, t-car e DS, em diferentes doses de acordo com os experimentos. O grupo controle recebeu solução salina estéril. Uma hora após o tratamento oral, os animais foram estimulados com zimosan (500 µg em 50 µL/pata) ou carragenina (300 µg em 50 µL /pata), através da injeção sub-plantar em uma das patas traseiras. Na pata contra-lateral foi injetado o mesmo volume do veículo (salina estéril livre de pirógenos), usando-se uma agulha 30 ½ G. Quatro horas após o estímulo, o edema foi analisado no pletismógrafo digital (Ugo Basile®), pelo deslocamento de líquido (0,5 g NaCl; 3 mL Extran 100%/1 L) produzido pela inserção de cada pata na cubeta. Cada análise foi realizada em triplicata.

#### **3.12.5. Produção de Óxido Nítrico**

##### **3.12.5.1. Avaliação da Citotoxicidade**

Células obtidas do peritônio de camundongos injetados previamente com tioglicolato (1 mL a 3%) por via intraperitoneal foram plaqueadas ( $2,5 \times 10^5$  células/poço) em placa de 96 poços, e incubadas com a fração volátil e com o β-cariofileno, ambos nas seguintes concentrações 0,5; 5; 50 e 500 µg/mL. Como controles, as células foram incubadas com meio RPMI (suplementado com soro bovino fetal e L-glutamina acrescido de gentamicina) ou com 100 µL de uma solução de Tween 3%, diluído em salina estéril. Após 20 h de incubação em estufa de CO<sub>2</sub>, as células foram acrescidas de uma solução de 5 mg/mL de MTT (metil tiazoil tetrazólico), diluído em PBS (22,5 µL/poço) e incubadas em estufa de atmosfera controlada por mais 4h. Após este período, a placa foi centrifugada a 2800 rpm por 2

min, o sobrenadante foi descartado, e as células receberam 150 µL de DMSO para solubilização dos cristais de formazan. A viabilidade celular foi determinada através da leitura ótica realizada em um leitor de microplaca na D.O. de 540 nm.

### **3.12.5.2 Avaliação da produção do óxido nítrico**

Células peritoniais, obtidas como descrito anteriormente, foram plaqueadas na densidade de  $2,5 \times 10^5$  células/poço, numa placa de 96 poços; e levadas à estufa de atmosfera controlada (5% CO<sub>2</sub> a 37°C) por 30 min. Em seguida, o sobrenadante foi descartado, e as células aderentes foram acrescidas de meio rico em interferon (meio condicionado), lipolissacarídeo LPS (30 ng/mL), fração volátil ou o β-cariofileno nas concentrações não citotóxicas (0,5, 5 e 50 µg/mL; e 0,5, 5, 50 e 500 µg/mL, respectivamente). Como controle negativo, as células receberam somente meio completo. As células foram colocadas na estufa contendo 5% CO<sub>2</sub> a 37°C e após 24 horas, a placa foi centrifugada a 2800 rpm durante 2 minutos, sendo 100 µL do sobrenadante recolhidos e transferidos para outra placa de 96 poços. Para dosagem do nitrito foram adicionados iguais volumes do reagente de Griess, permitindo a revelação da reação através de um leitor de microplaca, utilizando filtro de 540 nm.

### **3.12.6 Análise Estatística**

Para os experimentos *in vivo* a significância estatística utilizada foi de  $P < 0,05$ . Os dados foram analisados por ANOVA seguidos pelo teste New-Mankeeu's Student e os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM).

# ***Resultados e Discussão***

---

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Identificação química dos componentes da oleorresina de copaíba

O perfil químico da oleorresina de copaíba está representada na Figura 4, cuja análise mostra duas regiões distintas, uma composta por sesquiterpenos e outra por diterpenos, representando 75% e 25% respectivamente. A região sesquiterpênica foi composta predominantemente pelo  $\beta$ -cariofileno (51%), seguido do  $\alpha$ -humuleno (8,52%), enquanto na região diterpênica predomina o ácido copálico (4,69%), o ácido agalático (3,32%), o ácido 11-hidroxicopálico (4,8%) e o 11-acetoxicopálico (5,23%). A composição completa e a contribuição relativa de cada um dos constituintes da oleorresina é apresentada na Tabela 1.

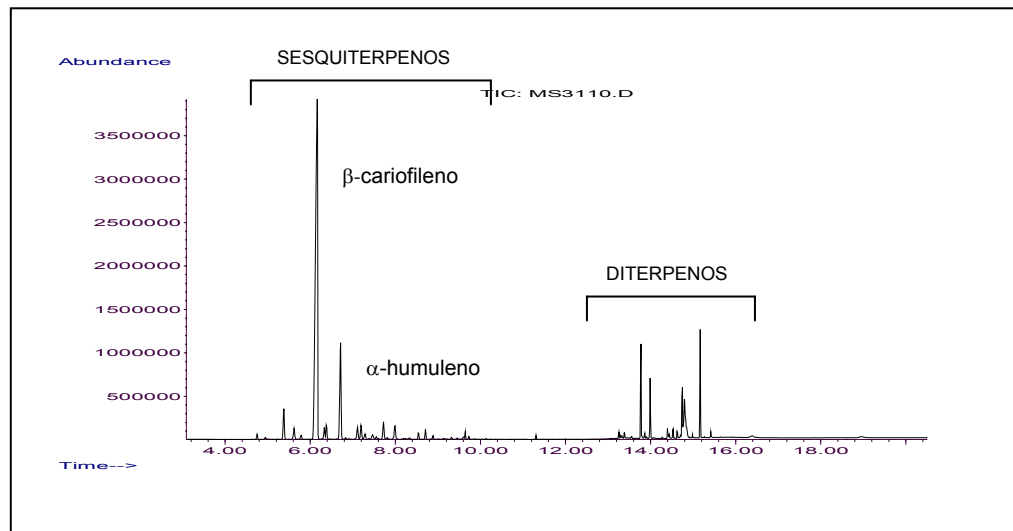


Figura 4. Perfil cromatográfico da oleorresina de copaíba.



## 4.2. Obtenção da fração volátil de copaíba

O rendimento médio do processo de obtenção da fração volátil do óleo de copaíba por arraste a vapor, seguida de destilação simples, foi de 14,5% em relação à massa inicial, na qual o teor relativo de sesquiterpenos representou 99,5%.

## 4.3. Identificação química dos componentes da fração volátil de copaíba

O perfil cromatográfico da fração volátil é apresentado na Figura 5 e os componentes caracterizados após análise espectrométrica foram listados na Tabela 1. A fração volátil mostrou ser rica em hidrocarbonetos (97,5%), sendo o  $\beta$ -cariofileno e o  $\alpha$ -humuleno seus componentes majoritários (70,0 e 8,74%, respectivamente). Vale ressaltar que o  $\alpha$ -humuleno é um isômero estrutural do  $\beta$ -cariofileno, conhecido também por  $\alpha$ -cariofileno, o que demonstra prevalência do esqueleto cariofilênico na fração. O óxido e o álcool de cariofileno foram os únicos compostos oxigenados presentes na fração, somando 1,97%. Este alto percentual de  $\beta$ -cariofileno corroboram os resultados obtidos por Gramosa e Silveira (2005) que avaliando os constituintes voláteis de frutos, casca dos frutos, folhas, raiz, caule e oleorresina de *Copaiba langsdorfii*, demonstraram que a oleorresina possui o maior percentual de  $\beta$ -cariofileno (53%).

Na Figura 6 estão apresentadas as estruturas químicas dos constituintes presentes na fração volátil.

**Tabela 1** - Compostos caracterizados na oleorresina e na fração volátil de copaíba por espectrometria de massas.

CONSTITUINTES	TEMPO DE RETENÇÃO	ÍNDICE DE KOVATZ	% RELATIVO NA OLEORRESINA	% RELATIVO NA FRAÇÃO VOLÁTIL
$\lambda$ -elemeno	4,76	1332	0,38	0,96
$\alpha$ -cubebeno	4,95	1334	0,22	0,85
$\alpha$ -copaeno	5,36	1360	2,43	3,7
$\beta$ -elemeno	5,63	1374	1,01	1,53
Cypereno	5,79	1384	0,37	0,92
<b><i>trans</i>-cariofileno (<math>\beta</math>-cariofileno)</b>	<b>6,16</b>	<b>1405</b>	<b>51,02</b>	<b>70,01</b>
$\delta$ -elemeno	6,33	14014	0,92	1,13
$\alpha$ -bergamoteno ( <i>trans</i> )	6,39	1417	1,07	1,6
$\alpha$ -humuleno	6,69	1435	8,52	8,74
Aromadendreno	6,83	1440	0,15	Traços
$\alpha$ -amorfenol	7,08	1455	1,13	1,34
germacreno D	7,20	1460	1,19	1,26
$\beta$ -selineno	7,29	1466	0,56	0,89
$\alpha$ -selineno	7,47	1475	0,76	1,00
$\alpha$ -muuroleno	7,55	1479	0,23	Traços
$\beta$ -bisaboleno	7,72	1487	1,46	1,41
$\lambda$ -cadineno	7,96	1502	1,38	1,28
germacreno B	8,55	1539	0,48	0,88
cariofileno álcool	8,71	1550	0,63	0,73
óxido de cariofileno	8,86	1562	0,31	1,24
$\alpha$ -cadinol	9,60	1615	0,15	
epi- $\alpha$ -muurulol	9,65	1619	0,42	
$\lambda$ -cadinol	9,74	1628	0,22	
não identificado	13,25	2187	0,83	
não identificado	13,39	2216	0,47	
não identificado	13,56	2235	0,28	
copalato de metila	13,77	2306	4,69	
não identificado	13,86	2327	0,32	
danielato de metila	13,99	2354	2,62	
pinifolato de dimetila	14,41	2455	0,75	
não identificado	14,53	2487	0,59	
não identificado	14,63	2512	0,37	
agalato de dimetila	14,75	2546	3,32	
11- hidroxicopalato de metila	14,80	2556	4,80	
11- acetoxicopalato de metila	15,16	2647	5,23	
TOTAL			<b>99,28</b>	<b>99,47</b>
SESQUITERPENOS			<b>75,01</b>	<b>99,47</b>
DITERPENOS			<b>24,27</b>	

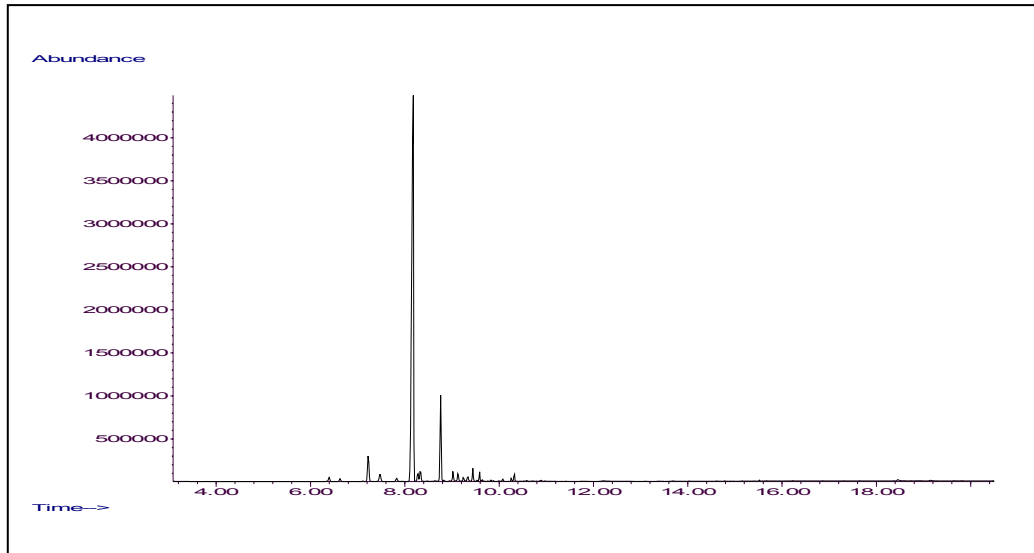


Figura 5. Perfil cromatográfico da fração volátil obtida por extração por arraste a vapor da oleorresina de copaíba.

#### 4.4. Análise da densidade e do índice de refração da fração volátil

A fração volátil da oleorresina de copaíba apresentou densidade de 0,8984 e índice de refração de 1,5555. O valor de densidade encontrado está dentro da faixa descrita na literatura para a oleorresina (FOOD CHEMICAL CODEX, 1981). Entretanto o índice de refração encontrado está um pouco acima da faixa descrita, podendo ser atribuído ao fato de a fração volátil conter somente sesquiterpenos, o que pode alterar este parâmetro.

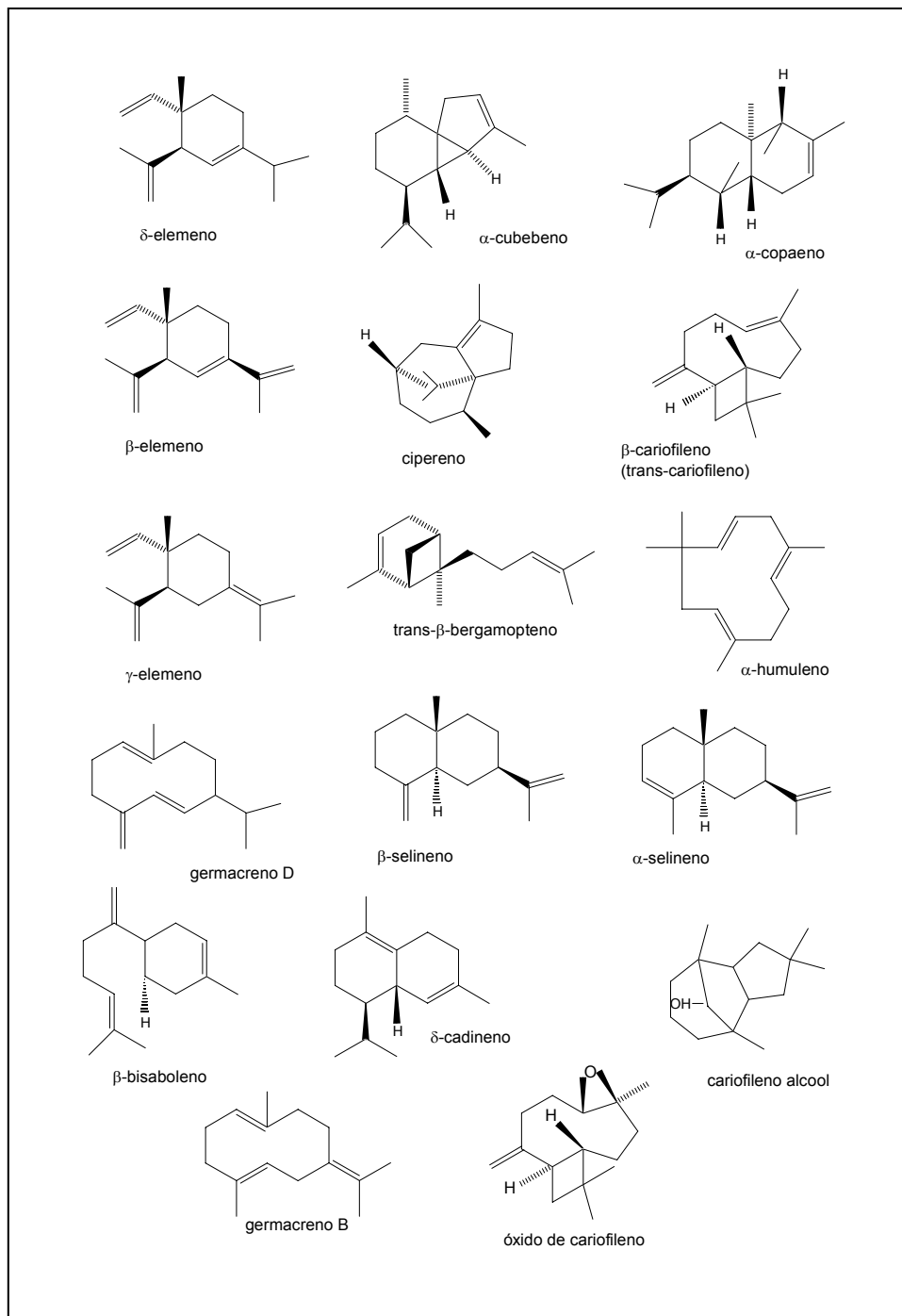


Figura 6. Representação das estruturas químicas dos sesquiterpênos da fração volátil.

#### 4.5. Análise quantitativa e padronização da fração volátil da oleorresina de copaíba

Os teores de  $\beta$ -cariofileno e de óxido de cariofileno na fração volátil foram de 74,9% e 0,44%, respectivamente. As curvas analíticas empregadas para a quantificação de ambos compostos na fração volátil estão apresentadas na Figura 7.

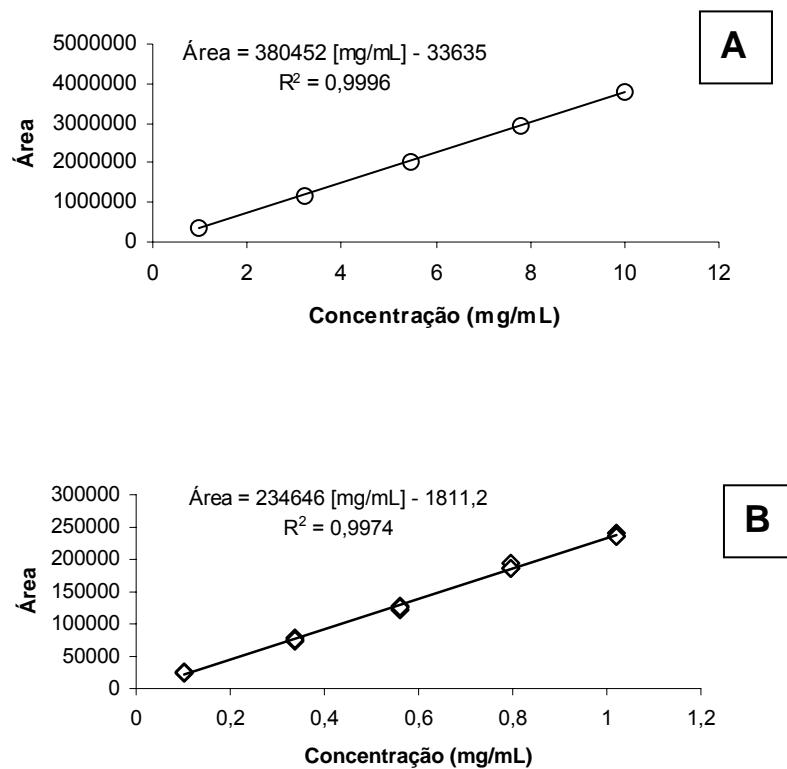


Figura 7. Curva analítica do  $\beta$ -cariofileno (A) e do óxido de cariofileno (B) obtidas por CGAR-DIC.

#### 4.6. Eficiência do processo de microencapsulação

O processo de microencapsulação apresentou um rendimento médio nos três lotes de 64,4 % (p/p), que para um processo piloto é considerado bom, em função do teor de sólidos presente na dispersão inicial (MASTERS, 1985).

As microcápsulas contendo 10, 20 e 30% de fração volátil apresentaram teores de umidade de 5,97%, 6,07% e 5,75%, respectivamente, mostrando que não houve variação significativa entre as amostras e apresentando valores percentuais de umidade dentro da faixa aceitável considerando o equipamento utilizado (MASTERS, 1985).

##### 4.6.1. Quantificação do teor de fração volátil total e na superfície das microcápsulas

O teor total da fração volátil recuperada, após extração por arraste a vapor, em amostras dos três lotes está representado na Figura 8. A recuperação total de fração volátil oscilou entre 95 e 99% da quantidade teórica, demonstrando que as condições do processo, especialmente a atomização e secagem em *spray dryer* foram eficientes na encapsulação e retenção da fração volátil. A quantidade da fração volátil na superfície da microcápsula foi de 0,003%, 0,040%, 0,446%, nas amostras de 10, 20 e 30%, respectivamente. A concentração de óleo na superfície aumentou proporcionalmente à concentração de fração volátil na dispersão, sendo entretanto, muito pequena em relação à massa total. Este fato foi confirmado mas imagens obtidas por microscopia confocal a laser (Figura 12). Este parâmetro é utilizado na indústria como um indicativo para o estudo de

estabilidade (*shelf life*) (Reneccius et al., 1995), uma vez que é esperado que o resíduo externo seja primeiramente oxidado.

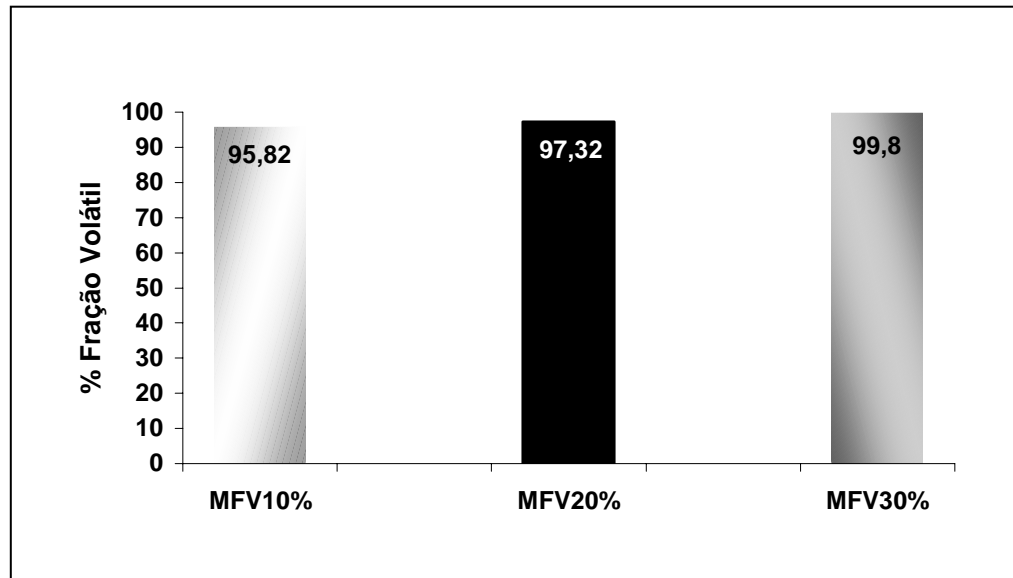


Figura 8. Teor de óleo total nas amostras de microcápsulas com a fração volátil (MFV) nas concentrações 10%, 20 e 30%.

#### 4.7. Determinação do tamanho de partícula

As microcápsulas contendo a fração volátil, independentemente de sua concentração, apresentaram distribuição unimodal, com o tamanho de partícula variando de 1 a 25  $\mu\text{m}$ , com maior freqüência de 1 a 8  $\mu\text{m}$  (Figura 9). As microcápsulas com 10 e 20% de fração volátil apresentaram uma distribuição muito semelhante, com percentual de freqüência na faixa de 1 a 8  $\mu\text{m}$ , enquanto que as microcápsulas com 30% de fração volátil mostraram maior

homogeneia na distribuição, com maior freqüência na faixa de diâmetro de 6 a 8  $\mu\text{m}$ .

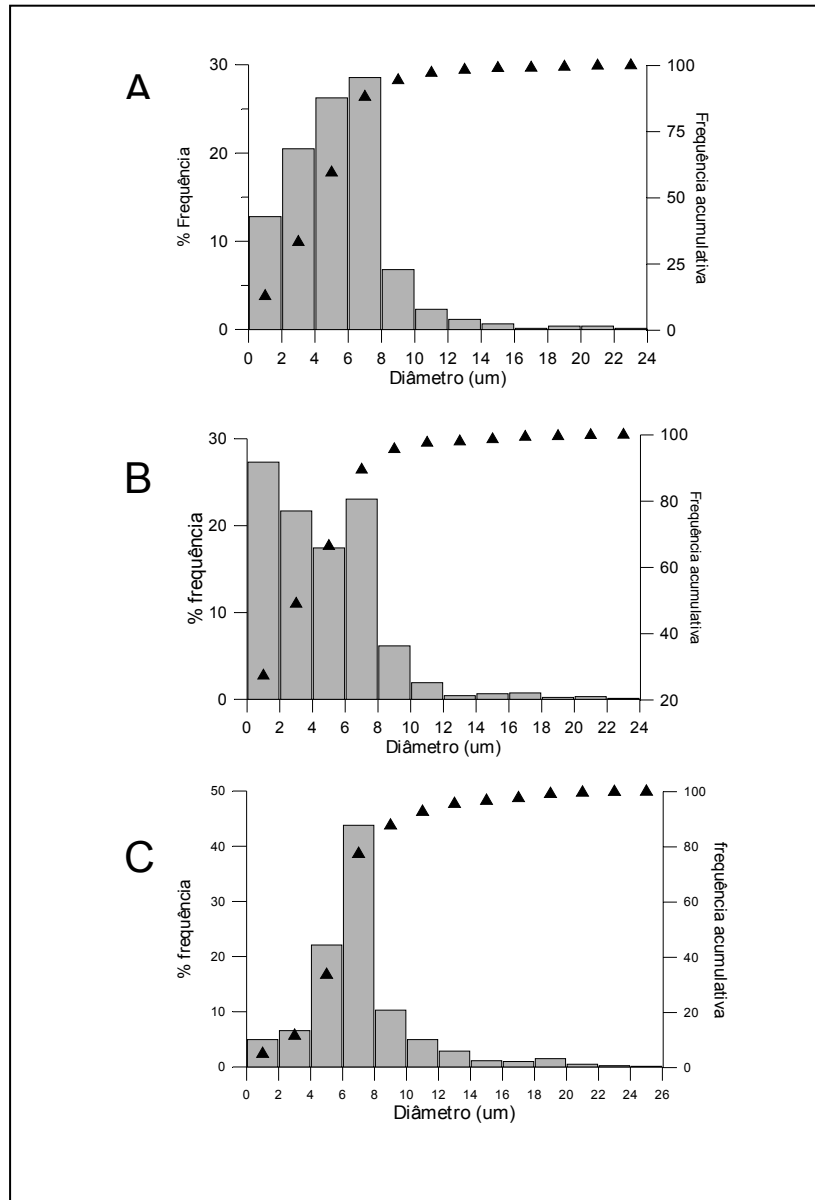


Figura 9. Curva de distribuição do tamanho de partícula das microcápsulas contendo: **A.** 10% da fração volátil; **B.** 20% da fração volátil; **C.** 30% da fração volátil da oleorresina de copaíba.



#### 4.8. Morfologia das microcápsulas

A morfologia externa das microcápsulas está apresentada na Figura 10, onde podemos verificar que, independentemente da concentração de fração volátil, predomina a forma esférica, com paredes lisas e íntegras, sem aparente porosidade e de tamanho variado, conforme mostrado na distribuição do tamanho das partículas no item anterior. A grande maioria das micropartículas apresentou muitas cavidades (depressões) na superfície, as quais são características das microcápsulas preparadas com goma arábica (ROSENBERG; TALMON; KOPLEMAN, 1988). Este tipo de estrutura pode ser atribuído à forte contração (encolhimento) das gotículas durante o primeiro estágio do processo de secagem (RÉ, 1998).

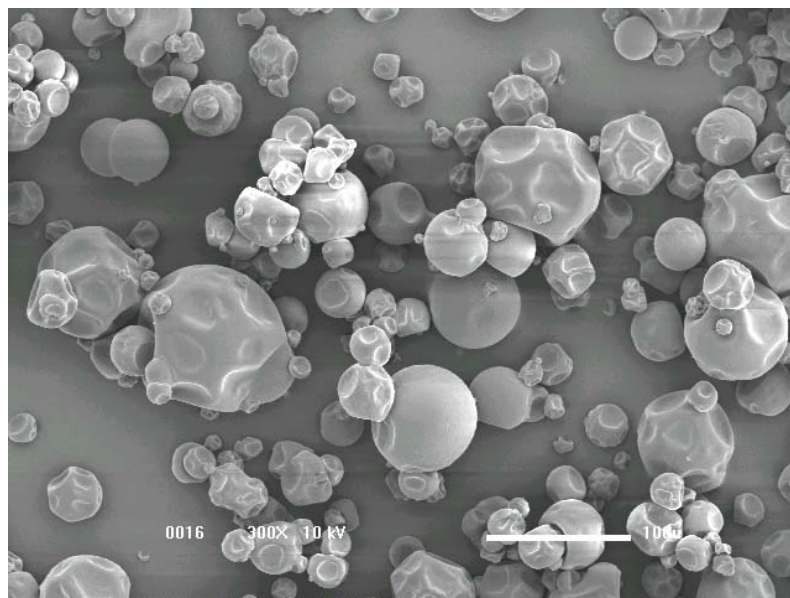


Figura 10. Fotomicrografia panorâmica obtida por microscopia eletrônica de varredura (MEV) de microcápsulas de goma arábica-fração volátil de copaíba 10%. (300x 10 KV).

Para visualizar as características de parede e seu interior, as microcápsulas foram fragmentadas por compressão mecânica, antes de serem preparadas para a captura de imagem. As imagens (Figura 11), mostraram que estas apresentam um centro (núcleo) vazio onde ficou aprisionada a fração volátil, ou seja um sistema microencapsulado do tipo reservatório. A microcápsula vazia (inerte) (Figura 11A) mostra uma parede lisa e com espessura homogênea, enquanto que as microcápsulas contendo a fração volátil mostraram uma maior variação na espessura e também apresentaram pequenos vacúolos, sugerindo que gotículas da fração volátil foram retidas na parede (Figura 11B e 11C). A frequência dos vacúolos é maior nas preparações com maior concentração de fração volátil. Este tipo de estrutura de parede interna é típico de microcápsulas obtidas a partir de compostos emulsionáveis, como a goma arábica (RÉ, 1998).

A formação de um núcleo vazio deve-se a expansão das partículas (microcápsula) durante no estágio final do processo de secagem e têm sido observados em pós secos por *spray drying* (EL-SAYED; WALLACK; KING, 1990a,b).

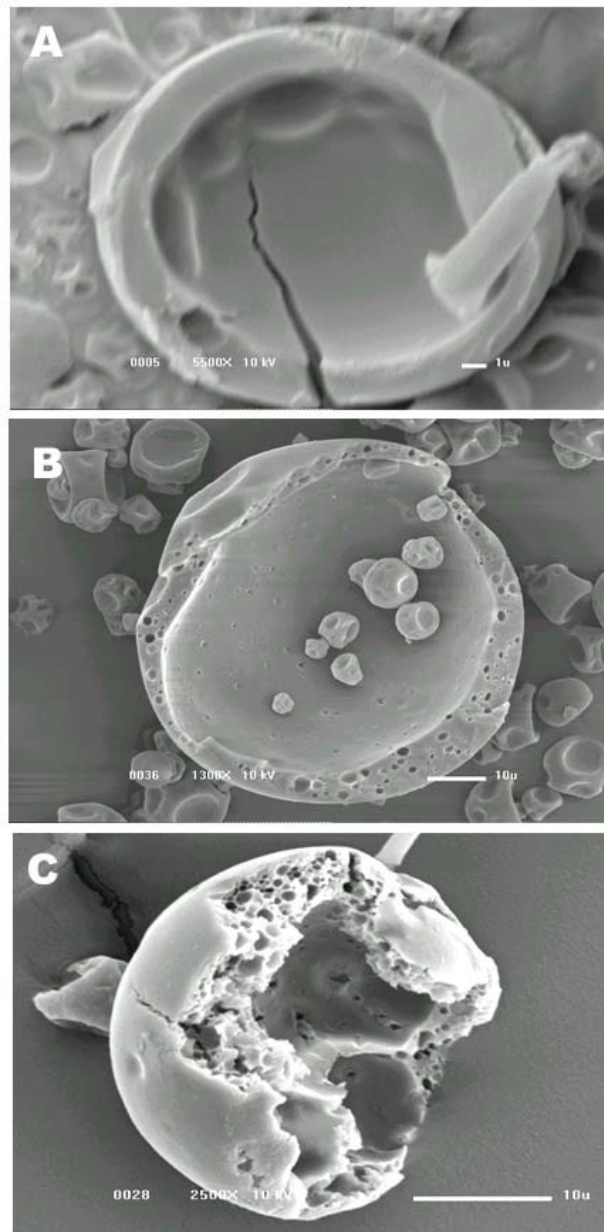


Figura 11. Fotomicrografia obtida por MEV de cortes de microcápsulas de goma arábica-fração volátil de copaíba 10%. **A.** microcápsula vazia; **B.** microcrocápsula-fração volátil 10% (1500x 10 KV) ; **C.** microcrocápsula-fração volátil 30% (2500x 10KV).

Para a captação das imagens de cortes adquiridas por microscopia confocal a laser (Figura 12), o material de parede, goma arábica, foi previamente corado com FITC (coloração verde) e a fração volátil com vermelho Nilo (coloração vermelha). Na Figura 12A podemos verificar que a coloração verde é predominante na superfície da microcápsula, enquanto que a coloração vermelha predomina no núcleo da partícula (Figura 12B). Foram observadas também a presença de pequenos pontos com coloração vermelha na parede, os quais foram considerados como sendo, gotículas de óleo (imagens não mostradas), reforçando a hipótese de que os vacúolos observados nas imagens de MEV, correspondem à presença de gotas de óleo nas paredes. A Figura 12C é uma sobreposição das duas primeiras imagens mostrando que realmente o polímero circunda e aprisiona a gotícula de óleo.

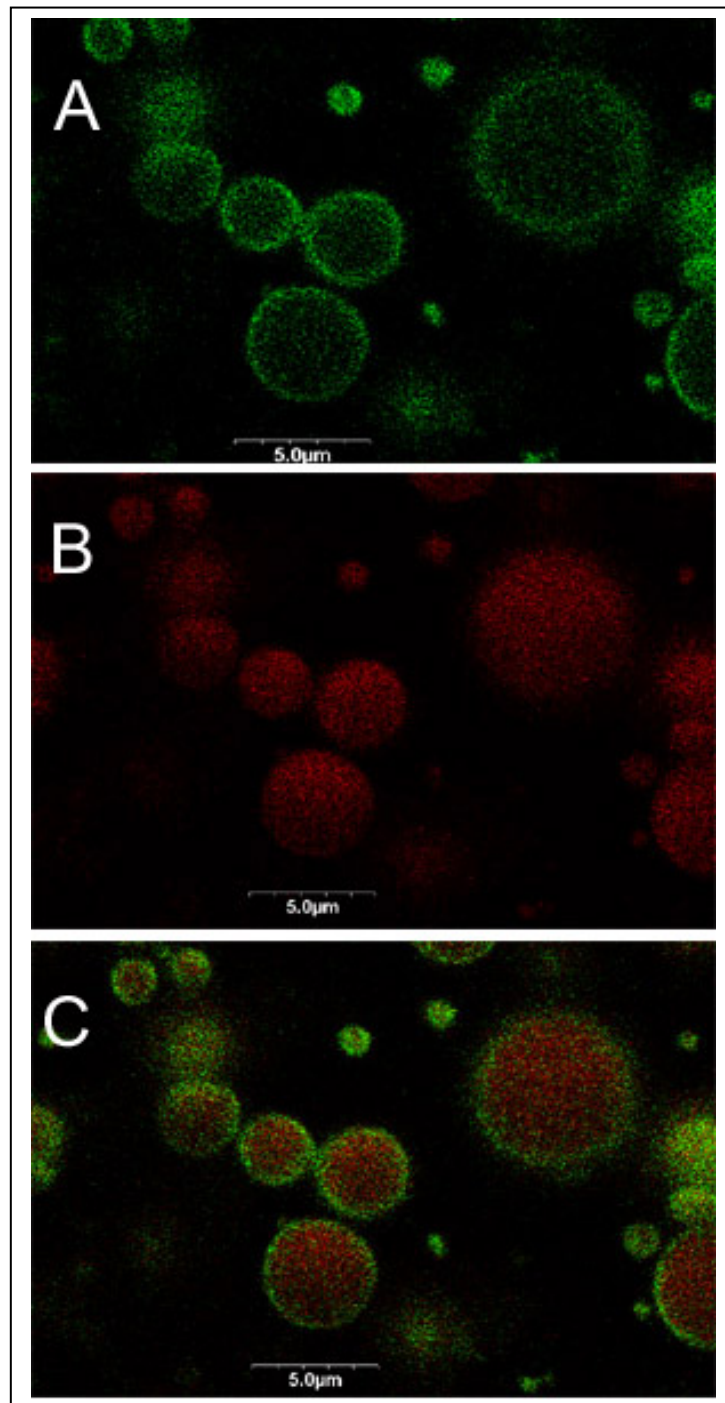


Figura 12. Imagens de corte obtidos por microscopia confocal a laser de microcápsulas de goma arábica contendo a fração de volátil da oleoressina de copaíba. **A.** microcápsula corada com FITC; **B.** microcápsula corada com vermelho Nilo; **C.** Sobreposição das imagens A e B.

## 4.8. Estudo de estabilidade

### 4.8.1. Microcápsulas

A quantificação do  $\beta$ -cariofileno e do óxido de cariofileno nas amostras de microcápsulas foi realizada utilizando como padrão interno o nonadecanato de metila e como padrões externos o  $\beta$ -cariofileno e o óxido de cariofileno. As curvas analíticas do  $\beta$ -cariofileno e do óxido de cariofileno estão apresentadas na Figura 13. Em se tratando de compostos voláteis e para minimizar possíveis erros na quantificação, a cada análise foi injetado um padrão com concentração equivalente ao ponto central da curva analítica.

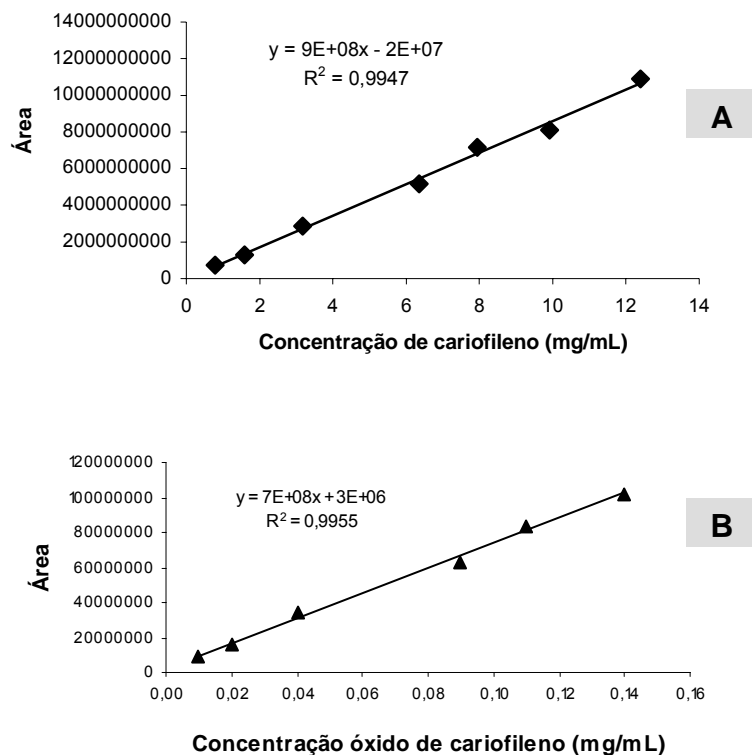
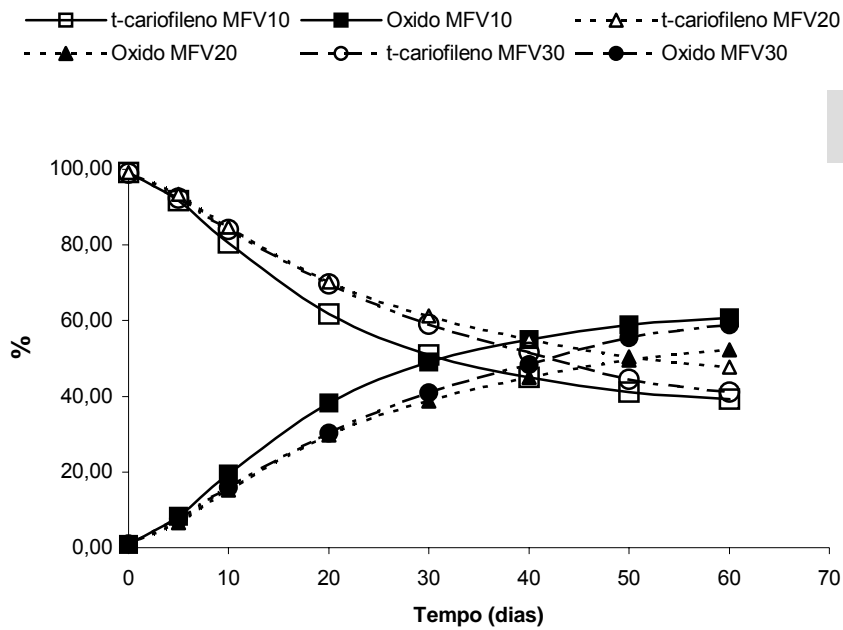


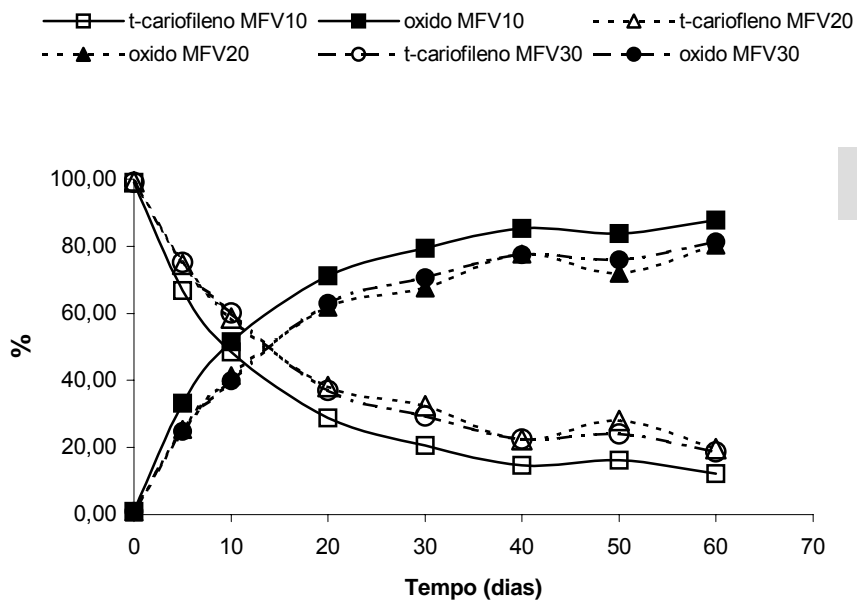
Figura 13. Curva analítica do  $\beta$ -cariofileno e do óxido de cariofileno para quantificação das microcápsulas.

Os resultados do teste de estabilidade (temperatura de 25°C e 50% de UR), dos três lotes da fração volátil microencapsulada estão apresentados na Figura 14, onde foram considerados o  $\beta$ -cariofileno e seu principal composto de oxidação, o óxido de cariofileno. Na Figura 14A foi verificada uma redução marcante no teor de  $\beta$ -cariofileno e a concomitante formação de seu óxido correspondente. A redução no teor de  $\beta$ -cariofileno é mais acentuada nos primeiros 30 dias, aproximadamente de 40 a 50% do teor inicial. Já nos últimos trinta dias, o teor de perda foi bem menor, em torno de 11% nas amostras. Por outro lado, o teor de óxido de cariofileno aumentou gradualmente chegando a faixa percentual de 52 a 60,7% ao final dos 60 dias de estudo.

Na temperatura de 40°C e mesma condição de umidade (Figura 14B), o declínio no teor de  $\beta$ -cariofileno foi mais intenso, atingindo um teor entre 28,8 e 38% na microcápsula, nos primeiros 20 dias. Ao final dos 60 dias de estudo, o teor remanescente de  $\beta$ -cariofileno na microcápsula variou entre 19 a 12%, conforme a amostra. Por outro lado, ocorreu um aumento vertiginoso na formação de óxido de cariofileno, atingindo a faixa de 80,0 a 87,7%, dependendo da amostra, ao final de 60 dias.



**A**



**B**

Figura 14. Efeito do processo de oxidação nas microcápsulas contendo a fração volátil (60 dias). Formação de óxido de cariofileno e a partir de  $\beta$ -cariofileno. **A.** temperatura 25°C e 50% de UR; **B.** temperatura 40°C e 50% de UR.



Neste estudo o  $\beta$ -cariofileno, como principal constituinte da fração volátil foi utilizado como indicador da estabilidade e seu óxido correspondente como o principal composto de sua oxidação. Porém, outros compostos podem ser formados, como demonstrado pela análise por CGEM, a partir da fração volátil remanescente nas microcápsulas, após os 60 dias de estudo (Tabela 2). Nesta tabela pode-se observar que, nos lotes submetidos à temperatura de 25°C, ocorreu um aumento percentual de sesquiterpenos oxigenados, e decréscimo dos compostos não oxigenados (hidrocarbonetos).

Esta análise nos permitiu confirmar que como os estudos de estabilidade indicavam (Figura 14), nem todo  $\beta$ -cariofileno se transformou em óxido, e sim que o processo de oxidação é bem mais complexo, gerando outros compostos oxigenados. Entre estes compostos oxigenados, o humuleno epóxido e o 14-hidroxi-9-epi-cariofileno são os mais abundantes. Com o aumento da temperatura foi observado um maior percentual de 14-hidroxi-9-epi-cariofileno, possivelmente devido à hidroxilação do óxido de cariofileno, por rearranjo alílico, catalisado pelo aumento da temperatura. Estes resultados evidenciam que no caso do núcleo cariofilênico, em condições mais brandas de temperatura os óxidos são primeiramente formados, necessitando de condições mais drásticas para formação de seus hidróxidos correspondentes. Na Figura 16 estão representadas as estruturas químicas dos principais compostos oxigenados formados, podendo-se observar que os compostos de estrutura de 11 membros são os preferencialmente formados, somando um total de 60,8%, 64,1% e 73,9% (percentuais relativos), nas amostras com 10, 20 e 30% de fração volátil, respectivamente.

É interessante observar que o teor de oxigenados foi maior na microcápsula com 10% de fração volátil, que nas outras duas amostras, sendo esta diferença mais acentuada na temperatura de 25°C. Atribuímos esta observação à maior incorporação de ar na dispersão com 10% de fração, por ser a mais viscosa (dados não mostrados).

Ao final dos 60 dias as amostras de microcápsulas foram submetidas à nova extração por arraste a vapor, com intuito de avaliar a perda da fração volátil por evaporação (Figura 15). As microcápsulas submetidas à temperatura de 25 °C apresentaram uma perda percentual da fração volátil de 30 a 40%. Na maior temperatura, a perda variou de 30 a 50%, sendo mais acentuada na microcápsula com 30% de fração volátil.

As condições de temperatura e umidade empregadas na avaliação de estabilidade favoreceram a oxidação de todos os hidrocarbonetos sesquiterpênicos, sendo mais expressiva no núcleo cariofilênico, por se tratar do mais representativo na fração. Por outro lado, houve também perda de massa durante este período, a qual pode ser atribuída principalmente aos hidrocarbonetos, entre outros, o próprio  $\beta$ -cariofileno. A somatória destes eventos impossibilitou a análise do balanço de perda de massa total e específica do  $\beta$ -cariofileno e seus compostos oxigenados.

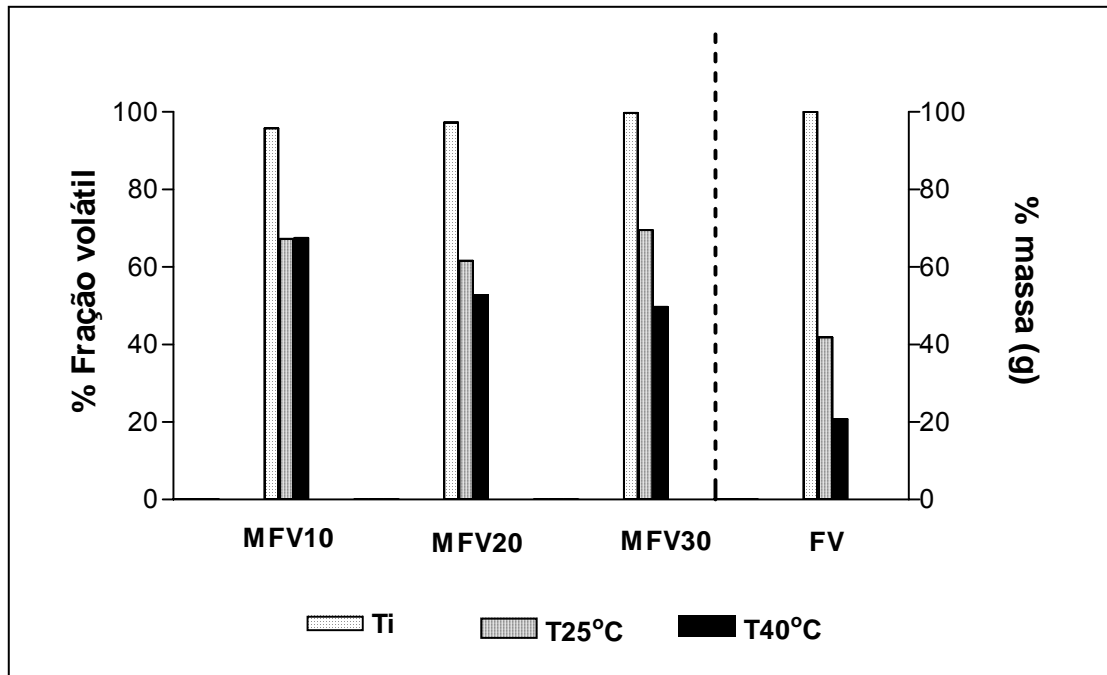


Figura 15. Representação gráfica do percentual de fração volátil retida nas microcápsulas (A). Em (B) o percentual residual de massa de fração volátil livre, após dias nas duas temperaturas e m ambiente de umidade relativa de 50%.

**Tabela 2** - Percentual de contribuição relativo dos constituintes identificados na fração volátil da microencapsulada ao final do estudo de estabilidade (60 dias).

CONSTITUINTES	% CONTRIBUIÇÃO RELATIVA						
	To	25 °C – 50% UR			40 °C – 50% UR		
		MFV10	MFV20	MFV30	MFV10	MFV20	MFV30
δ-elemeno	<b>0,96</b>		0,19				
α-cubebeno	<b>0,85</b>		0,1				
α-copaeno	<b>3,7</b>	1,28	1,84	2,01	0,48	0,45	0,26
β-elemeno	<b>1,53</b>	1,25	1,47	1,47	1,05	1,27	0,8
cypereno	<b>0,92</b>	0,32	0,42	0,42	0,2	0,18	0,1
β -cariofileno (trans)	<b>70,01</b>	10,3	18,09	17,91	2,18	2,19	1,5
γ-elemeno	<b>1,13</b>	0,21	0,38	0,37	traços	traços	traços
β-bergamopteno (trans)	<b>1,6</b>	0,48	0,66	0,74	traços	traços	traços
α-humuleno	<b>8,74</b>	1,62	2,92	2,83	0,32	0,28	0,22
α-amorpheno	<b>1,34</b>	0,65	0,81	0,84	0,31	0,34	0,25
germacreno D	<b>1,26</b>						
β-selineno	<b>0,89</b>	0,41	0,71	0,49	0,65	0,54	0,45
α-selineno	<b>1</b>						
α-muuroleno		Traços	0,27	traços	traços	traços	traços
β-bisaboleno	<b>1,41</b>	0,6	0,75	0,74	0,37	0,35	0,34
γ-cadineno		Traços	0,17	0,15	0,21	traços	0,17
cis-calameneno		Traços	0,1	traços	0,24	0,17	0,21
γ-bisaboleno(E)					0,22	traços	0,14
δ-cadineno	<b>1,28</b>	0,18	0,37	0,19	0,24	0,13	traços
germacreno B	<b>0,88</b>						
selina-3,7(11)dieno		Traços	0,15	traços	0,22	0,31	0,33
calacoreno		0,13	0,13	0,13	0,22	0,12	0,13
occidentalol		0,13	0,13	0,12	0,23	0,11	0,1
epi-longipinanol		5,24	4,92	5,2	6,91	6,73	6,35
longipinanol		0,18	0,22	0,21	0,68	0,49	0,47
cariofileno álcool	<b>0,73</b>	0,73	0,67	0,73		1,16	1,17
óxido de cariofileno	<b>1,24</b>	57,66	46,33	47,39	49,7	44,11	47,47
copaen-4-α-ol		0,94	0,45	traços	traços	traços	traços
álcool arteannuico			0,39	0,27	traços	traços	traços
guaiol					0,59	0,55	0,58
cedrol			0,33		0,72	0,63	0,64
humuleno epóxido II		6,65	5,54	6,76	4,89	4,71	4,64
eudesmol<10-epi-γ>							0,4
3 iso-thujopsanona		1,19	1,25	1,35	0,1		traços
muurulol<epi-α>					2,3	2,1	2,31
α-cadinol					0,35	0,27	0,28
α-muurulol		0,42	0,41	0,4			
dehidro-eudesmol		0,61	0,57	0,63	1,83	1,87	2,04
14-hidroxi-9-epi-cariofileno		3,48	2,89	3,23	13,67	13,24	13,62
óxido de bisabolona A (?)		0,78	0,74	0,87	1,77	1,77	1,33
germacrenona(?)		0,51	0,46	0,46	1,06	1,13	1,17
α-atlantona<E>		0,28	0,27	0,27	0,72	0,65	0,65

Continua

% CONTRIBUIÇÃO RELATIVA							
CONSTITUINTES	To	25 °C – 50% UR			40 °C – 50% UR		
		MFV10	MFV20	MFV30	MFV10	MFV20	MFV30
khusinol		0,5	0,5	0,24	0,51	0,72	traços
elemodiol<8- $\alpha$ -11>					1,23	0,73	1,17
aristolone			0,22	traços			
14-oxy- $\alpha$ -muuruleno		0,47	0,32	0,32	2,23	2,14	2,17
14-hidroxi- $\alpha$ -muuruleno		0,57	0,51	0,71	1,77	1,47	1,21
$\beta$ -bisabolenol		1,08	1	1,17	3,54	3,99	3,36
epi- $\alpha$ -bisabolol acetato		0,53	0,51	0,83	1,15	2,02	0,8
longifolol acetato<iso> (?)					0,65	0,53	0,46
lancelol acetato (?)					0,69	0,67	0,7
cedrane-diol <8S,14>		0,23	0,24	0,25	1,86	1,6	1,72
não identificado			1,5		0,29	0,21	0,23
<b>TOTAL</b>	<b>99,47</b>	<b>99,61</b>	<b>99,9</b>	<b>99,7</b>	<b>99,98</b>	<b>99,93</b>	<b>99,94</b>
<b>HIDROCARBONETOS</b>	97,5	17,43	29,53	28,29	6,91	6,33	4,9
<b>OXIGENADOS</b>	1,97	82,18	70,37	71,41	99,44	93,6	95,04

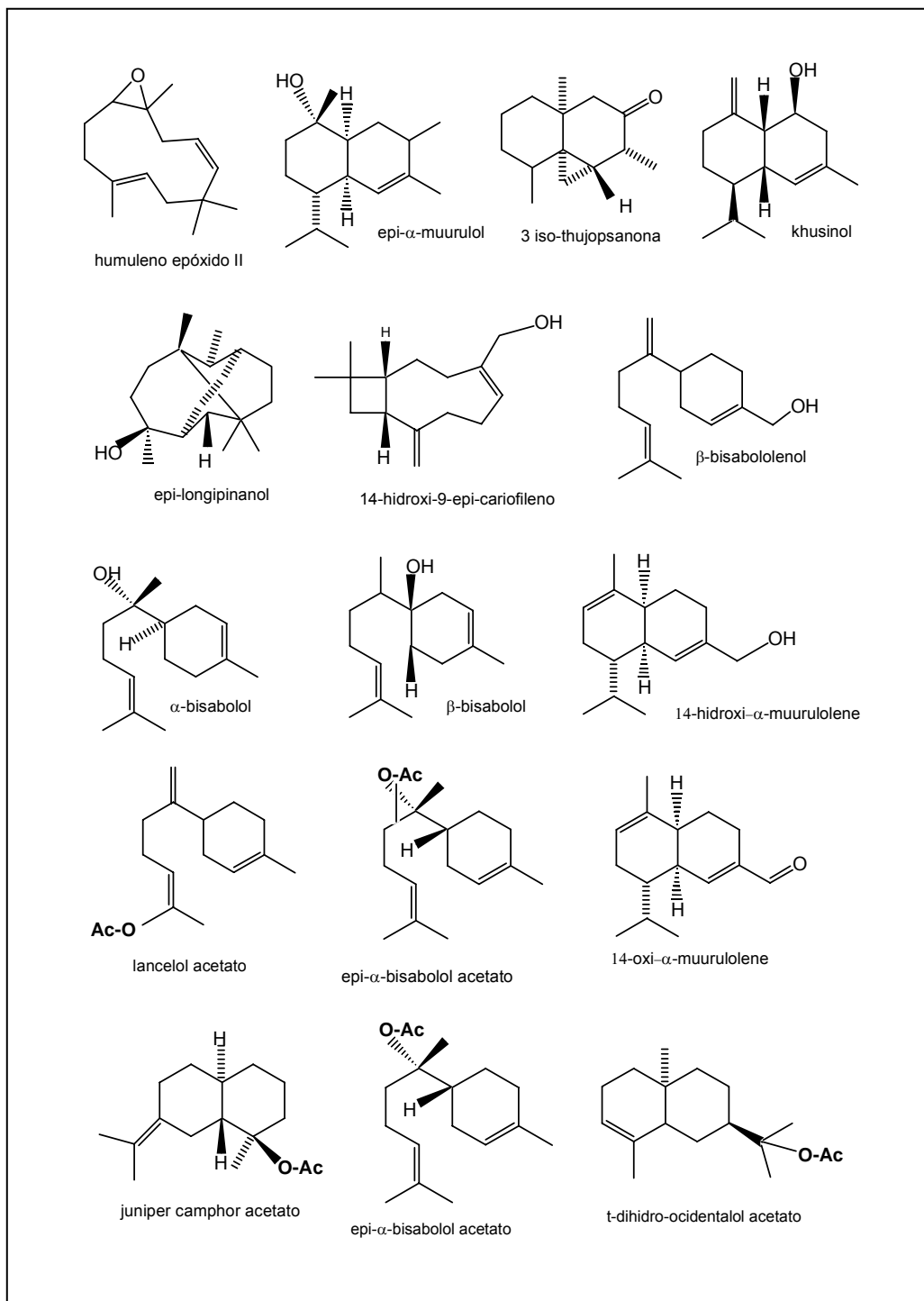


Figura 16. Representação das estruturas químicas dos principais constituintes oxigenados da fração volátil após 60 dias a 50% de UR e temperaturas de 25 °C e 40 °C.

A redução da concentração de  $\beta$ -cariofileno na microcápsula pode ser atribuída, portanto a dois eventos simultâneos: a evaporação deste sesquiterpeno e a sua transformação a óxido de cariofileno. A linearização da curva de redução, na temperatura de 25 °C mostrou que a tendência para a cinética de primeira ordem (Figura 17), indicando que a oxidação foi dependente da concentração de  $\beta$ -cariofileno na fração volátil, o que já era esperado. Já a 40 °C, os coeficientes de correlação ( $R^2$ ) estão fora do limite aceitável (em torno de 0,98), impedindo o estudo cinético. Entretanto, os dados na maior temperatura nos mostram que a velocidade de redução do  $\beta$ -cariofileno na fração volátil pode ser atribuída principalmente à velocidade de transformação deste sesquiterpeno à óxido, catalisada pela temperatura uma vez que devido ao seu alto ponto de ebulição (118-119 °C), não é esperado que a evaporação seja o parâmetro decisivo na sua redução.

A formação de óxido de cariofileno não responde a uma cinética de reação simples. Sua formação foi crescente até o vigésimo dia, a partir do qual houve uma estabilização da sua concentração, como pode ser observada na Figura 18. Esta estabilização não pode ser atribuída ao equilíbrio cariofileno/óxido, mas possivelmente a evaporação do óxido (ponto de ebulição 45-59 °C) e a transformação ao hidróxido correspondente, ou seja, o 14-hidroxi-9-epi-cariofileno.

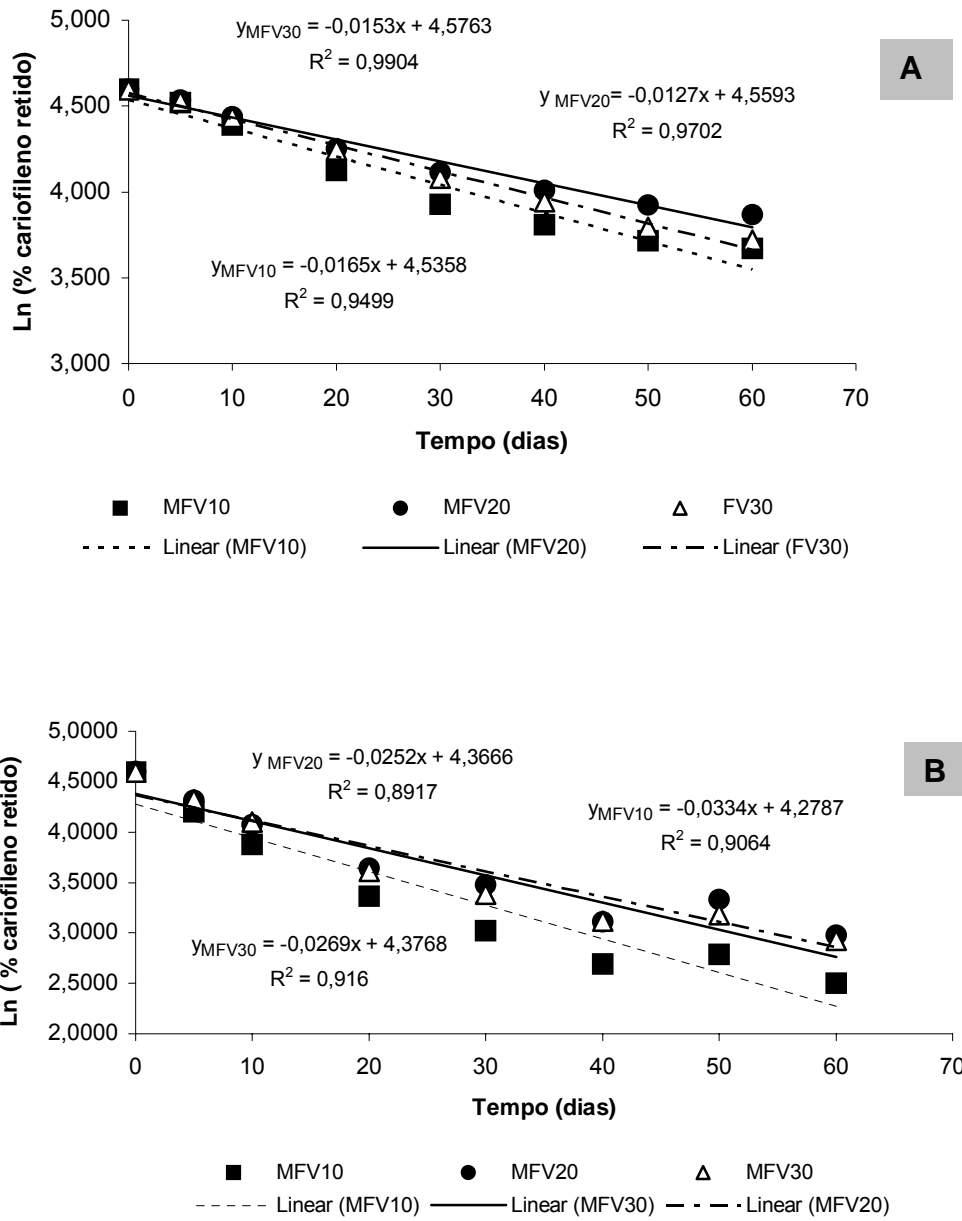


Figura 17. Representação gráfica da cinética de redução do  $\beta$ -cariofileno nas microcápsulas de fração volátil nas temperaturas de 25 °C (A) e 40°C (B).



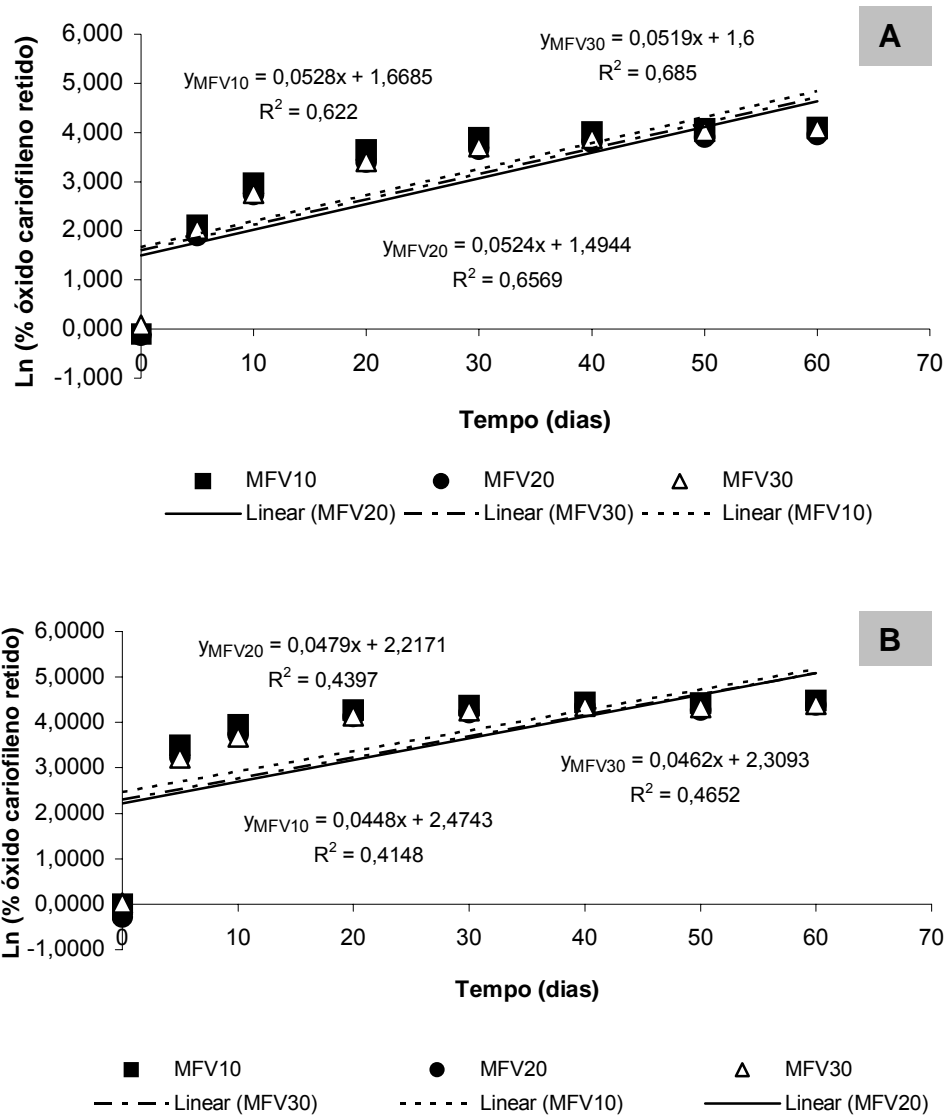


Figura 18. Representação gráfica da cinética de formação do óxido de cariofileno nas microcápsulas de fração volátil nas temperaturas de 25 °C (A) e 40 °C (B).

#### 4.8.2. Fração volátil

Para efeito de comparação a fração volátil livre foi submetida à mesma condição descrita no item 4.8.1. Entretanto, neste caso a variação de concentração de óxido de cariofileno variou muito entre o início e o final do estudo de estabilidade, sendo necessário à elaboração de 2 curvas analíticas em faixas de concentrações diferentes (0,10 a 0,81mg/mL e 1,01 a 10,10 mg/mL). As curvas de calibração estão apresentadas na Figura 19.

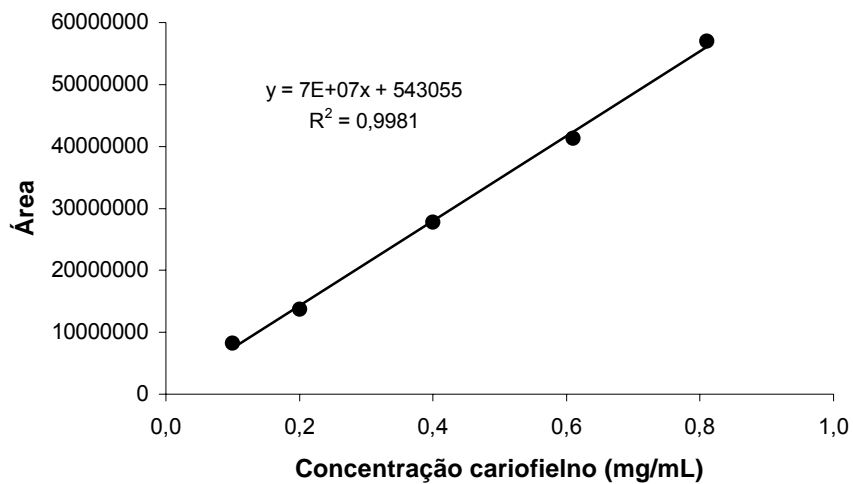


Figura 19. Curva analítica do  $\beta$ -cariofileno para quantificação da fração volátil.

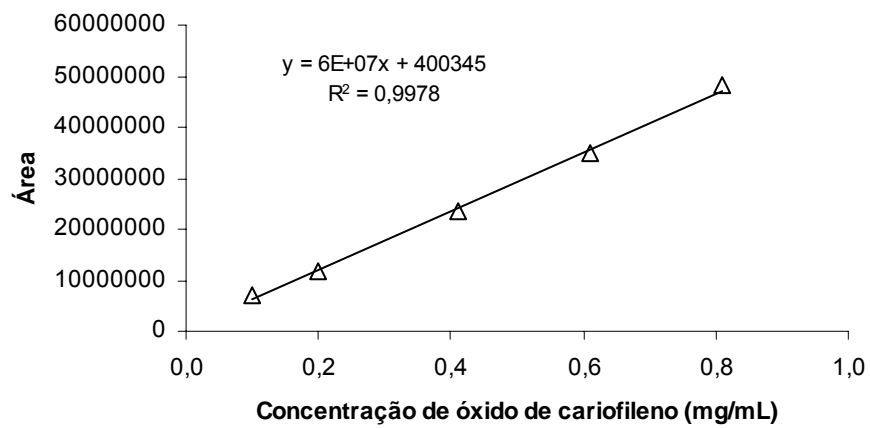
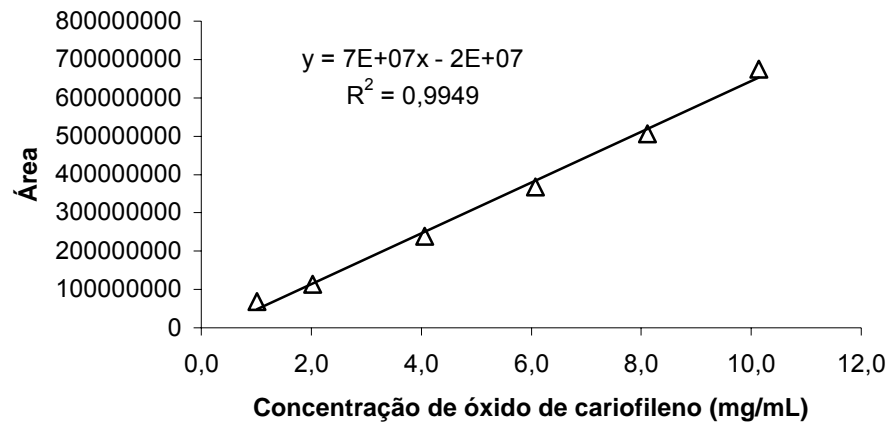


Figura 20. Curva analítica do óxido de cariofileno para quantificação da fração volátil.

A Figura 21 apresenta a variação percentual de  $\beta$ -cariofileno e óxido de cariofileno, na fração volátil livre submetida à temperatura (25 °C e 40 °C) e 50% UR por 60 dias. Pode-se observar uma diminuição vertiginosa no teor de  $\beta$ -cariofileno em ambas as temperaturas. A 25 °C, o teor de  $\beta$ -cariofileno remanescente na amostra foi de 11,32% aos 30 dias e de 1,93% ao final do estudo (60 dias). Concomitantemente ao declínio de  $\beta$ -cariofileno houve a formação do óxido de cariofileno, chegando ao máximo de 36% ao 40º dia e 32% ao final de 60 dias. Na Figura também é possível observar a perda de massa em cada de análise durante o estudo.

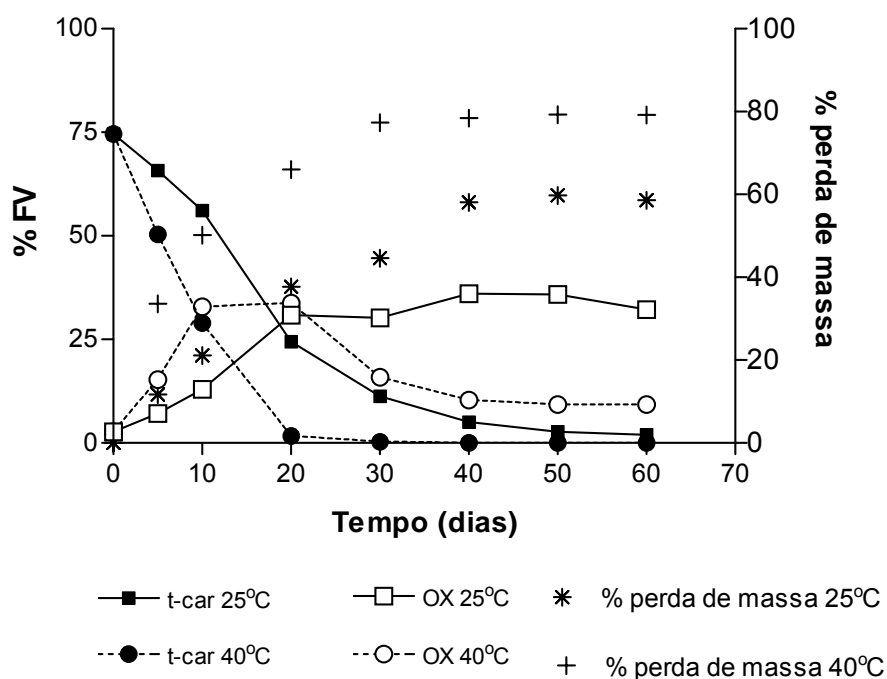


Figura 21. Efeito do processo de oxidação do  $\beta$ -cariofileno (t-car) a óxido de cariofileno (OX), na fração volátil (FV) na temperatura de 25 °C e 40 °C a 50% UR.

O mesmo perfil de oxidação foi observado para o  $\beta$ -cariofileno, na temperatura de 40 °C, entretanto com uma maior intensidade, haja vista que, no vigésimo dia o teor em  $\beta$ -cariofileno foi de 1,7%, enquanto que o teor de óxido foi de 33,7%, no mesmo período. Ao final do estudo somente 9,2% do óxido foi encontrado na amostra.

Este declínio nas concentrações de  $\beta$ -cariofileno e de óxido de cariofileno na fração volátil pode ser explicado em parte pela evaporação como mostrado na Figura 21, onde foi observada uma elevada perda de massa durante o estudo de estabilidade. O percentual de perda de massa foi de 58,1% e 79,2% para as temperaturas de 25 °C e 40 °C, respectivamente ao final de 60 dias. Por outro lado, o resultado da análise da fração volátil por CGEM (Tabela 3) mostrou que, durante o período de estudo (60 dias) houve formação de inúmeros compostos oxigenados. Na temperatura de 25 °C, ao vigésimo dia 48,6% dos compostos caracterizados eram oxigenados, chegando a 94% ao sexagésimo dia. A 40 °C ao final de 20 dias 94% dos compostos caracterizados eram oxigenados. O processo oxidativo da fração volátil também gerou a formação de derivados acetatos, sendo estes identificados em maior percentual na temperatura de 40 °C.

**Tabela 3** - Percentual de contribuição relativo dos constituintes identificados na fração volátil de copaíba ao durante o estudo de estabilidade por 60 dias.

Constituintes	% CONTRIBUIÇÃO RELATIVA				
	T <sub>0</sub>	25 °C – 50% UR		40 °C – 50% UR	
		T <sub>20</sub>	T <sub>60</sub>	T <sub>20</sub>	T <sub>60</sub>
δ-elemeno	<b>0,96</b>	0,16			
α-cubebeno	<b>0,85</b>	traços			
α-copaeno	<b>3,7</b>	2,03	traços		
β-elemeno	<b>1,53</b>	0,91	traços		
cypereno	<b>0,92</b>	0,25			
β-cariofileno (trans)	<b>70,01</b>	36,52	3,81	4,09	
γ-elemeno	<b>1,13</b>	0,53			
β-bergamopteno(trans)	<b>1,6</b>	1,08		traços	
α-humuleno	<b>8,74</b>	6,21	0,74	1,42	
α-amorpheno	<b>1,34</b>	0,98	traços	0,31	
germacreno D	<b>1,26</b>				
β-selineno	<b>0,89</b>	0,41	0,4	traços	
α-selineno	<b>1</b>	0,15			
α-muuroleno		0,16		traços	
β-bisaboleno	<b>1,41</b>	1,24		1,32	
δ-cadineno	<b>1,28</b>				
germacreno B	<b>0,88</b>	0,2			
selina-3,7(11)dieno		*			
muurolol (?)		2,74	3,56	4,6	2,08
cariofileno álcool	<b>0,73</b>	0,56	1,1	1,73	1,74
óxido de cariofileno	<b>1,24</b>	38,72	67,42	61,08	36,59
t-β-elemenona (?)		0,14			
cetona (?)		0,36	0,85	1,18	0,77
humuleno epóxido II		3,36	7	7,13	5,7
3 iso-thujopsanona		0,52	0,93	1,77	1,74
α-muurolol		0,3	0,6	1,27	1,22
7-epi-α-eudesmol		0,16	0,64	1,23	1,64
14-hidroxi-9-epi-cariofileno			0,34	0,98	1,15
khusinol				1,48	7,45
β-bisabolol (?)			1,13		4,09
α-bisabolol (?)		1,03	2,71	2,33	
iso-longifolol (?)			0,9	1,17	2,49
óxido de bisabolol A (?)			0,62		1,82
bisabolona (?)					1,28
14-hidroxi-alfa-muuroleno		0,21	2,95	2,49	5,76
t-dihidro-ocidentalol acetato(?)		0,15	1,96	1,84	4,18
eudesmol acetato (?)		0,36	1,22	1,36	3,71
epi-α- bisabolol acetato			0,39		2,82
juniper camphor acetato (?)					2,17
álcool não identificado (?)					2,6
lancelol acetato (?)					4,08

Constituintes	% CONTRIBUIÇÃO RELATIVA				
	25 °C – 50% UR			40 °C – 50% UR	
	T <sub>0</sub>	T <sub>20</sub>	T <sub>60</sub>	T <sub>20</sub>	T <sub>60</sub>
álcool não identificado					1,46
álcool não identificado					1,22
<b>TOTAL</b>	<b>99,47</b>	<b>99,44</b>	<b>99,27</b>	<b>98,78</b>	<b>97,76</b>
<b>HIDROCARBONETOS</b>	97,5	50,83	4,95	7,14	
<b>OXIGENADOS</b>	1,97	48,61	94,32	91,64	97,76

T<sub>0</sub> – tempo inicial ; T<sub>20</sub> - 20 dias na câmara climática ; T<sub>60</sub> - 60 dias na câmara climática  
 IK – Índice de Kovats

A análise da cinética de redução de  $\beta$ -cariofileno e a concomitante formação de óxido mostrou o mesmo comportamento observado na microcápsula contendo a fração volátil. Em ambas as temperaturas a redução de cariofileno na fração volátil tende a uma cinética de primeira ordem, enquanto a formação de óxido não responde a nenhum comportamento cinético (Figura 22).

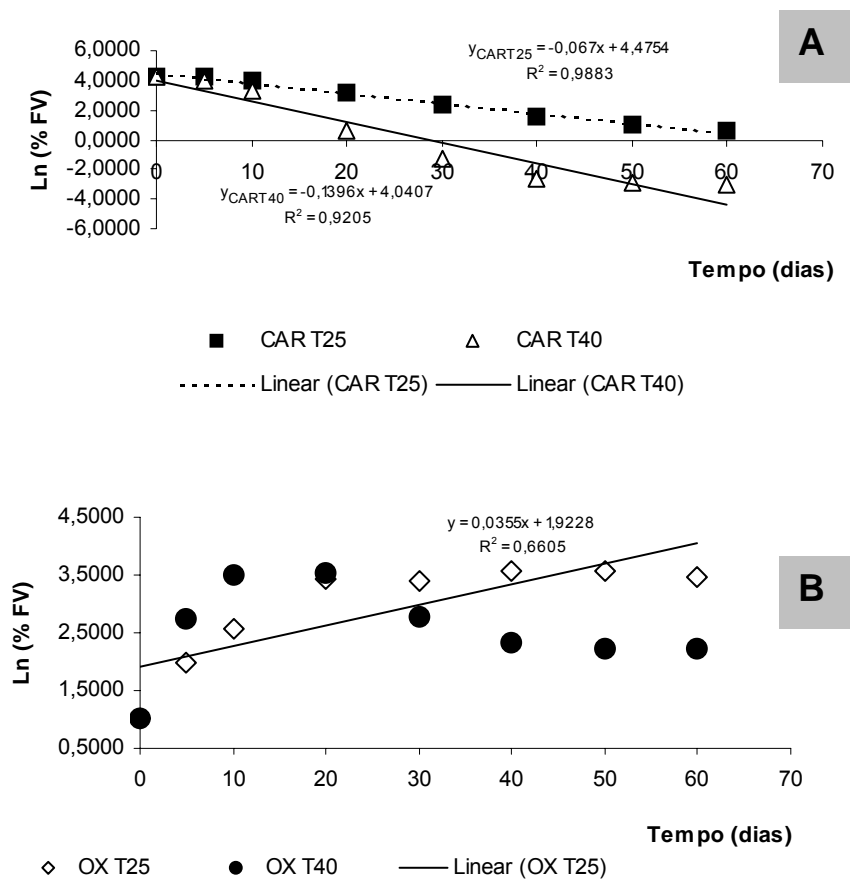


Figura 22. Representação gráfica da cinética de formação do óxido de cariofileno na fração volátil nas temperaturas de 25 °C (A) e 40 °C (B).



Nossos resultados demonstram que, componentes da fração volátil, são oxidáveis nas condições experimentais e que a temperatura tem papel decisivo. O processo de microencapsulação não evitou, porém minimizou a oxidação da volátil. Acredita-se que este processo também diminui a perda de massa, uma vez que após as condições de estresse, o óleo retido nas microcápsulas foi cerca de 30% maior que a perda de massa. Ainda que as amostras de microcápsulas não foram pesadas após os 60 dias de análises, o conteúdo de  $\beta$ -cariofileno presente nestas cápsulas foi cerca de 40% (temperatura de 25 °C) maior que o obtido na fração volátil, submetida a mesma condição.

A goma arábica tem sido o polímero de escolha para a encapsulação de compostos e misturas de caráter lipossolúvel (KRISHNAN; BHOSALE, SINGHAL, 2005; SHAIKH, BHOSALE, SINGHAL, 2006), especialmente os aromas. Esta preferência pode ser atribuída, entre outros a dois fatores: a) comparada, a outros hidrogéis, dispersões concentradas em goma arábica, possuem menor viscosidade relativa, o que favorece sua atomização nos processos de secagem industriais como o de *spray-drying* e, b) alta eficiência na retenção de voláteis. Uma das desvantagens é que, quando empregada como material de parede, o sistema microencapsulado não evita a oxidação (RISCH; REINECCIUS, 1988; BERTOLINI; SIANI; GROSSO, 2001; SOOTTITANTAWAT et al., 2005). Trabalhos na literatura contudo, demonstram diferenças na capacidade de retenção em função do tipo de goma de arábica (RISCH; REINECCIUS, 1990; REINECCIUS et al., 1995)

Esta bem demonstrado, o efeito negativo da exposição a elevadas temperaturas e umidade na de estabilidade de voláteis (BUFO; REINECCIUS,

2002; YOSHII et al, 2001) indicando a necessidade de buscar novos materiais ou novas misturas de materiais, afim de minimizar ao máximo este efeito.

São escassos os relatos na literatura referentes ao comportamento dos sesquiterpenos encapsulados e submetidos a diferentes condições de temperatura e umidade, dificultando a comparação de nossos resultados. No entanto, quando comparados aos monoterpenos apresentaram comportamento oxidativo similar.

Algumas alternativas, tem sido propostas para minimizar o processo oxidativo de monoterpenos, e que poderão ser aplicáveis aos sesquiterpenos, entre outras, adição do amido modificado com alto valor de DE (equivalentes de dextrose) na dispersão de goma arábica (BUFFO; REINECCIUS, 2000), proteínas do soro de leite (KIM; MORR, 1996). Porém neste último caso, pode haver a interação de alguns compostos voláteis, que dependendo da sua classe química pode interagir com a estrutura proteíca. Tais interações podem ser interações fracas e romperem facilmente, mas também podem ocorrer ligações covalentes conduzindo a alterações de sabor e textura, representando grande inconveniente quando utilizado na área alimentícia (GUICHARD, 2006). Em nosso caso, onde visamos a utilização como medicamento a manutenção da integridade química (quali e quantitativa) dos constituintes e essencial para garantir a dose que produz o efeito biológico desejado.

#### 4. 9. Atividade Farmacológica

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

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

Potenciais agentes antiinflamatórios são avaliados na indústria farmacêutica e modelos animais são extensivamente usados no teste destes antiinflamatórios. O zimosan e a carragenina são agentes flogísticos largamente empregados na investigação do processo inflamatório agudo. O primeiro é um componente da parede celular de fungos, enquanto o segundo um polissacarídeo de caráter irritante extraído de algas (OH-ISHI, 2000).

Winter, Risley e Nuss (1962) demonstraram que a carragenina induz em ratos uma resposta inflamatória local aguda. A inflamação aguda induzida pela carragenina leva a ativação de gelatinases e colagenases (NAGAKAWA; SAKATA, 1996). Turner (1965) e Di Rosa et al. (1971) relataram que o processo inflamatório induzido pela carragenina em rato envolve três fases: uma primeira fase com liberação inicial de histamina e serotonina (primeira 1,5 h), uma segunda fase mediada por cininas (segundo 1h após a fase 1) e a última fase, mediada por prostaglandinas.

O zimosan é outro agente inflamatório usado na busca de fármacos com ação antiinflamatória. A pleurisia induzida por zimosan induz uma degranulação imediata de mastócitos e a ativação do sistema complemento, seguido do aumento do fator de agregação plaquetária (PAF) (OH-ISHI, 2000).

A avaliação da resposta antiinflamatória da FV (fração volátil) e da MFV (microcápula de goma arábica contendo 10% da fração volátil) foi realizada em dois modelos experimentais de inflamação: a pleurisia e o edema de pata. Em ambos os modelos o processo inflamatório foi induzido por dois estímulos diferentes, zimosan e carragenina de forma isolada.

Está bem demonstrado que a injeção intratorácica de zimosan e carragenina induziu um intenso extravasamento protéico, bem como a migração de leucócitos, para a cavidade pleural de camundongos (HENRIQUES, et al. 1990; SAMPAIO; ERA; HENRIQUES, 2000).

Inicialmente as amostras (FV e MFV) foram avaliadas na dose de 100mg/Kg, e os resultados estão apresentados nas Figuras 23 e 24. Em ambos os estímulos, foi observado um aumento na migração celular para a cavidade pleural. Este aumento no número de células foi devido ao intenso influxo de

neutrófilos observado 4 horas após o estímulo. A administração oral com FV e MFV (100mg/Kg) diminuiu de forma significativa o acúmulo do total de leucócitos, devido a redução do influxo de neutrófilos na cavidade pleural induzido por zimosan (75% e 74% de inibição respectivamente) ou carragenina (91% e 73% de inibição respectivamente) (Figura 23A e 23B). Além disso, a FV e MFV inibiram o extravasamento protéico (Figura 23C e 24 C) induzido por ambos estímulos. A Figura 23C também demonstra que a microcápsula vazia (MVZ) inibiu a exsudação induzida por zimosan. Acredita-se que, este efeito pode ser atribuído à diminuição do fluxo de sangue na luz do vaso sanguíneo, causado pelo intumescimento da goma arábica, promovendo um aumento na viscosidade sangüínea, retardando o extravasamento protéico. Um fator que corrobora esta hipótese é que MZV apresenta uma quantidade maior de goma arábica que MFV. Este efeito não foi observado no extravasamento de proteína induzido por carragenina (Figura 24C), sugerindo que esta diferença também pode estar relacionada aos mediadores envolvidos nos dois estímulos. Há relatos na literatura demonstrando a liberação de colagenase e gelatinase após a injeção da carragenina em ratos (NAGAKAWA; SAKATA, 1996). Estas enzimas poderiam estar envolvidas na degradação da goma arábica na pleurisia induzida por carragenina, evitando assim que ocorra uma inibição da exsudação, pelo efeito do entumescimento da goma nos animais que receberam a microcapsula vazia (MZV), como foi observado na pleurisia induzida por zimosan. Apesar de não ter sido observado um efeito terapêutico da goma arábica na reação inflamatória, tem sido demonstrado seu efeito protetor, por sua ação antioxidante, na redução dos efeitos hepatotóxicos, nefrotóxicos e cardiotoxicos provocado por fármacos como acetaminofen, gentamicina e

dexorubicina, respectivamente (ADB-ALLAH et al., 2002; AL-MEJED et al., 2002; GAMAL EL-DIN et al., 2003).

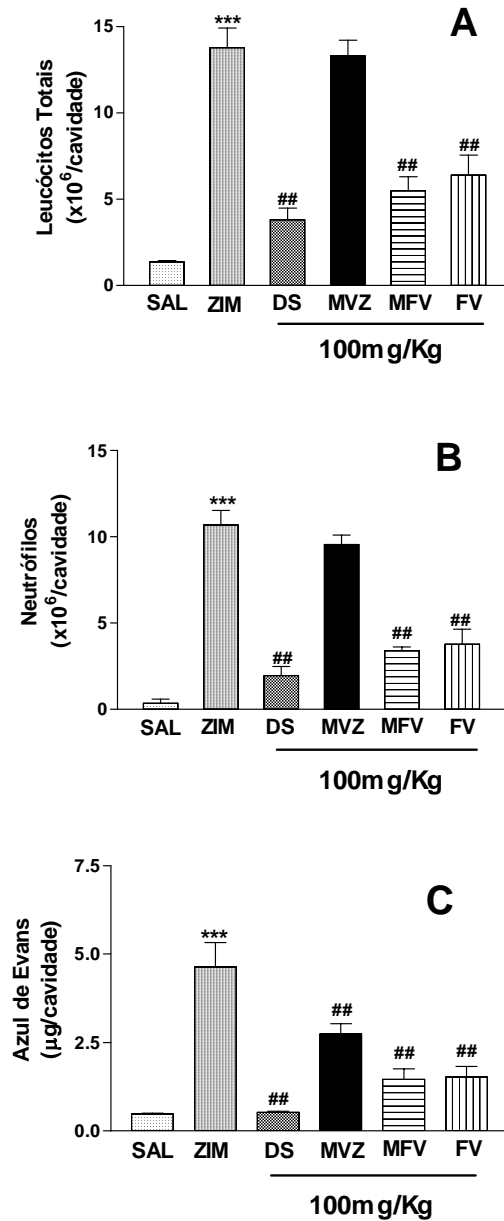


Figura 23. Efeito da fração volátil microencapsulada (MFV) e fração volátil não encapsulada (FV) sobre o recrutamento de leucócitos induzido por zimosan (A e B) e a exudação protéica (C). MFV, FV, Diclofenaco de sódio (DS), Microcápsula vazia (MVZ) e a salina (SAL) foram administrados *p.o.* 1h antes do zimosan (ZIM; 100ug/cavidade) e o lavado pleural foi recolhido 4h após o estímulo. \*\*\* e # indicam  $P < 0,05$  quando comparado ao grupo controle não estimulado com salina ou ao grupo estimulado com zimosan, respectivamente.

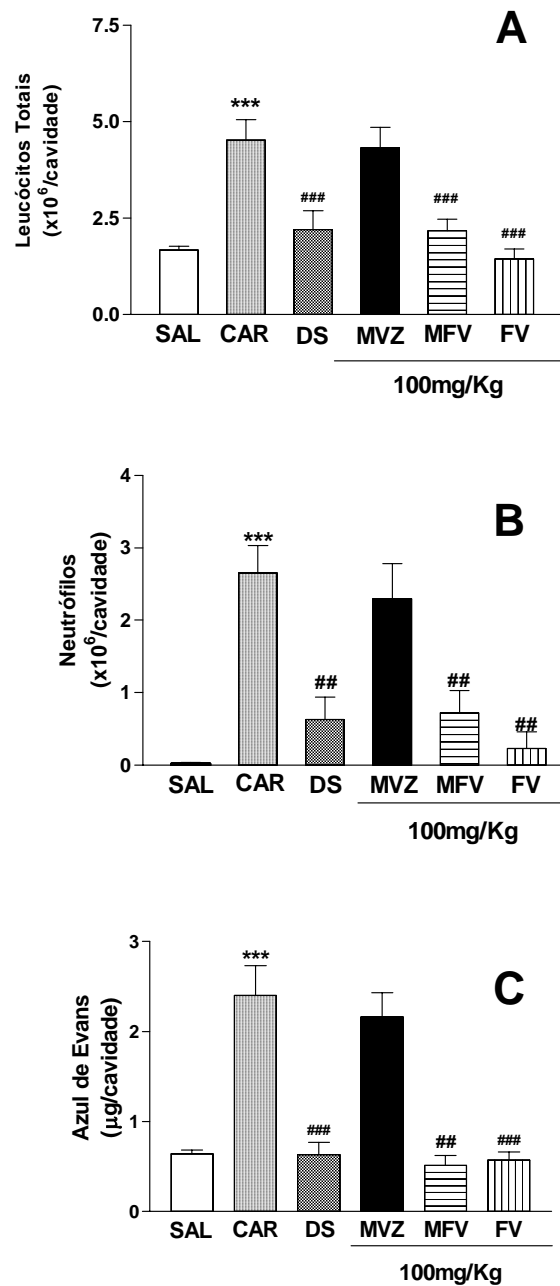


Figura 24. Efeito da microcápsula contendo a fração volátil (MFV) e fração volátil não encapsulada (FV) sobre a pleurisia induzida por carragenina. Quatro horas após a injeção *i.t.* de carragenina (CAR; 300  $\mu\text{g}$ /cavidade) o lavado pleural foi recolhido para análise do número total de leucócitos (A), neutrófilos (B) e extravasamento protéico (C). MFV (100 mg / Kg), FV (100 mg / Kg), Diclofenaco de sódio (DS) (100 mg / Kg), Microcápsula vazia (MVZ) (100 mg / Kg) e a água foram administradas *p.o.* 1h antes da carragenina. \*\*\* e # indicam  $P < 0,05$  quando comparado ao grupo controle não estimulado (salina) ou ao grupo estimulado com carragenina, respectivamente.



Os resultados com ambos os estímulos também demonstraram que o pré-tratamento com FV e MFV inibiu tanto o acúmulo de leucócitos, como o extravasamento protéico na mesma magnitude que o fármaco de referência (diclofenaco de sódio; 100mg/Kg).

O efeito inibitório da FV e MFV no ensaio de edema de pata induzido por zimosan ou carragenina é mostrado na figura 25 e 26. A injeção subplantar de zimosan ou carragenina induziu um significativo edema de pata em camundongos Swiss 4 horas após o estímulo. O pré-tratamento oral com 100mg/kg de MVZ, MFV ou FV demonstrou que a inibição da resposta inflamatória no edema de pata induzido por zimosan foi mais significativa no tratamento com FV do que com a MFV como observado na Figura 25.

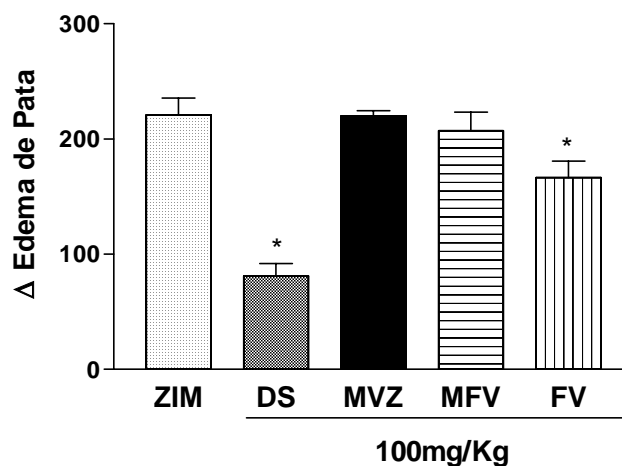


Figura 25. Efeito da microcápsula contendo a fração volátil (MFV) e fração volátil não encapsulada (FV) sobre o edema de pata induzido por zimosan (500ug/pata). MFV, FV, Diclofenaco de sódio (DS), Microcápsula vazia (MVZ) foram administrados *p.o.* 1h antes do zimosan (ZIM;) e o aumento do volume da pata foi analisado 4h após o estímulo. \* indica  $P < 0,05$  quando comparados ao grupo estimulado com zimosan.

Para avaliar o efeito do tratamento com FV e MFV na resposta inflamatória, os animais foram pré-tratados por via oral, estimulados com carragenina por injeção sub-plantar tanto na avaliação em 4h como em 48h após o estímulo, FV e MFV apresentaram significativa inibição na reação inflamatória local. Estes resultados evidenciaram também que a magnitude da inibição, em ambos as fases do processo inflamatório, foi semelhante à apresentada pelo inibidor de referência (diclofenaco de sódio).

Na análise do estímulo tardio (48h) observamos que MVZ também apresentou uma significativa inibição, como à observada na pleurisia por zimosan. Como são modelos diferentes, a avaliação dos resultados nos indica que pode ser uma variabilidade experimental e que investigações futuras podem ser realizadas com a goma em diferentes estímulos inflamatórios. No entanto, o efeito inibitório não é sinérgico ao da fração volátil, ainda que a média da magnitude no efeito da microápsula (FV) seja menor que a observada para fração volátil, porém estatisticamente iguais (MVZ, MFV e FV).

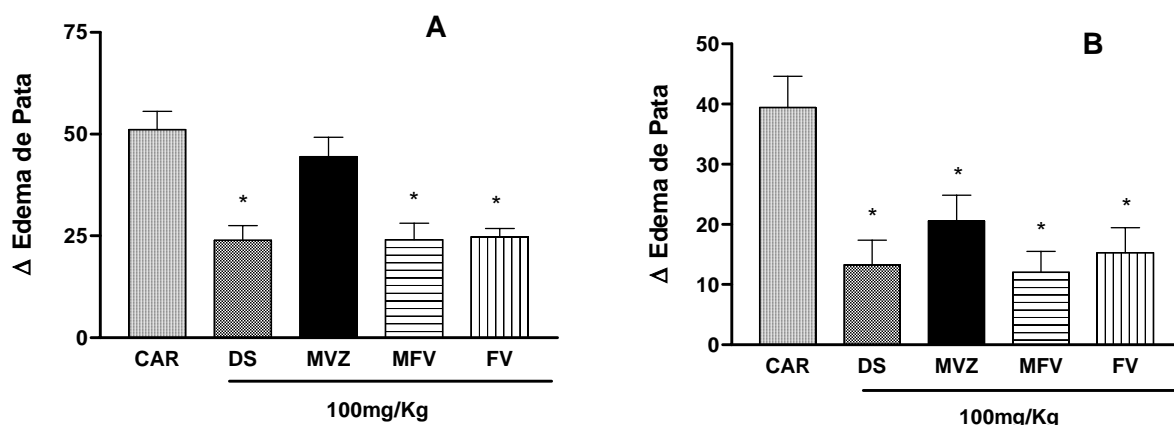


Figura 26. Efeito da microcápsula contendo a fração volátil (MFV) e fração volátil não encapsulada (FV) sobre o edema de pata induzido por carragenina (300ug/pata). MFV, FV, Diclofenaco de sódio (DS), Microcápsula vazia (MVZ) foram administrados v.o. 1h antes da carragenina (CAR;) e o volume da pata medido 4h (A) e 48h (B) após o estímulo. \* indica  $P < 0,05$  quando comparados ao grupo estimulado com carragenina.

Diante destes resultados, foi avaliada a atividade antiinflamatória do  $\beta$ -cariofileno, na dose de 70mg/kg, uma vez que seu teor na fração volátil é de aproximadamente 70% (74,9% mais precisamente).

Nesta dose o  $\beta$ -cariofileno (70mg/Kg) foi capaz de inibir de forma significativa a migração de leucócitos totais, com o extravasamento protéico medido pelo azul de Evans, em ambos os estímulos (zimosan e carragenina), Figuras 27 e 28, respectivamente. A magnitude de inibição do  $\beta$ -cariofileno (70mg/kg) nos dois estímulos (40% CAR e 57% ZIM - porcentagem de inibição do número total de leucócitos) foi semelhante à apresentada pelo inibidor de referência, o diclofenaco de sódio (100mg/kg) mostrando, portanto, maior potência. Estes resultados reforçam a hipótese de que a atividade antiinflamatória seja devida a fração sesquiterpênica, e ainda a forte contribuição do  $\beta$ -cariofileno na atividade, uma vez que é o componente majoritário da amostra.

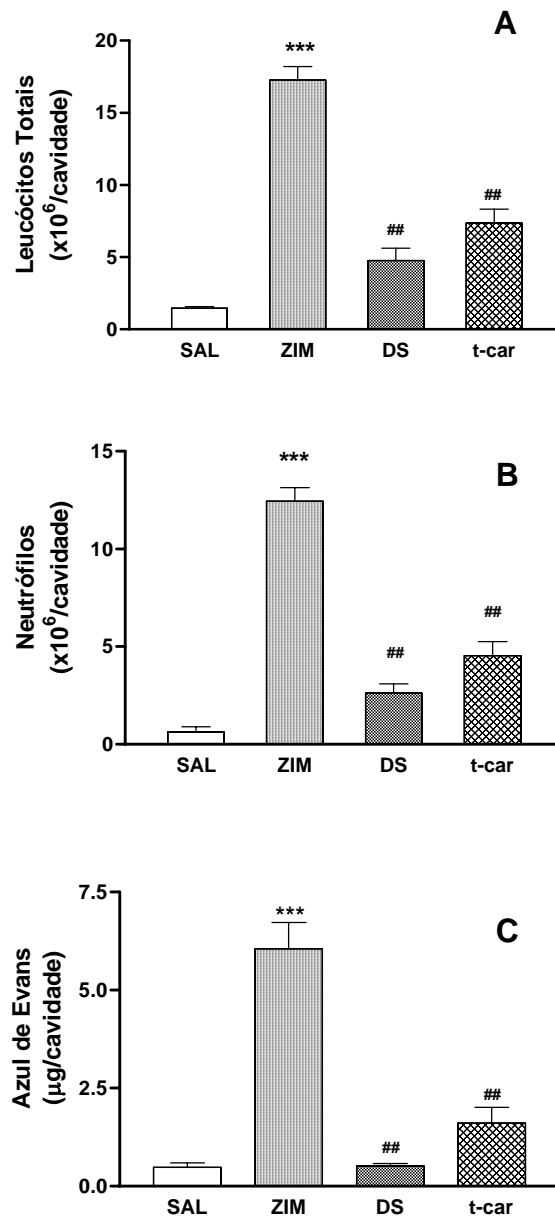


Figura 27. Efeito da  $\beta$ -cariofileno (t-car) na pleurisia induzida por zimosan em camundongos. O t-car (70 mg/Kg) e o diclofenaco de sódio (DS – 100 mg/Kg) foram administrados *p.o.* 1h antes do zimosan (ZIM; 100ug/cavidade) e o fluido pleural foi coletado 4h após o estímulo para avaliar o efeito do  $\beta$ -cariofileno sobre o número total de leucócitos (A), principalmente neutrófilos (B) e sobre o extravasamento de azul de Evans (C). \*\*\* e # indicam  $P < 0,05$  quando comparado ao grupo controle não estimulado com salina ou ao grupo estimulado com zimosan, respectivamente.

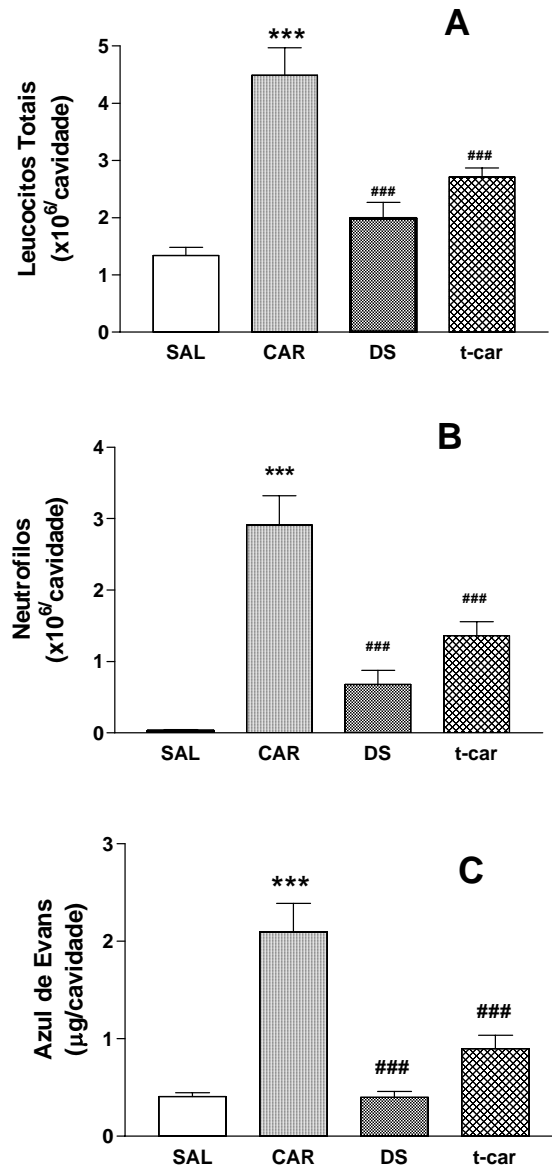


Figura 28. Efeito da  $\beta$ -cariofileno (t-car) na pleurisia induzida por carragenina em camundongos. O t-car (70mg/Kg) e o diclofenaco de sódio (DS – 100 mg/Kg)) foram administrados *p.o.* 1h antes da injeção *i.t.* da carragenina (CAR; 300 $\mu\text{g}$  / cavidade) e o fluido pleural foi coletado 4h após o estímulo para avaliar o efeito do  $\beta$ -cariofileno sobre o número total de leucócitos (A), principalmente neutrófilos (B) e sobre o extravasamento de azul de Evans (C). \*\*\* e # indicam  $P < 0,05$  quando comparado ao grupo controle não estimulado com salina ou ao grupo estimulado com carragenina, respectivamente.

Uma vez confirmado o efeito antiinflamatório da fração volátil da copaíba fez-se necessário uma análise farmacológica mais detalhada. A significativa ação inibitória observada para a fração volátil na dose de 100mg/Kg indicou um ponto de partida para determinar as doses que seriam usadas na análise de uma curva dose-resposta de forma que fosse encontrada a menor dose capaz de inibir 50% da resposta inflamatória a DE 50 (dose efetiva a 50%). Na Figura 29 estão representados os resultados da avaliação da curva dose-resposta da fração, onde foi observada a atividade antiinflamatória da FV nas concentrações de 1,6; 3,2; 6,2; 12,5; 25; 50 e 100mg/Kg.

A partir da dose de 12,5mg/Kg foi observada uma significativa inibição na migração de neutrófilos, sendo o efeito máximo de inibição observado entre 50 e 100 mg/Kg, estes resultados sugerem que a dose efetiva para o efeito antiinflamatório desejado estaria na faixa entre 12,5 e 100mg/Kg.

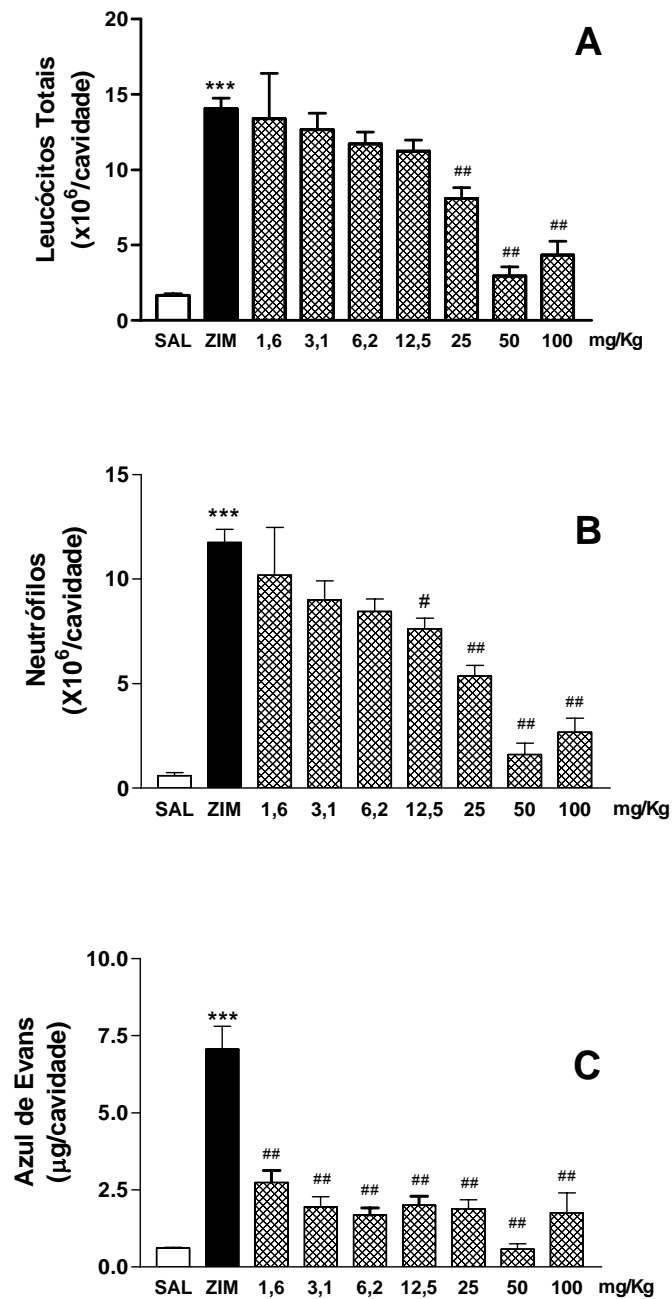


Figura 29. Avaliação da curva dose-resposta da fração volátil (FV) na pleurisia induzida pela injeção *i.t* por zimosan (100  $\mu\text{g}$  / cav.) . Doses distribuídas entre 1,6 e 100 mg/Kg da FV foram administras *p.o.* 1h antes do estímulo e 4h após a indução da pleurisia foram analisados o número total de leucócitos (A), neutrófilos (B) e a exsudato pleural (C). \*\*\* e # indicam  $P < 0,05$  quando comparado ao grupo controle não estimulado com salina ou ao grupo estimulado com zimosan, respectivamente.

Devido ao reduzido número de publicações relatando a atividade antiinflamatória da oleorresina de copaíba (BASILE et al., 1988; FERNANDES; PEREIRA; PAULO 1992; WOISKY, 2001; VEIGA JR. et al., 2001), para fins comparativos, avaliamos a oleorresina em diferentes concentrações, nas mesmas condições experimentais utilizadas para FV.

Os resultados obtidos neste experimento estão representados na Figura 30 e demonstraram que a oleorresina apresentou uma inibição significativa a partir de 50 mg/Kg, no acúmulo de leucócitos totais, sendo principalmente evidenciada pela migração de neutrófilos. No extravasamento protéico, um efeito inibitório estatisticamente significativo foi observado a partir da dose de 25 mg/Kg. Doses acima de 50mg/kg apresentaram respostas similares.



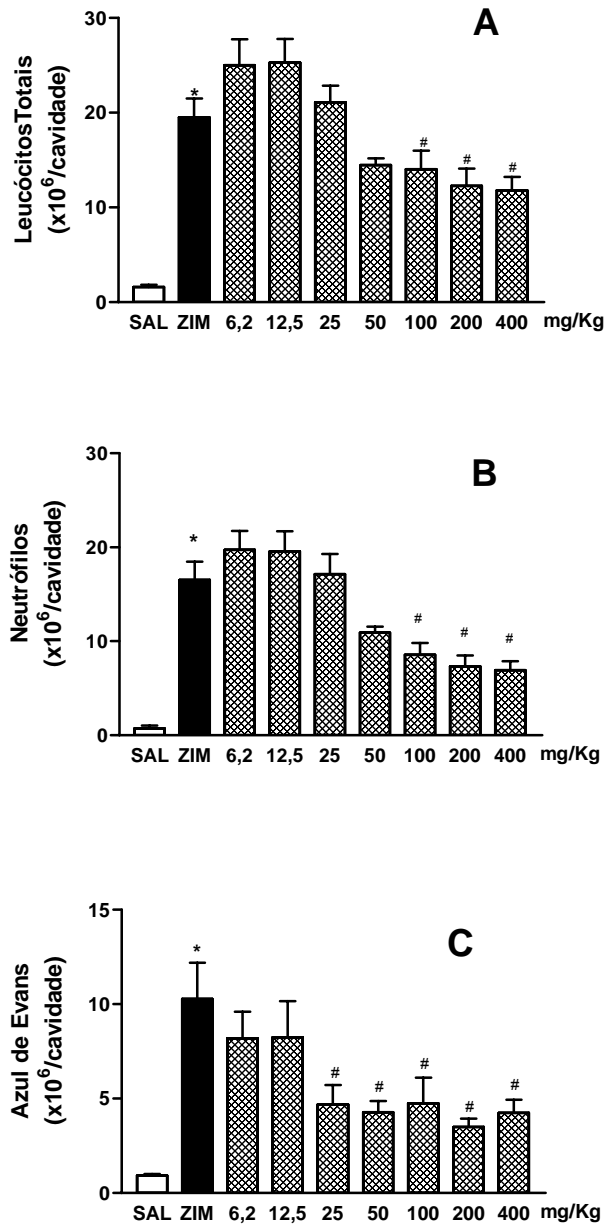


Figura 30. Avaliação da curva dose-resposta da oleorresina (OB) na pleurisia induzida pela injeção *i.t* de zimosan (100  $\mu\text{g}/\text{cav.}$ ). Doses distribuídas entre 6,25 e 400 mg/Kg de OB foram administradas *p.o.* 1h antes do estímulo e 4h após a indução da pleurisia foram analisados o número total de leucócitos (A), neutrófilos (B) e a exsudato pleural (C). \*\*\* e # indicam  $P < 0,05$  quando comparado ao grupo controle não estimulado com salina ou ao grupo estimulado com zimosan, respectivamente.

É importante enfatizar que a oleorresina utilizada no presente estudo apresenta um alto teor de sesquiterpenos (75%), sendo o  $\beta$ -cariofileno seu componente mais abundante (Tabela 1), o que sugere que a resposta antiinflamatória observada na oleorresina, tenha uma grande contribuição da fração volátil.

Por análise de regressão não-linear da curva dose-resposta, onde foi analisado o efeito (número total dos leucócitos) pelo logarítmico da doses (Figura 31), usadas no estudo, foi calculada a DE50. A fração volátil apresentou uma DE 50 de 32mg/Kg.

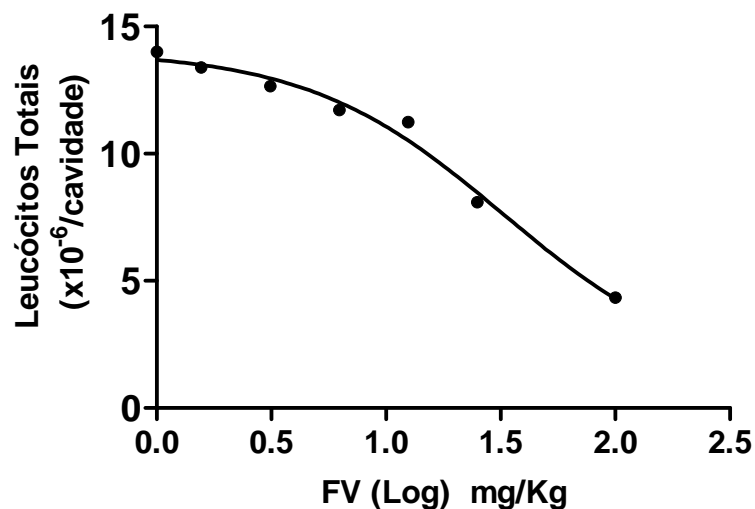


Figura 31. Representação gráfica do número de leucócitos totais pelo log da concentração de diferentes doses da fração volátil.

Após a determinação da DE50, foi avaliada a resposta antiinflamatória na pleurisia aguda (4h) induzida por zimosan ou carragenina (agudo 4h e tardio 48h), da FV e da MFV na dose de 32mg/Kg, como apresentado nas Figuras 32 e 33 respectivamente.

Em ambos os estímulos, tanto a microcápsula MFV quanto FV, administradas 1 hora antes dos estímulos, foram capazes de inibir de forma similar o acúmulo de leucócitos como a exudação avaliados 4 horas após o estímulo. Entretanto, na resposta tardia da carragenina (48h) os resultados de ambas as amostras foram menos efetivos (magnitude) que o padrão de referência (diclofenaco de sódio) (Figura 34).

O  $\beta$ -cariofileno (32mg/kg) inibiu significativamente a migração celular e o extravasamento protéico, em relação ao grupo controle estimulado com zimosan (Figura 32). A intensidade da resposta com 32mg/kg foi similar à obtida com 70mg/kg de  $\beta$ -cariofileno e 100mg/Kg de diclofenaco de sódio (Figura 27 e 23), confirmando a hipótese de que este sesquiterpeno seja o principal responsável pela atividade antiinflamatória da fração volátil.

Uma vez confirmada a atividade antiinflamatória da fração volátil (FV) *in vivo* e sendo essa atividade atribuída à presença do  $\beta$ -cariofileno na fração volátil, avaliou-se a ação do  $\beta$ -cariofileno e da FV sobre a produção do óxido nítrico por macrófagos murinos *in vitro*. Macrófagos murinos peritoneais foram incubados por 24 horas com diferentes concentrações (0,5; 5; 50 e 500  $\mu$ g/mL) de FV e  $\beta$ -cariofileno para avaliação da citotoxicidade; em seguida, a maior concentração não citotóxica de cada amostra (FV e  $\beta$ -cariofileno) foi avaliada sobre a produção do óxido nítrico. Foi observado que a FV apresentou citotoxicidade 80% na concentração de 500  $\mu$ g/mL (dados não mostrados).

Como observado na Tabela 4 a FV foi capaz de inibir 25% da produção do NO na concentração de 50 µg/mL enquanto que o β-cariofileno inibiu 67% da produção do NO na concentração de 500 µg/mL.

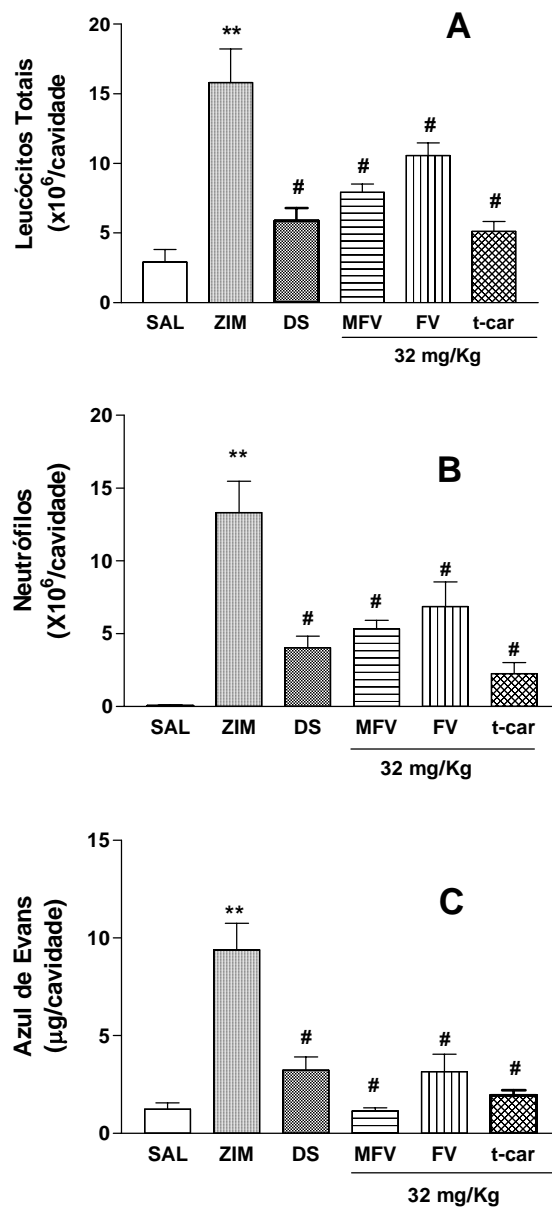


Figura 32. Efeito da microcápsula contendo a fração volátil (MFV – 32mg/Kg), da fração volátil não encapsulada (FV - 32 mg/Kg) e do  $\beta$ -cariofileno (t-car 32mg/Kg) sobre o recrutamento de leucócitos induzido por zimosan (A e B) e na exudação proteica (C). MFV, FV, t-car, diclofenaco de sódio (DS) e a salina (SAL) foram administrados *p.o.* 1h antes do zimosan (ZIM; 100ug/cavidade) e o fluido pleural foi coletado 4h após o estímulo. \*\*\* e # indicam  $P < 0,05$  quando comparado ao grupo controle não estimulado com salina ou ao grupo estimulado com zimosan, respectivamente.

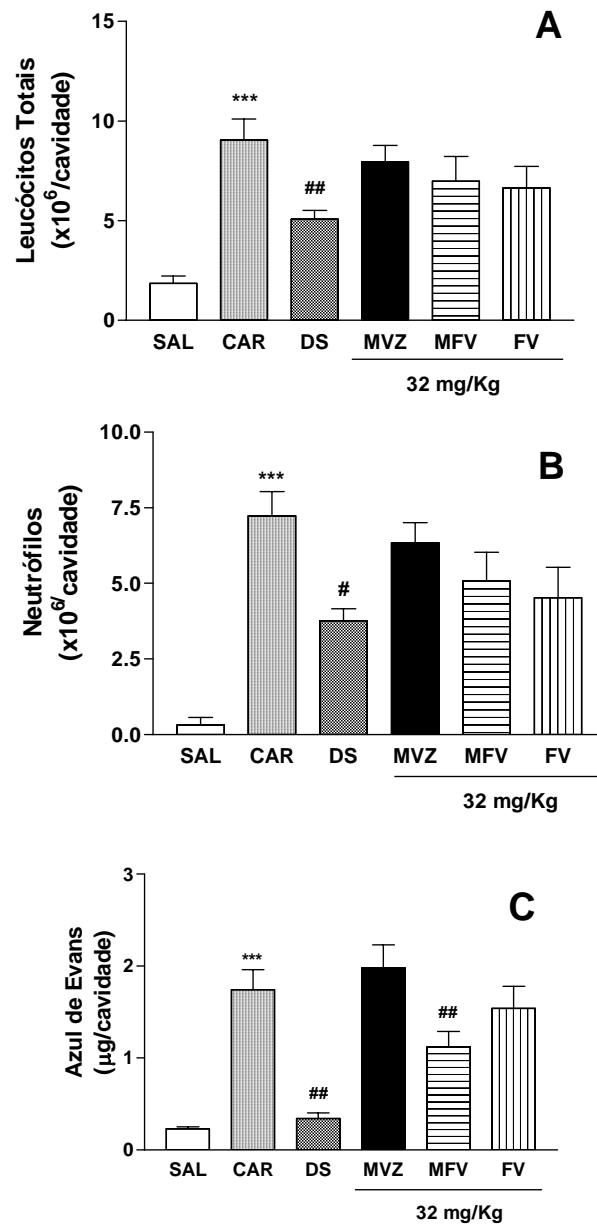


Figura 33. Efeito da microcápsula contendo a fração volátil (MFV-32mg/Kg) e da fração volátil não encapsulada (FV-32mg/Kg) sobre o recrutamento de leucócitos induzido por carragenina (A e B) e na exudação proteica (C). MFV, FV, e o diclofenaco de sódio (DS) foram administrados *p.o.* 1h antes da carragenina (CAR; 300ug/cavidade) e o fluido pleural foi coletado 4h após o estímulo. \*\*\* e # indicam  $P < 0,05$  quando comparado ao grupo controle não estimulado com salina ou ao grupo estimulado com carragenina, respectivamente.

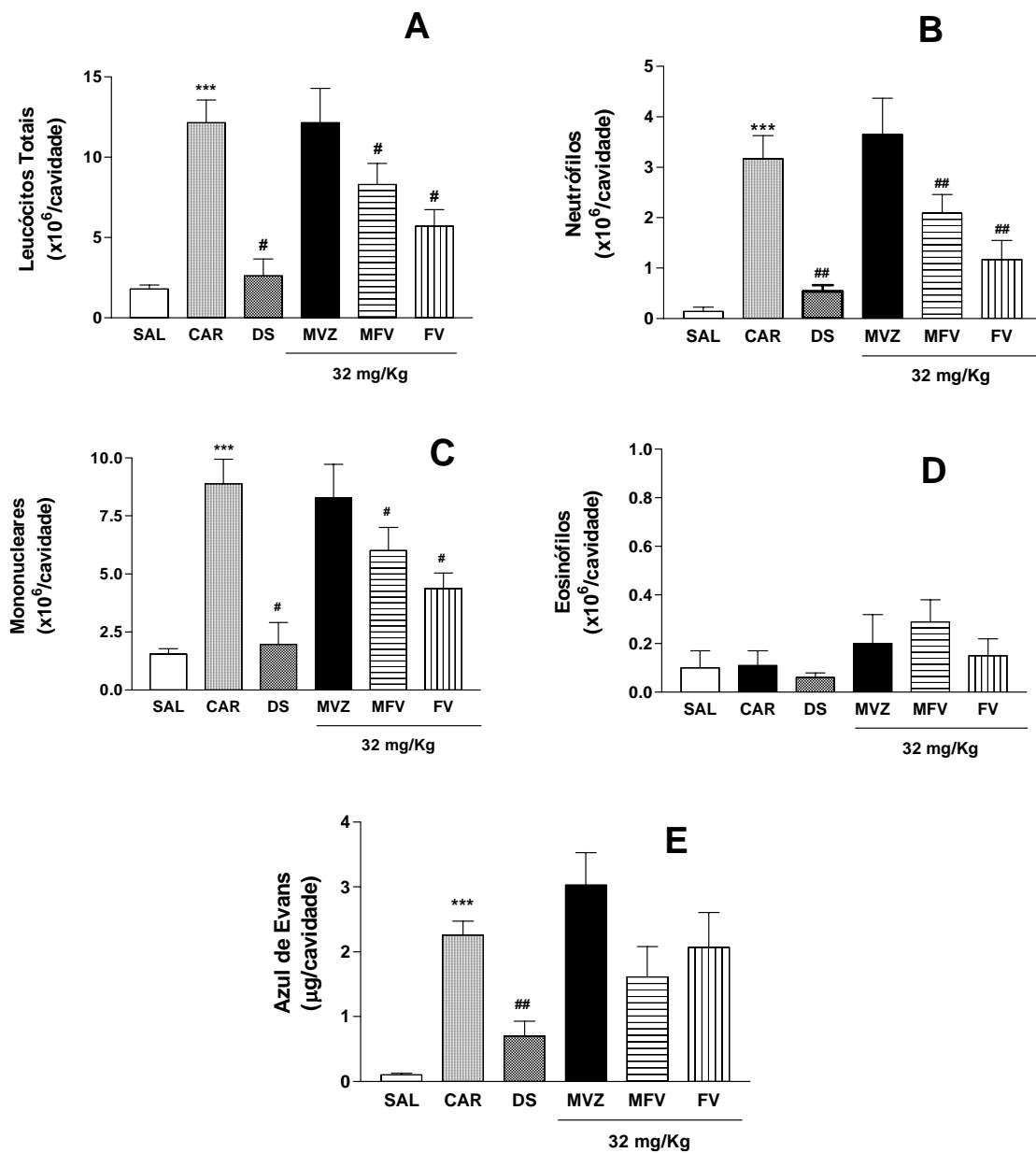


Figura 34. Efeito da microcápsula contendo a fração volátil (MFV), e da fração volátil não encapsulada (FV) sobre o recrutamento de leucócitos induzido por carragenina (A - D) e na exudação proteica (E). MFV, FV, e o diclofenaco de sódio (DS) foram administrados *p.o.* 1h antes da carragenina (CAR; 300 $\mu\text{g}$ /cavidade) e o fluido pleural foi coletado 48h após o estímulo. \*\*\* e # indicam  $P < 0,05$  quando comparado ao grupo controle não estimulado com salina ou ao grupo estimulado com carragenina, respectivamente.

**Tabela 4** - Avaliação do efeito do  $\beta$ -cariofileno e da fração volátil sobre a viabilidade celular e sobre a produção de óxido nítrico *in vitro*.

Amostra	Concentração	% Viabilidade celular	Produção O. N. (% Inibição)
$\beta$ -cariofileno	500 $\mu$ g / mL	100	67
Fração Volátil	50 $\mu$ g / mL	100	25

Nossos resultados confirmam a atividade antiinflamatória da oleorresina de copaíba, já descrita por Woisky (2001), Basile et al. (1998) e Fernandes et al. (1992), em edema de pata induzido por carragenina, cujas respostas mais intensas, descritas pelos dois últimos grupos de pesquisadores foram obtidas utilizando 1,26mL/kg e 500mg/kg respectivamente. Veiga Jr. et al. (2001) demonstraram que a oleorresina inibiu significativamente o edema de pata induzido por carragenina em doses de 30 mg/Kg, e sugerindo ainda que a fração de hidrocarbonetos sesquiterpênicos seja a que mais contribui para a atividade antiinflamatória, apesar de não apresentarem estes dados. Estes autores relataram ainda que a atividade antiinflamatória variou tanto com os diferentes tipos de oleorresina, como com o agente flogístico utilizado na indução.

Em nosso estudo, o edema induzido tanto por carragenina quanto por zimosan apresentou os melhores resultados de inibição, pela a oleorresina, na dose de 100mg/kg. Portanto, as diferenças nas doses entre nossos resultados com os descritos na literatura, podem ser atribuídas à diferenças na composição relativa das oleorresinas. Isto fica mais evidenciado quando demonstramos que a inibição da atividade na dose de 32mg (DE50) foi



semelhante tanto na fração volátil quanto no  $\beta$ -cariofileno, sugerindo a relevante participação deste sesquiterpeno na atividade antiinflamatória observada na fração volátil. Os resultados de Martin et al. (1993), com o  $\beta$ -cariofileno no edema de pata induzida por carragenina, corroboram nossos dados. Neste trabalho, os autores demonstraram que a atividade antiinflamatória está relacionada ao  $\beta$ -cariofileno, também componente majoritário (30%) do óleo essencial de *Bupleurum fruticosens*, demonstrando ainda que, em doses de 150 e 300mg/Kg, o  $\beta$ -cariofileno inibiu tanto quanto o óleo essencial em doses de 1000mg/Kg.

Estas diferenças reforçam a necessidade de investigações na busca de um marcador biológico para produtos de origem natural. Ainda que alguns autores como Lahlou (2004) e Gilbert (2003) tenham descrito que a atividade biológica de óleos essenciais deva ser atribuída tanto aos componentes majoritários, quanto aos minoritários presentes na composição aromática, a busca pelo componente que apresente a atividade biológica atende tanto à necessidade da regulamentação do produto (fitoterápico), como garante maior segurança e controle na eficiência destes produtos, além de possibilitar comparações.

No caso da fração volátil da oleorresina de copaíba, a avaliação farmacológica realizada foi uma etapa inicial para a identificação e confirmação da atividade antiinflamatória. Os processos inflamatórios induzidos pelos dois estímulos (zimosan e carragenina) apresentaram sinais semelhantes: acúmulo de leucócitos e migração de neutrófilos e extravasamento protéico, porém os mediadores envolvidos nestas respostas são diferentes. A pleurisia induzida por carragenina é mediada pela liberação de bradicinina e prostaciclina

(PGE<sub>2</sub>), que levam à formação do edema, enquanto a pleurisia induzida por zimosan apresenta degranulação imediata de mastócitos e ativação do sistema complemento, seguido do aumento do fator de agregação plaquetária. No entanto, em ambos modelos, o TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral  $\alpha$ ), IL-1 (interleucina), IL-6 e citocinas aparecem no exudato causando um sistema de quimio-atração para os neutrófilos (OH-ISHI, 2000).

Os resultados de inibição da fração volátil e do  $\beta$ -cariofileno foram muito similares em magnitude aos encontrados para o diclofenaco de sódio, um potente antiinflamatório não-esteroidal, inibidor da enzima ciclooxigenase, impedindo a formação de prostaglandinas. Esta similaridade sugere que a fração volátil e o  $\beta$ -cariofileno atue inibindo a cascata do ácido araquidônico. Porém, com os dados obtidos até o momento não nos é possível descrever seu mecanismo de ação.

Recentemente, Baylac & Racine (2003) descreveram uma significativa inibição da 5-lipoxigenase por método *in vitro*, tanto para a oleorresina de copaíba quanto para o  $\beta$ -cariofileno, sugerindo que o mecanismo de ação está relacionado com o metabolismo do ácido araquidônico, porém inibindo a formação de leucotrienos.

Outra hipótese de ação do  $\beta$ -cariofileno é a inibição da produção do óxido nítrico, uma vez que este composto foi capaz de inibir o óxido nítrico produzido por macrófagos murinos *in vitro*. Macrófagos desenvolvem um significativo papel em doenças inflamatórias por produzir mediadores inflamatórios como NO, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, PGE. Embora o óxido nítrico e citocinas pró-inflamatórias estejam envolvidos na defesa do organismo a hospedeiros, sua produção contribui para a patogênese de várias doenças. A

inibição destes mediadores previne ou suprime várias doenças inflamatórias (COKER ;LAURENT, 1998; ISOMAKI; PUNNONEN, 1997) .

A indução da pleurisia com carragenina ou zimosan induz a produção de TNF- $\alpha$  por leucócitos presentes na cavidade torácica, provavelmente macrófagos. Macrófagos murinos estimulados *in vitro* com LPS induzem a produção de TNF- $\alpha$  (dados não mostrados) que também estimula a produção de óxido nítrico (MONCADA; PALMER; HIGGS,1991; SAUTEBIN, 2000).

Como demonstrado nos resultados do presente trabalho, o  $\beta$ -cariofileno foi capaz de inibir tanto a pleurisia por zimosan quanto por carragenina, além de inibir a produção de óxido nítrico *in vitro*. Estes dados sugerem que o  $\beta$ -cariofileno também poderia estar envolvido com a ação do TNF- $\alpha$ .

Portanto, estes dados nos indicam os primeiros passos a serem dados na elucidação do mecanismo de ação da fração volátil, que serão alvo dos próximos estudos desta avaliação.

A análise conjunta de nossos resultados e outros já existentes demonstra que a oleorresina de copaíba tem atividade antiinflamatória, porém como todo insumo de origem vegetal está sujeita a variações em sua composição tanto quali quanto quantitativa, em função da espécie, época de coleta, tipo de solo, dificultando ou até impedindo sua utilização como insumo farmacêutico. O processo de fracionamento por nós utilizado possibilitou a obtenção da fração volátil, com composição relativa constante, eliminando assim os inconvenientes da sazonalidade. Esta fração mantém a atividade antiinflamatória da oleorresina, sugerindo ser a composição de voláteis os responsáveis pela atividade, porém tanto a oleoressina quanto a fração volátil

são imiscíveis com água, portanto a administração só é possível quando dissolvidas em solvente, não permitidos em preparações medicamentosas destinadas ao uso interno. Este inconveniente foi contornado microencapsulando a fração volátil, na qual a atividade foi preservada, além disso, o sistema microencapsulado por si pode ser utilizado como forma farmacêutica ou ser intermediária na preparação de outras.

O propósito deste estudo foi avaliar de modo racional e sistematizado a utilização da olerressina de copaíba, em função de sua descrição como fitoterápico de uso popular.

Estudos citados na literatura com a oleoresina descrevem a atividade antiinflamatória, confirmando o uso popular desta. Entretanto, há grande variabilidade nas amostras utilizadas nestes estudos (óleos comerciais, oleoresina de diferentes espécies sem caracterização química), dificultando a padronização e a determinação ou mesmo indicação dos compostos responsáveis pela atividade.

Esta complexidade e variabilidade de componentes é um dos principais entraves na padronização de um fitoterápico, sendo muitas vezes a etapa limitante de seu desenvolvimento.

Com estes dados optou-se por fracionar a olerresina na tentativa de homogeneização e padronização de uma de suas frações. Neste aspecto em particular, a oleoresina de copaíba apresentou uma grande versatilidade em função de sua composição ser exclusivamente de sesquiterpenos e diterpenos, o que favoreceu o fracionamento em uma única etapa utilizando uma técnica simples e convencional. O fracionamento permitiu eliminar uma parte dos efeitos da variação sazonal, bem como a obtenção de um “insumo” de fácil

caracterização e quantificação. O que é sem dúvida uma etapa determinante na qualificação de um produto para o desenvolvimento farmacêutico.

A avaliação da atividade farmacológica desta fração volátil apresentou uma atividade antiinflamatória superior à da oleoresina e a do padrão de referência utilizado (diclofenaco de sódio), apresentando uma potência cerca de duas vezes maior. O  $\beta$ -cariofileno principal constituinte da fração volátil mostrou um efeito inibitório semelhante ao encontrado para a fração volátil, sendo portanto, fortemente indicado como marcador biológico da fração volátil para esta atividade.

A etapa seguinte foi a veiculação desta fração em preparações farmacêuticas. Por tratar-se de uma mistura instável altamente volátil optou-se pelo microencapsulamento em um polímero hidrossolúvel. Este processo possibilita o aprisionamento da fração transformando-a em forma sólida, passível de administração por via oral.

O encapsulamento com a goma arábica mostrou alta retenção da fração no sistema envoltório formado e a atividade com este sistema foi preservada na mesma intensidade da obtida com a fração volátil. Entretanto, quando submetida a condições de estresse térmico com elevada umidade, o sistema reduziu, porém não impediu oxidação quando comparada a fração volátil livre.

Assim demonstramos a viabilidade de obtenção de um insumo farmacêutico, a partir da oleoresina de copaíba, e o processamento deste em uma forma farmacêutica, porém para chegar a um medicamento uma soma substancial de trabalho ainda é necessária.

Estes resultados ilustram o caminho a ser percorrido pela ciência na geração do conhecimento e para utilização deste, no desenvolvimento tecnológico de fitoterápicos. Para tal é necessário estudos multidisciplinares envolvendo universidades e institutos de pesquisa “iniciativa privada ou não” na busca conjunta da formação e qualificação de recursos humanos, que contribuam para a transformação da ciência em processo ou produto tecnológico.

Esta é uma necessidade emergente, uma vez que apesar de sermos consideramos o berço da biodiversidade mundial, ainda são escassos os fitoterápicos genuinamente nacionais. Comprovando a necessidade de se buscar alternativas viáveis que transforme esta biodiversidade em economia sustentável.

*O sonho não acabou. Abro os olhos,*

*“A jornada começa agora”, penso. E sorrio...*

*Carlos Ribeiro*

***Conclusões***

---

## 5. CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos no presente estudo pode-se concluir que:

Utilizando processos simples foi possível obter, com bom rendimento (14,3%), a fração volátil da oleorresina de copaíba.

Os procedimentos utilizados possibilitaram a padronização da fração volátil, eliminando as variações sazonais da oleorresina.

O principal constituinte da fração volátil foi o  $\beta$ -cariofileno, pode ser utilizado como marcador químico na fração volátil.

A fração volátil da oleorresina apresentou efeito inibitório na pleurisia induzida por zimosan e carragenina em dose duas vezes menores que o fármaco de referência (diclofenaco de sódio), apresentando uma DE50 de 32mg/Kg.

O  $\beta$ -cariofileno, mostrou ser o principal constituinte responsável pela atividade antiinflamatória, podendo ser indicado como marcador biológico da fração.

O processo de microencapsulamento por spray-drying, utilizando goma arábica foi eficiente, com rendimento médio de 96%.

Foram obtidas microcápsulas do tipo reservatório, na forma esférica, com tamanho entre 1 e 25  $\mu\text{m}$  e parede íntegra.

A fração microencapsulada apresentou o mesmo efeito inibitório observado para a fração volátil não encapsulada, demonstrando a eficiência da forma farmacêutica utilizada.

A goma arábica foi eficiente na retenção e preservação da integridade química da fração volátil durante o processo de secagem.

No ensaio de envelhecimento acelerado das microcápsulas, o processo oxidativo do cariofileno foi reduzido, porém não eliminado.



Os resultados como um todo demonstram, que a fração volátil microencapsulada tem potencial uso na obtenção de um medicamento com ação antiinflamatória.

## ***Referências Bibliográficas***

---

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography - Mass Spectrometry**. Illinois: Allured Publishing Corporation, 1995. 470 p.

ABD-ALLAH, A.R.; AL-MEJED, A.A.; MOSTAFA, A.M.; AL-RIKABI, A.C.; AL-SHABANAH, O. A.; DIN, A.G.; NAGI, M.N. Protective effect of arabic gum against cardiotoxicity induced by doxorubicin in mice: a possible mechanism of protection. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**. v.16, n. 5, p. 254-9, 2002.

ALENCAR, J.C. Estudo silviculturais de uma população de Copaifera multijuga Hayne-Leguminosae, na Amazônia Central2. – Produção de óleo resina. **Acta Amazônica**. Manaus, v.1, n.1, p.75-89,1982.

AL-MEJED, A.A.; MOSTAFA, A.M.; AL-RIKABI, A.C.; AL-SHABANAH, O. A. Protective effects of oral arabic gum administration on gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. **Pharmacological Research**, v. 46, n.5, p. 445-51, nov, 2002.

ALPAR, H.O.; EYLES, J.E.; WILLIAMSON, E.D. Oral and nasal immunization with microencapsulated clinically relevant proteins. **S.T.P. Pharma Sciences**. v.8, n.1, p. 31-39, 1998.

ANANDARAMAN, S.; REINECCIUS, G.A. Stability of encapsulation orange peel oil. **Food Technology**. Washington, v.40, p.88-93, nov,1986.

ANKER, M.H; RENECCIUS, G.A. Encapsulation orange oil: Influence of spray-dryer air temperatures on retention and shelf life. In: RISCH, S. J.; RENECCIUS, G.A. **Flavor Encapsulation**. Washington DC: American Chemical Society, 1988. p. 78-86.

ANSEL, H.C.; POPOVICH, N.C.; JR. ALLEN, L.V. **Farmacotécnica: Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos**. 6<sup>a</sup> ed , São Paulo: Premier, 2000. 586 p.

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

BAKAN, J.A. Microencapsulação. In: LACKMAN,L.; LIEBERMAN,H.A.; KANING, J.L. **Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica**. Tradução João F. Pinto; Ana Isabel Fernandes. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001. vol. II, p. 707-735.

BANDEIRA, M. F. C. L.; OLIVEIRA, M. R. B.; BENATTI NETO, C.; COMELLI LIA, R. C. Estudo comparativo da compatibilidade biológica em molares de ratos do óleo essencial e da oleorresina da *Copaifera multijuga* (óleo de copaíba) associados ao hidróxido de cálcio. **Jornal Brasileiro de Clínica & Estética em Odontologia** (JBC), Curitiba, v. 3, n. 16, p.42-49, 1999a.

BANDEIRA, M. F. C. L.; OLIVEIRA, M. R. B.; PIZZOLITTO, A. C.; BENATTI NETO, C. Estudo preliminar da atividade antibacteriana do óleo esencial e da oleorresina da *Copaifera multijuga* (óleo de copaíba) associados ao óxido de zinco e ao hidróxido de cálcio. **Jornal Brasileiro de Clínica & Estética em Odontologia**. (JBC), Curitiba, v. 3, n. 17, p.46-52, 1999b.

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

BAYLAC, S.; RACINE, P. Inhibition of 5-lipoxygenase by essential oils and other natural fragrant extrat. *Internationla Journal of Aromatheraphy*. v.13, n.2/3, p. 138-142, 2003.

BECHARA, G.H.; SZABÓ, M.P.J. Processo inflamatório. 1. Alterações vasculares e mediação química. Disponível em: <<http://www.fcav.unesp.br/download/deptos/patologia/bechara/inflamação1.pdf>>. Acesso em 14 nov. 2005.

BERTOLINI, A. C.; SIANI, A. C.; GROSSO, C.R.F. Stability of monoterpenes encapsulated in arabci gum by spray drying. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.49, p.780-785, 2001.

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

BOH, B.; KOSIHI, I.; KNEZ, E.; KUKOVIC, M.; SKERLAVA, V.; SKVARC, A. Microencaplation and testing of the agricultural animal repellent, Daphne. **Journal of Microencapsulation**. v.16, n.2, p.69-180, 1999.

BRITO, N. M.B.; SIMÕES, M. J.; PESSOA, A. F.; MELO, M. C. F. Efeitos do óleo de copaiba na cicatrização de feridas cutâneas abertas em ratos. **Revista Paraense de Medicina**. v. 12, n. 1, p. 28-32, jan-abr, 1998.

BUFFO, R.; REINECCIUS, G.A. Optimization of gum acacia/modified starch/maltodextrin blends for the spray drying of flavors. **Perfumer & Flavorist**. V.23, p. 37-51, may/jun, 2000.

BUFFO, R.; REINECCIUS, G.A. Effects of type of atomization on processing temperatures on the physical properties and stability of spray-dried flavors. **Journal Food Science**. v. 67, n. 3, p. 11081114, 2002.

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

CHECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**. v.21 n.1, p.99-105, 1998.

CHECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R. A. Estudo químico de plantas medicinais orientado para a análise biológica. Obtenção, determinação e modificação estrutural de compostos bioativos. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J.B. **Plantas Mediciniais: sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó. Argos. 2001. p. 47-76.

CHEN-CHEN, L.; SENA, M.A. Atividade tóxica e mutagênica do óleo de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desfron) em camundongos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. Botucatu, v.5, p. 37-40, 2002.

COKER, P. K.; LAURENT, G. J. Pulmonary fibrosis: cytokines in the balance. **European Respiratory Journal**. v.11, p. 1218, 1998.

COLLINS, T. Inflamação aguda e crônica. In: COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Robbins patologia estrutural e funcional**. Tradução Jane Bardawil Barbosa, Marcio Moacyr de Vasconcelos, Patricia Josephine Voeux. 6ª Ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2000. Cap. 3, p. 44-78.

COSTA-LOTUFO, L.V.; CUNHA, G.M.A.; FARIAS, P.A.M.; VIANA, G.S.B.; CUNHA, K.M.A.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; SILVEIRA, E.R.; GRAMOSA, N.V.; RAO, V.S.N. The cytotoxic and embryotoxic effects of kaurenoic acid, a diterpene isolated from *Copaifera langsdorffii* oleo-resin. **Toxicol**. v.40, p. 1231-1234, 2002.

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

DI ROSA , M.; GIROUND, J.P.; WILLOUGBBY, D.A. Studies of mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. **Journal of Pathology**. v. 104, p.15-29, 1971.

DI STASI, L. C. **Plantas Mediciniais: Arte e Ciência**. São Paulo: Editora UNESP, 1996, p. 230p.

EL-SAYED, T.M.; WALLACK, D.A.; KING, C.J. Changes in particle morphology during drying of drops of carbohydrate solutions and food liquids.1. Effects of composition and drying conditions. **Industrial Engineering Chemistry Research** v.29, n. 12 , p. 2346-2354, 1990a.

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

FOOD CHEMICAL CODEX. Committee on Codex Specifications. Washington DC: National Academies. 3<sup>rd</sup> ed. 1981. p.108.

GAMAL EL-DIN, A.M.; MOSTAFA, A.M.; AL-SHABANAH, O.A.; AL-BEKAIRI, A.M.; NAGI, M.N. Protective effect of arabic gum against acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. **Pharmacological Research** v. 48, n.6, p.631-5, Dec, 2003.

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

GHELARDINI, C.; GALOTTI, N.; DI CESARE MANELLI, L.; MAZZANTI, G.; BARTOLINI, A. Local anaesthetic activity of  $\beta$ -caryophyllene. **Il Farmaco**, v. 56, p. 387-389, 2001.

GILBERT, B.; ALVES, L. F. Synergy in Plant Medicines. **Current Medicinal Chemistry**. v.10, p. 13-20, 2003.

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

GOTTLIEB, O.R.; MAGALHÃES, M.T. Modified distillation Trap. **Chemist-Analyst**. v.49, p.114, 1960.

GOUBET,I.; LE QUERE, J.L.; VOILLEY, A.J. Retention of aroma compounds by carbohydrates: influence of their physicochemical characteristics and their physical

state. A review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 46, p.1981-1990, 1998.

GOUIN, S. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. **Trends Food Science & Technology**. v. 15, p. 330-347, 2004.

GRAMOSA, N.V.; SILVEIRA, E.R. Volatile constituents of *Copaifera langdorffii* from Brazilian northeast. **J. Essent. Oil Res.** v.17, p. 130-132, 2005.

GUICHARD, E. Flavour retention and release from protein solution. **Biotechnology Advanced**. v. 24, p.226-229, 2006.

GURSOY, A.; KARAKUS, D.; OKAR, I. Polymers for sustained release formulations of dipyrindamole-alginate microspheres and tabletted microspheres. **Journal of Microencapsulation**. v.16, n.4, p.439-452, 1999.

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

HAWKIWS, S.; BLEDSOE, H.; DUNCAN, M. Encapsulation technologies for fragrance and cosmetic industries. **Cosmetic Toiletries Manufacture Worldwide**, p.99 -105, 2000.

HAYASE TOMOKO; RIFUSE KK; DAIHO KORYO KK; SUZUKI YUSHI KOGYO KK. Komai Koichiro, Hayase Tomoko, Hayase Manabu, Miiwita Masayasu, Sakuri Osamu, Kuroki Osamu, Miziguchi Masaaki. **Sanitary insect pest repellent of natural essential oil and application thereof**. Patente JP2004099535, 02 abril 2004.

HAYASE TOMOKO; RIFUSE KK; SUZUKI YUSHI KOGYO KK. Komai Koichiro, Hayase Tomoko, Hayase Manabu, Miiwita Masayasu, Kuroki Osamu, Miziguchi Masaaki. **Repellent active sustained release porous fine particle and use thereof**. Patente JP2002308705, 23 outubro 2002.

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

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

INDEX KEWENSIS, suppl. XX; Claredon Press, Oxford, 1996.

INGLETT, G.E.; GELBMAN, P.; REINECCIUS, G.A. Encapsulation of orange oil: use of oligosaccharides from  $\alpha$ -amilase modified starches of maize, rice, cassava and potato. In: RISCH, S. J. REINNECCIUS, G.A. **Flavor encapsulation**. Washington, DC : American Chemical Society, 1988. p. 29-36.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). [www.ibge.gov.br/extveg.htm](http://www.ibge.gov.br/extveg.htm), acessado em dezembro de 2005.

ISOMAKI, P.; PUNNONEN, J. Pro- and anti-inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis. **Annals of Medicine**. v.29, n. 6, p. 499-507, 1997.

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

KIM, Y.D.; MORR, C.V. Microencapsulation properties of Arabic gum and several food proteins: spray-dried orange oil emulsion particles. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.44, p.1314-1320, 1996.

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

KRISHNAN, S.; BHOSALE, R.; SINGHAL, R. Microencapsulation of cardamom oleoresin: Evaluation of blends of gum Arabic, matodextrin and modified starch as wall materials. **Carbohydrate Polymers**. v.61, n.1, p. 95-102, 2005.

KUBO I, CHAUDHURI SK, KUBO Y, SANCHEZ Y, OGURA T, SAITO T, ISHIKAWA H, HARAGUCHI H. Cytotoxic and antioxidative sesquiterpenoids from *Heterotheca inuloides*. **Planta Medica**. v. 62, n. 5, p. 427-30, oct,1996.

LAMPRECHT, A.; SCHÄFER, U.F.;LEHR, C.M. Visualization and quantification of polymer distribution in microcapsules by confocal scanning microscopy (CLSM). **International Journal Pharmaceutics**. v. 196 , p. 223-226, 2000.

LANGENHEIM, J.H. Plant resins. **Americam scientist**, v. 78, p. 16-24, 1990.



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

LEGAULT, J.; DAHL, W.; DEBITON, E.; PICHETTE, A.; MADELMONT, J-C. Antitumor activity of balsam fir oil: production of reactive oxygen species induced by  $\alpha$ -humulene as possible mechanism of action. **Planta Medica**. v. 69, p. 402-407, 2003.

LEWIS, W.H. **Medical Botany**. Plants Affecting Human Health. 2<sup>a</sup> Edição. New York: John Wiley and Soons; 2003. p. 823.

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

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

LUZZI, L. A. Microencapsulation. **Journal of Pharmaceutical Science** v.59, n.10, p.1367-1375, 1970.

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

MAGIL, M. Microencapsulamento. **Cosmetics Toiletries** v.3, p. 54-57,1991.

MARQUES, L. C. [www.comciencia.br/reportagens/fito/fito8.htm](http://www.comciencia.br/reportagens/fito/fito8.htm), acessado em fevereiro de 2005.

MARTIN, S.; PADILLA, E.; OCETE, M.A.; GALVEZ, J.; JIMÉNEZ, J.; ZARZUELO, A. Anti-inflammatory activity of the essential oil of *Bupleurum frutescens*. **Planta Medica**, v. 59, p. 533-536,1993.

MASTERS, K. Drying principles, heat and mass balances, thermal efficiency. In: **Spray Drying Handbook**. London: George Godwin, 1985. cap. 3, 76-110.

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

MONCADA, S.; PALMER, R.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacological reviews**. v. 43, p. 109-142, 1991.

MORAES, M. O.; FONTELES, M.C.; MORARES, M.E.A. Screening for anticancer activity of plants the Northeast of Brazil. **Fitoterapia**. v. 68, n. 3, p. 235-239, 1997.

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

NAGAKAWA, H.; SAKATA, K. Partial purification and characterization of exudate gelatinase in the acute phase of carrageenan-induced inflammations in rats. **Journal of Biochemistry**. v. 100, p.1499-506, 1996.

NEAU, S. H.; GOSKONDA, S.R.; UPADRASHTA, S.M.; THIES, C.A.; TRIPP, S.I. Encapsulation of a volatile oil by ionic gelation of alginate. **American Journal of Pharmaceutical Education**. v.57, p.126-129, 1993.

NUSSINOVITH, A. **Hydrocolloid Applications**: Gum Technology in the food and other industries. London: Black Academic & Professional, 1997, 354 p.

OH-ISHI, S. Analysis of chemical mediators involved in acute inflammatory reaction with the rats pleurisy model. **Nippon Yakurigaku Zasshi**. v. 110, n.2, p. 59-68, 1997.

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

OLIVEIRA, A.G.; SCARPA, M.V.; BUENO, J.H. F.; EVANGELISTA, R.C. Micro e Nanocápsulas: Um eficiente sistema, com dimensões reduzidas, para liberação controlada e direcionamento de fármacos encapsulados. **Revista Ciências Farmacêuticas**. São Paulo, v.14, p. 37-49,1992.

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

PAIVA, L.A.F.; RAO, V.S.N.; GRAMOSA, N.V.; SILVEIRA, E.R. Gastroprotective effect of *Copaifera langsdorffii* oleo-resin on experimental gastric ulcer models in rats. **Journal Ethnopharmacology**. v. 62, p. 73-78, 1998.

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

PAIVA, L.A.F.; GURGEL, L.A.; DE SOUSA, E.T.; SILVEIRA, E.R.; SILVA, R.M.; SANTOS, F.A.; RAO, V.S.N. Protective effect of *Copaifera langsdorffii* oleo-resin against acetic acid-induced colitis in rats. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 93, p. 51-56, 2004a.

PAIVA, L.A.F.; GURGEL, L.A.; CAMPOS, A. R.; SILVEIRA, E.R.; RAO, V.S.N. Attenuation of ischemia/reperfusion-induced intestinal injury by oleo-resin from *Copaifera langsdorffii* in rats. **Life Science** v. 75, p. 1979-1987, 2004b.

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

PELLEGRINO, J. Protection against human *Schistosoma cercariae*. **Experimental Parasitology**. v. 21, n. 1, p. 112-31, aug, 1967.

PINHEIRO, J.T. **Avaliação comparativa das infiltrações apicais através do <sup>131</sup>INa nas obturações de canais radiculares com cimento à base de óleo-resina de copaíba**. 1993. 77f. Tese – Faculdade de Odontologia de Pernambuco, Fundação Universidade de Pernambuco, Pernambuco, 1993.

PIO CORREIA, M. **Dicionário de plantas úteis e exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, Instituto de Desenvolvimento Florestal, 1984. 646 p.

QUENELLE, D. C.; STAAS, J.K.; WINCHESTER, G.A.; BARROW, E.L.W.; BARROW, W. W. Efficacy of microencapsulated rifampin in *Mycobacterium tuberculosis*-infected mice. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.43, n.5, p. 1144-1151, 1999.

RAMADAN, M.A.; TAWASHI, R. Effect of surface geometry and morfhic features on the flow characteristics of microesphere suspensions. **Journal Pharmaceutical Science**. v. 79, n.10, p. 929-932, 1990.

RÉ, M. I. Microencapsulation by *spray drying*. **Drying Technology**, v. 16, n. 6, p. 1195-1236, 1998.

REINECCIUS, G.A. Spray-drying of food flavors. In: RISCH, S. J. REINNECCIUS, G.A. **Flavor Encapsulation**. Washington D.C.: American Chemical Society, 1988. p. 55-66.

REINECCIUS, G.A.; WARD, F.M.; WHORTON, C.; ANDON, S.A. Development in Gum Acacias for the encapsulation of flavor. In: RISCH, S.J.; REINECCIUS, G.A. **Encapsulation and controlled release of food ingredients**. Washington: American Chemical Society (ACS Symposium Series 590), 1995. p. 161-168.

RIBEIRO, A. **Avaliação do potencial irritativo da óleo-resina de copaíba (substituto do eugenol) na fase exudativa do processo inflamatório**. 1989. 86f. Tese – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1989.

RIBEIRO, A.; ARNAUD, P.; FRAZAO, S.; VENANCIO, F.; CHAUMEIL, J.C. Development of vegetable extract by microencapsulation. **Journal of Microencapsulation**. v. 14, n. 6, p. 735-742, 1997.

RIFUSE:KK. Komai Koichiro, Miiwata Masayasu, Sakurai Osamu. **Sanitary insect pest repellent and repellent active wax**. Patente JP2001348304, 18 dezembro 2001.

RISCH, S.J. Encapsulation of flavors by extrusion. In: RISCH, S. J. REINNECCIUS, G.A. **Flavor encapsulation**. Washington D.C.: American Chemical Society, 1988, p.103-109.

RISCH, S.J.; REINNECCIUS, G.A. Differences between gum acacias for the spray drying of citrus oils. **Perfumer & Flavorist**. V.15, p. 55-58, jul/aug, 1990.

RISCH, S.J.; REINNECCIUS, G.A. *Spray-dried* orange oil: effect of emulsion size on flavor retention and shelf stability. In: RISCH, S. J. REINNECCIUS, G.A. **Flavor encapsulation**. Washington D.C.: American Chemical Society, 1988. p. 67-77.

RISCH, S.J.; REINNECCIUS, G.A. Stability of encapsulation orange peel oil. **Food Technology**. v. 11, p. 88-93, nov., 1986.

ROSENBERG, M.; KOPELMAN, I.J.; TALMON, Y. Factors affecting retention in *spray-drying* microencapsulation of volatile materials. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.38, p. 288-1294, 1990.

ROSENBERG, M.; TALMON, Y.; KOPPELMAN, I. J. The microstructure of spray-dried microcapsules. **Food Microstructure**. v.7, n.1, Chicago, p. 15-23, 1988.

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

SAHINI, F.; HAN, X. Q. Encapsulation of food ingredients. **Critical review in food science nutrition**. v. 33, n. 6, p. 501-547, 1993.

SAMPAIO, A. L. F.; RAE, G.A.; HENRIQUES, M.G.M.O. Participation of endogenous endothelins in delayed eosinophil and neutrophil recruitment in mouse pleurisy. **Inflammation Research**. v. 49, p. 170-176, 2000.

SAUTEBIN, L. Prostaglandins and nitric oxide molecular targets for anti-inflammatory therapy. **Fitoterapia** v. 71, p. S48-S57, 2000.

SHAIKH, J.; BHOSALE, R.; SINGHAL, R. Microencapsulation of black pepper oleoresin. **Food Chemistry**. v. 94, n.1, p. 105-110, 2006.

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

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

SOOTTITANTAWAT, A. et al. Microencapsulation of l-menthol by spray drying and its release characteristics. **Innovative Food Science Emerging Technologies**. v. 6, p. 163-170, 2005.

SPECTOR, W.G. The mediation of altered capillary permeability in acute inflammation. **Journal of Pathology and Bacteriology**. v. 72, p. 367-380, 1956.

TAMBE, Y.; TSUJIUCHI, H.; HONDA, G.; IKESHIRO, Y.; TANAKA, S. Gastric cytoprotection of non-steroidal anti-inflammatory sesquiterpene,  $\beta$ -caryophyllene. **Planta Medica**. v. 62, p. 469-470, 1996.

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

TAYLOR, L. **Herbal Secrets of the rainforest: Over 50 Powerful Herbs and Their Medicinal Uses**. 2<sup>a</sup> ed. New York: Prima Lifestyles, 1998. 360 p.

THEVENET, F. Acacia Gums: natural encapsulation agent for food ingredients. In: RISCH, S.J.; REINECCIUS, G.A. **Encapsulation and controlled release of food ingredients**. Washington: American Chemical Society (ACS Symposium Series 590), 1995. p. 51-59.

THEVENET, F. Acacia Gums: Stabilizers for flavor encapsulation. In: RISCH, S.J.; REINECCIUS, G.A. **Flavor encapsulation**. Washington DC: American Chemical Society, 1988. p. 37-44.

THIJSSSEN, H.A. Flavour retention in drying preconcentrated food liquids. **Journal Applied Chemical and Biothechnology**. v. 21, n. 12, p. 372-377, 1971.

TOOD, R.D. Microencapsulation and the Flavour Industry. **Flavor Industry**. London, v.1, n.11, p.768, 1970.

TURNER, R. A. **Screening methods in pharmacology**. New York: Academic Press, 1965. v.1, p. 100-58.

TYLER, V. E. The Secrets of Saint-John's-wort. **Prevention**. v. 49, p. 74, feb, 1997.

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

VASCONCELOS, A.F.F.; GODINHO, O.E.S. Estudo preliminar sobre o uso datermogravimetria no estudo de adulterações do óleo de copaíba. **Anais da Associação Brasileira de Química**. v. 50, n. 4, p. 192-196, 2001.

VASCONCELOS, A.F.F.; GODINHO, O.E.S. Uso de métodos analíticos convencionais no estudo da autenticidade do óleo de copaíba. **Química Nova**, v. 25, n.6 B, p. 1057-1606, 2002.

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

VEIGA JR., V.F. **Controle de qualidade de óleos de copaíba por cromatografia gasosa de alta resolução**. 1997. 147f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) - Instituto de Química, Univ. Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1997.

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

VEIGA JR., V.F.; PINTO, A.C. O Gênero Copaifera L. **Química Nova**. v. 25, n. 2, p. 273-286, 2002.

VERBEKEN, D.; DIERCKX, S.; DEWETTINCK, K. Exudate gums: occurrence, production and applications. **Applied Microbiology Biotechnology**. v. 63, p. 10-21, 2003.

VERSIC, R.J. Coacervation for flavor encapsulation. In: RISCH, S. J. REINECCIUS, G.A. **Flavor encapsulation**. Washington D.C.: American Chemical Society, 1988a. p.126-131.

VERSIC, R.J. Flavor encapsulation: An overview. In: RISCH, S. J. REINECCIUS, G.A. **Flavor encapsulation**. Washington DC: American Chemical Society, 1988b. p.1-6.

VINETSKY, Y.; MAGDASSI, S. Microcapsules in Cosmetics. In: MAGDASSI, S.; TOUITOU, E. **Novel Cosmetic Delivery Systems**. New York: Marcel Dekker, 1999. p. 295-314.

VOILLEY, A. Flavor Encapsulation influence of encapsulation media on aroma retention during drying. RISCH, S.J., REINECCIUS, G.A. **Encapsulation and controlled release of food ingredients**. Washington: American Chemical Society (ACS Symposium Series 590), 1995. p.169-179.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R.C.; CHECHINEL-FILHO, V. Fármacos e Fitoterápicos: A necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**. v. 24, n. 1, p.147-152, 2001.

YAMADA, C.S.B. Fitoterapia: Sua história e importância. **Racine**. v. 2, p. 50-51, 1998.

WESTING, L.L.; REINECCIUS, G.A.; CAPAROSO, F. Shelf life of orange oil. Effects of encapsulation by spray drying, extrusion and molecular inclusion. In: RISCH, S.; REINECCIUS, G.A. **Flavor Encapsulation**. Washington DC: American Chemical Society, 1988. p. 110-119.

WENDEL, S.; ÇECIL, M. An overview of spray-drying applications. **Pharmaceutical Technology**. v. 10, p. 127-156, out, 1997.

WINTER, C.; RISLEY, E.; NUSS, G. Carrageen-induced edema in hind paw of rats as an assays for anti-inflammatory drug. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**. v. 111, p. 207-10, 1962.

WOISKY, R.G. **Atividade antiinflamatória, toxicidade e aspectos químicos da óleo- resina de copaíba, proveniente de diferentes espécies e de suas respectivas frações**. 2001. 130f. Tese – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2001.