

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

DESENVOLVIMENTO DE NANOCÁPSULAS CONTENDO ÓLEO-RESINA
DE *Carapa guianensis*

Bolsista: Jackeline de Souza Marinho, CNPq

MANAUS
2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ - REITORIA DE PESQUISA E GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

RELATÓRIO FINAL
PIB-S 0052/2011
DESENVOLVIMENTO DE NANOCÁPSULAS CONTENDO ÓLEO-RESINA
DE *Carapa guianensis*

Bolsista: Jackeline de Souza Marinho, CNPq
Orientadora: Prof^a Dr^a. Tatiane Pereira de Souza

MANAUS
2012

RESUMO

As pesquisas com derivados vegetais estão em contínua expansão visando à elaboração de produtos terapêuticos e cosméticos mais eficazes, seguros e menos danosos ao ser humano e ao meio ambiente. *Carapa guianensis* é uma espécie vegetal que apresenta um óleo, chamado de óleo de andiroba com comprovadas atividades terapêuticas destacando-se a antiinflamatória e antimicrobiana. No entanto, esse produto apresenta cheiro extremamente desagradável, além de baixa estabilidade, o que inviabiliza a elaboração de uma forma farmacêutica. Além disso, a baixa solubilidade e aptidão a oxidação também são problemas que devem ser resolvidos antes da elaboração de qualquer produto final. Nesse contexto, as nanopartículas, constituídas por polímeros biodegradáveis, representam interessante alternativa tecnológica para veiculação desse óleo vegetal. Portanto, o presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de nanocápsulas contendo óleo resina dessa espécie vegetal com finalidade cosmética. Para isso, a princípio, foi realizada a caracterização físico-química de dois lotes de óleo de andiroba oriundos de cooperativas distintas do interior do Amazonas. As nanocápsulas foram elaboradas a partir do óleo que apresentou melhores resultados nessa etapa de caracterização, através do método de deposição interfacial de um polímero pré-formado. A suspensão de nanocápsulas foi caracterizada quanto à densidade relativa, pH, potencial zeta, tamanho de partícula, comportamento reológico e avaliação da estabilidade. Os resultados mostraram que é viável a obtenção de uma suspensão de nanopartículas a partir do método utilizado. No entanto, é necessário um melhoramento da técnica e a adição de outros ensaios que são bastante úteis para atestar a eficiência de encapsulação.

Palavras-chaves: *Carapa guianensis*, nanocápsulas, andiroba, óleo resina.

ABSTRACT

The researches with plant derivatives are continuous expansion aimed at developing therapeutic products and cosmetics more effective, safer and less harmful to humans and the environment. *Carapa guianensis* is a species that has an oil, called oil of Andiroba with proven therapeutic activities highlighting the anti-inflammatory and antimicrobial. However, this product is extremely unpleasant smell, and low stability, which prevents the development of a pharmaceutical form. Furthermore, the low solubility and ability oxidation are also problems that must be resolved before the elaboration of any final product. In this context, nanoparticles consisting of biodegradable polymers represent an interesting alternative technology for broadcasting of vegetable oil. Therefore, this research aims at the development of nanocapsules containing oleo resin of plant species with cosmetic purpose. For this, the principle was carried out physico-chemical characterization of two lots of Andiroba oil from coming from different cooperatives in the interior of Amazonas. The nanocapsules were prepared from the oil showed better results at this stage of characterizing, using the method of interfacial deposition of a preformed polymer. The suspension of nanocapsules was characterized as the relative density, pH, zeta potential, particle size, and evaluation of the rheological stability. The results show that it is possible to obtain a suspension of nanoparticles by the method used. However, improvement is needed of the technique and addition of other tests are useful to demonstrate the efficiency of encapsulation.

Keywords: *Carapa guianensis*, nanocapsules, Andiroba oil resin.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	6
1.1 Objetivo geral.....	7
1.2 Objetivos específicos.....	7
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	8
2.1 Carapa guianensis.....	8
2.1.1 Aspectos gerais.....	8
2.1.2. Aspectos farmacobotânicos.....	2
2.1.3 Aspectos etnofarmacológicos.....	10
2.1.4 Aspectos farmacológicos	10
2.1.5 Aspectos fitoquímicos.....	11
2.2 Nanopartículas poliméricas	12
2.2.1 Aplicações das nanopartículas poliméricas.....	13
2.3 Preparação das nanopartículas	13
2.4 Polímeros biodegradáveis	14
2.5 Caracterização físico-química das nanopartículas	15
2.5.1. Avaliação morfológica.....	16
2.5.2 Distribuição do tamanho de partículas.....	16
2.5.3 Potencial zeta.....	16
2.5.4 Determinação da taxa de associação e da forma de associação do fármaco.....	17
2.6 Estabilidade de suspensões de nanopartículas poliméricas	17
3. METODOLOGIA	18
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
5. CONCLUSÃO	31
REFERÊNCIAS	32

1. INTRODUÇÃO

Os óleos vegetais têm adquirido grande destaque como matéria-prima ativa bastante promissora. São substâncias produzidas por plantas, muitas vezes como mecanismo de defesa contra algum agente patogênico, mas que apresentam interessantes atividades biológicas (MORETTI *et al.*, 2002). Além disso, os óleos vegetais são rapidamente metabolizados pelo organismo, não apresentando metabólitos tóxicos (MORETTI *et al.*, 2002; SIMÕES e SPITZER, 2003).

O óleo de *Carapa guianensis*, denominado popularmente como óleo de andiroba, é conhecido mundialmente por suas propriedades terapêuticas e cosméticas (PENIDO *et al.*, 2005; PENIDO *et al.*, 2006; COSTA-SILVA *et al.*, 2007; VEIGA JUNIOR *et al.*, 2007).

Na medicina indígena, o óleo de andiroba é muito utilizado como anti-reumático, anti-inflamatório e cicatrizante. Os estudos comprovaram essas propriedades terapêuticas (PENIDO *et al.*, 2005; PENIDO *et al.*, 2006). É usado também na fabricação de velas repelentes contra insetos, sabonetes e cosméticos.

Apesar das diversas vantagens e das perspectivas promissoras dos óleos oriundos de espécies vegetais, existem vários obstáculos tecnológicos que dificultam o emprego e comercialização dos mesmos, tais como patentes de processo extrativo, baixa solubilidade, aptidão a oxidação, odor e sabor desagradáveis. Tais obstáculos têm que ser solucionados antes que estes compostos possam ser efetivamente utilizados (MORETTI *et al.*, 2002). Neste contexto, as nanopartículas, constituídas por polímeros biodegradáveis, representam interessante alternativa tecnológica para veiculação desses óleos vegetais e viabilidade de comercialização, uma vez que representa um novo produto tecnológico com vantagens de aumentar a estabilidade do óleo e favorecimento para a elaboração de uma forma farmacêutica com mascaramento do odor característico desses óleos.

Poucas são as pesquisas voltadas para a veiculação de óleos vegetais através de sistemas nanopoliméricos e as existentes demonstram sua eficácia na proteção dos óleos contra degradação ambiental, permitem modular sua liberação, além de prevenir a evaporação no caso dos óleos voláteis (LAI *et al.*, 2006). Nesse sentido, a elaboração de nanocápsulas, onde o núcleo oleoso é o próprio óleo de andiroba, representa uma grande oportunidade terapêutica e econômica, uma vez que as nanocápsulas podem viabilizar o desenvolvimento de uma forma farmacêutica cosmética e/ou cosmeceutica com segurança e eficácia comprovada.

Estudos para a obtenção de emulsões a partir do óleo de andiroba e avaliação de estabilidade foram iniciados pelo nosso grupo de pesquisa. As emulsões contendo óleo de Andiroba foram obtidas com sucesso utilizando Span® 80 e Tween® 20 como surfactante, no entanto, não apresentaram boa estabilidade a longo tempo, justificando maiores estudos para otimização de formulações em sistemas dispersos (FERREIRA *et al.*, 2010).

Sendo assim, o presente trabalho é de grande importância para a Região Amazônica, uma vez que representa o início de pesquisas relacionadas com estudos de processamento tecnológico e desenvolvimento de formas farmacêuticas.

1.1 Objetivo geral

Desenvolver nanocápsulas contendo óleo resina da espécie vegetal *Carapa guianensis*.

1.2 Objetivos específicos

- Caracterizar físico-quimicamente o óleo vegetal de *Carapa guianensis*;
- Preparar a suspensão de nanocápsulas;
- Caracterizar a suspensão de nanocápsulas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Carapa guianensis*

2.1.1 Aspectos gerais

Espécie conhecida, popularmente, como andiroba. Este termo provém da língua indígena (“landi”, óleo e “rob”, amargo). Pode ser encontrada no sul da América Central, como também na Colômbia, Venezuela, Suriname, Guiana Francesa, Brasil, Peru, Paraguai e nas ilhas do Caribe (PENNINGTON *et al.*, 1981). No Brasil, é encontrada em toda a bacia Amazônica, preferencialmente, nas várzeas e áreas alagáveis ao longo dos igapós; frequentemente está associada com ucuúba (*Virola guianensis*) e seringueira (*Hevea brasiliensis*) (CAVALCANTE *et al.*, 1986).

2.1.2 Aspectos farmacobotânicos (FERRAZ *et al.*, 2008)

Árvore: Pode atingir até 55 metros de altura. Possui um fuste cilíndrico e reto de 20-30 metros, podendo apresentar sapopemas. Tem uma copa de tamanho médio, densa e composta por ramos eretos ou com leve curvatura, proporcionando uma sombra intensa. A casca é grossa e amarga e apresenta uma coloração avermelhada. A casca se desprende, facilmente, em grandes placas (Figura 1).

Folhas: são compostas, alternadas e paripinadas, com um vestígio de um folíolo terminal, tomentoso e glandular. Folíolos opostos ou sub-opostos de 3 a 10 pares, de 10-50 cm de comprimento e de 4-18 cm de largura, possuem margens inteiras e apresentam um tom verde-escuro brilhante na superfície superior e glabra na superfície inferior com pelos simples e esparsos na nervura central.

Flor: pequena, com pétalas de, no máximo, 8 mm de comprimento, unisexual, sésseis ou sub-sésseis, glabras, subglobosas de cor branca a creme, levemente perfumada.

Frutos: cápsula globosa e subglobosa com 4-6 valvas, indeiscente ou deiscente que se separam com o impacto da queda do fruto (PENNINGTON *et al.*, 1981).

Sementes: de coloração marrom, possuem suas laterais anguladas devido à compressão mútua. As sementes de um mesmo fruto podem apresentar uma grande variação em tamanho (Figura 2).



Figura 1 – Árvore de *C. guianensis*

FONTE: Retirado de
<salveoplaneta.spaceblog.com.br>
Acesso em: 14 de junho de 2012



Figura 2 – Frutos com sementes de *C. guianensis*

FONTE: Retirado de
<fitoterapia heloisawm.blogspot.com>
Acesso em: 14 de junho de 2012.

Óleo de andiroba: o óleo que é extraído das sementes possui cor amarelo-transparente, solidifica em temperaturas inferiores a 25 °C, com consistência parecida com a vaselina, tem sabor amargo, e rancifica rapidamente após a extração das sementes pelo processo artesanal, sendo considerado impróprio para a alimentação (SILVA, 2005).

A extração do óleo de andiroba das sementes é realizada por 2 métodos distintos (FERRAZ *et al*, 2002):

- **Método artesanal** – processo usado pelas comunidades indígenas e caboclas que consiste em cozinhar as sementes frescas em água por 2 às 3h, em seguida colocá-las em descanso na sombra por algumas semanas. Ao iniciar o processo de desprendimento do óleo, as sementes são descascadas e amassadas. A massa obtida da semente é então colocada sob o sol numa calha inclinada para que o óleo escorra gradativamente.
- **Método industrial** – consiste em quebrar as sementes em pedaços cada vez menores e colocá-los numa estufa a 60 - 70°C. Depois, o material é prensado sob 90°C.

2.1.3 Aspectos etnofarmacológicos

O óleo da andiroba é usado para preparação de sabão e cosméticos. Também pode ser utilizado como repelente. Em pequenas quantidades, o óleo é muito usado contra distensões musculares e demais alterações dos tecidos cutâneos. Na medicina indígena, é utilizado como anti-reumático, anti-inflamatório e cicatrizante. O chá da casca e das flores, também, pode ser usado como remédio para combater infecção bacteriana. O cerne é utilizado como fungicida (HAMMER & JOHNS, 1993).

2.1.4 Aspectos farmacológicos

Estudos farmacológicos têm demonstrado que as principais atividades atribuídas ao óleo de *Carapa guianensis* são as atividades anti-inflamatória e analgésica, principalmente quando se refere ao tratamento de reumatismo e artrites (HAMMER, 1993; LORENZI, 2002).

Penido (2005) , através de pesquisas *in vivo*, concluiu que o óleo de andiroba apresenta notáveis propriedades anti-alérgicas e de anti-hiperalgesia, que estão intimamente ligadas aos seus constituintes químicos.

A avaliação da atividade repelente foi realizada utilizando larvas de *Aedes aegypti*, onde se observou um elevado potencial (MENDONÇA *et al.*, 2005).

O potencial acaricida do óleo de andiroba foi avaliado sobre fêmeas ingurgitadas de *Anocentor nitens* e *Rhipicephalus sanguineus*, coletadas manualmente, de equinos e de cães naturalmente infestados, respectivamente. Observou-se mortalidade das fêmeas ingurgitadas e redução de postura, neste caso, com ovos inférteis, demonstrando eficácia de 100% nas duas espécies em todas as diluições testadas e a potencialidade do uso do extrato de andiroba contra estes parasitas (FARIAS *et al.*, 2009).

Em estudos de toxicidade reprodutiva com ratas *Wistar*, durante 45 dias com administração oral do óleo de andiroba, após análise dos índices de fertilidade, viabilidade, lactação, gestação, relação prole/mãe, percentual de natimorto e massa corpórea da prole, foi visto que o óleo de andiroba não induziu toxicidade materna, efeito abortivo, assim como não alterou o desenvolvimento normal da prole e seus parâmetros comportamentais (COSTA-SILVA *et al.*, 2006). Dessa forma, estes resultados sugerem que o óleo possui baixo potencial teratogênico.

2.1.5 Aspectos fitoquímicos

O óleo de *Carapa guianensis* é constituído principalmente de ácido palmítico, oléico (quase 50%) e linoléico, além de uma fração constituída de limonóides, que são os prováveis responsáveis pela atividade biológica do óleo (AMBROZIM *et al.*, 2000; AMBROZIM *et al.*, 2006). Já foram isolados deste óleo sete limonóides: 17 β -hidroxiazadiradiona, 6 α -acetoxigedunina, 7-deacetoxi-7-oxogedunina, deacetilgedunina, andirobina, gedunina, metilangolesato (AMBROZIM *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2009).

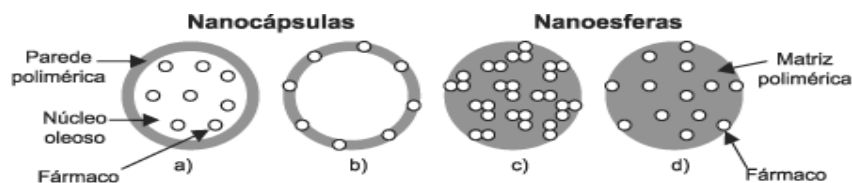
Quimicamente, os limonóides são tetranortriterpenóides altamente oxigenados (SILVA, 2009; MOHAMAD *et al.*, 2009) polaridade moderada, insolúvel em água, todavia

solúvel em hidrocarbonetos, álcool e acetona (ROY *et al.*, 2006). Sua rota biossintética tem origem em um triterpeno que gera um tetranortriterpenóide pela perda de quatro átomos de carbono do precursor original, essa rota envolve várias reações que levam a formação de diferentes estruturas, mas que, geralmente, possuem 26 átomos de carbono no esqueleto básico (SIMÕES, 2007).

2.2 Nanopartículas poliméricas

As nanopartículas são definidas como dispersões de partículas ou partículas sólidas com um tamanho na faixa de 10-1000 nm. O termo nanopartícula é um nome geral usado para designar nanosferas e nanocápsulas, as quais a diferença entre si está na composição e organização estrutural (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

As nanocápsulas são sistemas vesiculares carregadores de fármacos formados por uma membrana polimérica disposta ao redor de um núcleo oleoso, podendo o fármaco estar disperso ou dissolvido no núcleo lipofílico e/ou adsorvido a parede polimérica (REIS *et al.*, 2006; JÄGER, 2008). Quanto às nanoesferas, estas não apresentam núcleo oleoso em sua composição, são formadas por uma matriz polimérica, onde o fármaco pode ficar retido e/ou adsorvido, como mostra a figura 3 (JÄGER, 2008; REIS *et al.*, 2006; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003):



Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas: a) fármaco dissolvido no núcleo oleoso das nanocápsulas; b) fármaco adsorvido à parede polimérica das nanocápsulas; c) fármaco retido na matriz polimérica das nanoesferas; d) fármaco adsorvido ou disperso molecularmente na matriz polimérica das nanoesferas)

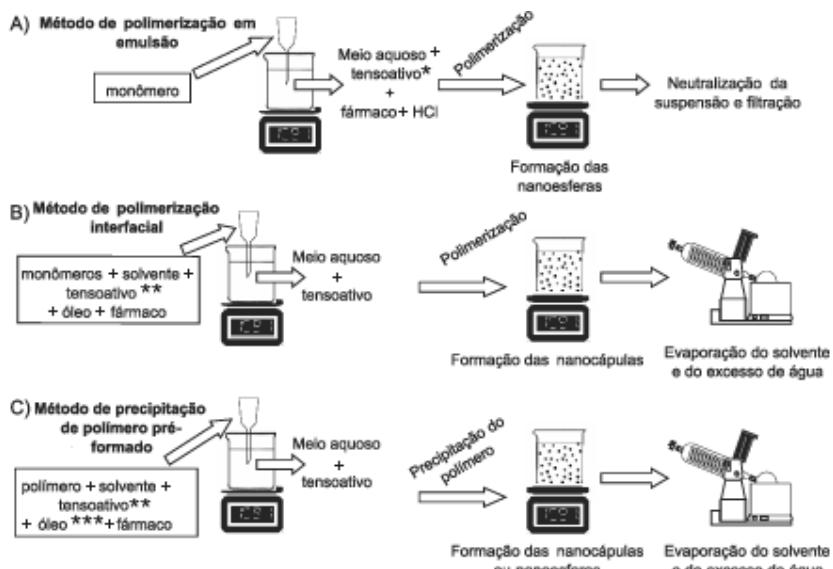
Figura 3 - Nanopartículas poliméricas FONTE: SCHAFFAZICK *et al.*, 2003

2.2.1 Aplicações das nanopartículas poliméricas

As nanopartículas têm sido desenvolvidas visando inúmeras aplicações terapêuticas, sendo planejadas, principalmente, para administração parenteral, oral ou oftálmica. Uma das áreas mais promissoras na utilização das nanopartículas é a vetorização de fármacos anticancerígenos e de antibióticos, principalmente, através de administração parenteral, almejando uma distribuição mais seletiva dos mesmos e, assim, um aumento do índice terapêutico. Com relação à administração oral de nanopartículas, as pesquisas têm sido direcionadas especialmente à: a) diminuição dos efeitos colaterais de certos fármacos, os quais causam frequentemente, irritação à mucosa gastrintestinal e b) proteção de fármacos degradáveis no trato gastrintestinal como: peptídeos, proteínas e/ou hormônios; aumentando a biodisponibilidade dos mesmos. Outro grande interesse nas nanopartículas é sua administração oftálmica, visando o controle da liberação, o aumento da biodisponibilidade ocular e/ou a diminuição dos efeitos colaterais devido à absorção sistêmica de certos fármacos (SCHAFFAZICK, 2003).

2.3 Preparação das nanopartículas

Existem vários métodos descritos na literatura para a preparação de nanopartículas poliméricas, mas de uma forma geral são classificados em métodos baseados na polimerização in situ de monômeros dispersos (cianoacrilato de alquila) ou na precipitação de polímeros pré-formados, tais como poli (ácido lático) (PLA), poli (ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA), poli(ϵ -caprolactona) (PCL) e, ainda, os copolímeros do ácido metacrílico e de um éster acrílico ou metacrílico (REIS et al., 2006; JÄGER, 2008). Na figura 4 podem ser observadas as diferentes etapas dos diferentes métodos de preparação de nanopartículas:



Independente do método de preparação, os produtos são obtidos como suspensões coloidais aquosas. Entretanto, durante o tempo de armazenamento, pode ocorrer a agregação das nanopartículas no meio, resultando na formação de precipitados (SCHAFFAZICK, 2003).

2.4 Polímeros biodegradáveis

A aplicação de materiais poliméricos para propósitos médicos está crescendo muito rápido e, têm sido evidenciado em diversos campos como engenharia de tecidos, implante de dispositivos médicos e órgãos artificiais, próteses, oftalmologia, odontologia, reparo ósseo e outros (CABRAL, 2005).

Sistemas poliméricos de liberação de fármacos são largamente utilizados e não só permitem uma liberação lenta e gradual do ingrediente ativo, como também podem possibilitar o direcionamento a alvos específicos do organismo, como sítios de inflamação ou tumor. Polímeros biologicamente degradáveis incluem, portanto:

Polímeros naturais: são sempre biodegradáveis como, por exemplo, o colágeno, a celulose e a quitosana, os quais são muito utilizados como matrizes em liberação de fármacos. Um exemplo é a aplicação de quitosana enxertada com poli (ácido acrílico), formando um copolímero na confecção de nanoesferas para se estudar a liberação controlada em função do tempo, utilizando-se de eosina, um corante solúvel em água, como marcador.

Polímeros naturais modificados: um problema encontrado em polímeros naturais é que eles freqüentemente levam muito tempo para degradar. Isto pode ser resolvido adicionando-se grupos polares às cadeias, que por serem mais lábeis podem diminuir o tempo de degradação. Exemplos destas modificações podem ser a reticulação de gelatina utilizando-se formaldeído e de quitosana utilizando-se glutaraldeído. Modificações enzimáticas também são utilizadas, como a transformação de quitosana por tirosinase.

Polímeros sintéticos: são também largamente utilizados, como por exemplo, poli (etileno), poli (álcool vinílico), poli (ácido acrílico), poli (acrilamidas), poli (etilenoglicol) e poliésteres. Estes últimos são mais utilizados pelo químico e têm no poli (glicolide) o polímero alifático linear mais simples. O monômero glicolide é sintetizado a partir da dimerização do ácido glicólico e a polimerização por abertura de anel leva a materiais de alta massa molar, com aproximadamente 1-3% do monômero residual (MIDDLETON, 2002).

2.5 Caracterização físico-química das nanopartículas

2.5.1 Avaliação morfológica

Fornece informações a respeito da forma e tamanho das nanopartículas. Para esse fim, se utilizam as microscopias eletrônicas de varredura (MEV) ou de transmissão (MET). Através deste último, é possível diferenciar nanocápsulas de nanoesferas, obtendo-se até mesmo a determinação da espessura da parede das nanocápsulas. Outra técnica que também tem sido empregada é a criofratura e a microscopia de força atômica, a qual fornece

informações com alta resolução em três dimensões, em escala nanométrica, sendo capaz ainda de resolver detalhes de superfície em nível atômico (SCHAFFAZICK, 2003). Feng e colaboradores (2001) empregaram esta técnica visando um estudo morfológico mais detalhado de nanoesferas de PLGA, preparadas empregando-se diferentes emulsificantes. Através do estudo, foi verificada uma topografia complexa na superfície das partículas e, mediante a análise seccional das amostras, foi revelada a presença de pequenas cavidades e de poros.

2.5.2. Distribuição de tamanho de partícula

Após a preparação, as nanopartículas apresentam uma distribuição unimodal, com um baixo índice de polidispersão. Os métodos utilizados para determinar a distribuição de tamanho de nanopartículas consistem em espectroscopia de correlação de fótons e MEV (Microscopia eletrônica de varredura) ou MET (Microscopia eletrônica de transmissão) (SCHAFFAZICK, 2003).

Muitos estudos têm sido desenvolvidos para analisar os fatores que afetam o diâmetro das nanopartículas. Sabe-se que a composição das nanopartículas e o método de preparação das mesmas são fatores determinantes do diâmetro médio e da polidispersão das nanopartículas. No caso das nanocápsulas um fator de grande influência é o óleo utilizado como núcleo (SCHAFFAZICK, 2003).

2.5.3 Potencial zeta

O potencial zeta reflete o potencial de superfície das partículas, o qual é influenciado pelas mudanças na interface com o meio dispersante, em razão da dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso de dispersão (ALONSO apud SCHAFFAZICK, 1991). Este parâmetro é determinado utilizando as técnicas de eletroforese.

Os fosfolípídeos (lecitinas), os poloxamers (copolímeros dos óxidos de etileno e de propileno) e os polímeros constituintes das nanopartículas são os principais componentes presentes nas formulações capazes de influenciar o potencial zeta (LEGRAND, 1991).

Em módulo, um valor de potencial zeta relativamente alto é importante para uma boa estabilidade físico-química da suspensão coloidal, pois grandes forças repulsivas tendem a evitar a agregação em função das colisões ocasionais de nanopartículas adjacentes.

2.5.4 Determinação da taxa de associação e da forma de associação do fármaco

Devido ao tamanho reduzido das nanopartículas é bastante complexo definir a quantidade de fármaco associado a elas. Uma técnica bem utilizada é a ultracentrifugação, na qual a concentração de fármaco livre, presente na suspensão, é determinada no sobrenadante, após a centrifugação. Por sua vez, a concentração total do fármaco é determinada pela completa dissolução das nanopartículas em solvente adequado (SCHAFFAZICK, 2003).

Outra técnica que também é bastante utilizada é a ultrafiltração-centrifugação, na qual uma membrana é empregada para separar parte da fase aquosa dispersante da suspensão coloidal (LEGRAND, 1991).

2.6 Estabilidade de suspensões de nanopartículas poliméricas

Normalmente, as suspensões coloidais não possuem a tendência à separação de fases, até alguns meses após a preparação, pois o processo de sedimentação é lento devido ao pequeno tamanho das partículas e ao movimento browniano que minimiza esse acontecimento. Contudo, com o passar do tempo, pode ocorrer a aglomeração de partículas e sua posterior sedimentação. Existem vários fatores que influenciam nesse processo, como por exemplo, a adsorção de moléculas ativas à superfície das nanopartículas e a presença de tensoativos adsorvidos (MOLPECERES, 1997)

A aplicabilidade industrial de nanopartículas dispersas em meio aquoso pode ser limitada, devido aos problemas de baixa estabilidade físico-química, em períodos de armazenamento prolongados. As principais limitações são a agregação das partículas, a estabilidade química do polímero, do fármaco ou de outras matérias-primas e, ainda, a liberação prematura da substância ativa (SCHAFFAZICK, 2003).

Tendo em vista que estes problemas físico-químicos e microbiológicos possam ser retardados ou evitados através de uma operação de secagem, vêm crescendo o interesse pelo desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas de nanopartículas, ampliando as perspectivas para a utilização clínica destes sistemas carreadores de fármacos. A desidratação das suspensões de nanopartículas tem sido realizada através das operações de sublimação (liofilização) ou de aspersão (“spray-drying” ou nebulização) (PETROVICK, 2000).

3. METODOLOGIA

3.1 Material vegetal

Óleo vegetal de *Carapa guianensis* oriundos dos municípios de Tapauá – AM e Canutama - AM, extraído através de método artesanal.

3.2 Caracterização dos óleos vegetais

Foram caracterizados quanto as suas propriedades químicas e físico-químicas, através da determinação dos ensaios descritos abaixo:

3.2.1 Caracterização organoléptica: observação visual de cor, odor e sabor.

3.2.2 Densidade relativa: foi determinada utilizando picnômetro de acordo com metodologia descrita na Farmacopéia Brasileira (F. BRAS. V, 2010).

3.2.3 Índice de refração: utilizando refratômetro de acordo com a Farmacopéia Brasileira (F.BRAS. V, 2010).

O índice de refração foi determinado a 20°C no comprimento de onda de 589,3 nm.

3.2.4 Avaliação do comportamento reológico (VOIGT e BORNSCHEIN, 1982; MARTINI e col., 2007)

Foi realizada com auxílio de viscosímetro rotacional digital Brookfield, as velocidades de rotação e os spindle foram selecionados com base em determinações preliminares. Assim, foi escolhido o spindle LV 6,2.

3.2.5 Índice de Acidez (F.BRAS. V, 2010)

Expressa, em miligramas, a quantidade necessária de hidróxido de potássio para a neutralização dos ácidos graxos livres em 1 g de amostra.

Pesou-se cerca de 10 g de óleo vegetal em erlenmeyer de 250 ml. Adicionou-se 50 ml de uma mistura de partes iguais etanol:éter (v/v) e o indicador fenolftaleína. Após solubilização completa, titulou-se com hidróxido de potássio 0,1M até observação da cor rosa pálida persistente por 15 segundos.

O índice de acidez foi determinado pela seguinte fórmula (1):

$$IA = \frac{5,610n}{m} \quad (1)$$

Onde: n = volume em ml de KOH gasto na titulação e m = massa de amostra em gramas

3.2.6 Índice de saponificação (F. BRAS. V, 2010)

Expressa, em miligramas, a quantidade de hidróxido de potássio necessária para neutralizar os ácidos livres e saponificar os ésteres existentes em 1 g de substância.

Pesou-se 2 g de óleo vegetal em erlenmeyer de 250 ml, adicionaram-se 25 ml de hidróxido de potássio alcoólico 0,5M SV. Acoplou-se o condensador de refluxo vertical ao frasco e este ficou, sob agitação, em banho-maria por 30 minutos. Adicionou-se 1ml de

fenolftaleína e titulou-se o excesso de hidróxido de potássio alcoólico 0,5 M SV com ácido clorídrico 0,5 M SV. Procedeu-se a determinação do branco.

O índice de saponificação foi fornecido pela seguinte fórmula (2):

$$IS = \frac{V.f.28,05}{m} \quad (2)$$

Onde: V = volume de HCl 0,5M corrigido consumido, f = fator de correção do HCl, se houver e m = massa em g do óleo

3.2.7 Índice de Ésteres (F.BRAS. V, 2010)

Expressa a quantidade de hidróxido de potássio, em miligramas, necessária para a saponificação dos ésteres presentes em 1 g da amostra. É calculado a partir do índice de saponificação (IS) e do índice de acidez (IA), conforme a fórmula (3):

$$IE = IS - IA \quad (3)$$

3.2.8 Índice de peróxidos (F.BRAS. V, 2010)

É o número que exprime, em miliequivalentes de oxigênio ativo, a quantidade de peróxido em 1000 g de substância.

Pesou-se 5 g da amostra de óleo vegetal em erlenmeyer de 250 ml. Adicionou-se 30 ml de uma mistura de ácido acético glacial e clorofórmio (4:3 v/v). Agitou-se até dissolução da amostra e juntou-se 0,5 ml de solução saturada de iodeto de potássio. Agitou-se durante 1 minuto, exatamente, e adicionou-se 30 ml água. Titulou-se com tiosulfato de sódio 0,01 M, adicionando, lentamente, sem cessar a agitação energética até que a coloração amarela tivesse quase desaparecido. Acrescentou-se 5 ml de solução de amido. Continuou-se a titulação agitando energicamente, até desaparecido da coloração. Realizou-se ensaio em branco nas mesmas condições.

Calcula-se o índice de peróxidos pela seguinte fórmula (4):

$$IP = \frac{10.(n1-n2)}{m} \quad (4)$$

Onde: $n1$ = volume em ml de tiosulfato de sódio 0,01 M consumido, $n2$ = volume em ml de tiosulfato de sódio 0,01 M consumido no branco.

3.3 Desenvolvimento das nanocápsulas

3.3.1 Preparação das nanocápsulas

As suspensões de nanocápsulas foram preparadas pelo método de deposição interfacial de um polímero pré-formado (FESSI e col., 1989; SPEISER, 1998) empregando-se como os seguintes constituintes:

- Fase orgânica: óleo de andiroba0,825 mL
 - span 60®.....191,5 mg (tensoativo lipofílico)
 - poli-ε-caprolactona250,0 mg (polímero)
 - acetona P.A.....133,5 ml
- Fase aquosa: tween 80®191,50 mg (tensoativo hidrofílico)
 - água destilada.....133,25 ml

3.3.2 Técnica de preparação

A fase orgânica, após mistura dos componentes, foi vertida lentamente sobre a fase aquosa, mantida sob agitação moderada. De acordo com esta técnica de preparação, as nanocápsulas se formam imediatamente após mistura das fases dando origem a uma suspensão coloidal a qual foi concentrada a um volume final de 50 ml utilizando-se rotavapor.

3.4 Caracterização da suspensão de nanocápsulas

3.4.1 Densidade relativa da suspensão de nanocápsulas: foi determinada utilizando

picnômetro de acordo com metodologia descrita na Farmacopéia Brasileira (F. BRAS. V, 2010).

3.4.2. Determinação do pH da suspensão de nanocápsulas: foi determinada utilizando um potenciômetro digital calibrado com solução tampão pH 4 e 7. O teste foi realizado em triplicata, de acordo com a metodologia descrita na Farmacopéia Brasileira (F. BRAS. V, 2010).

3.4.3 Análise morfológica das nanopartículas: foi realizada utilizando microscópio invertido (Leica), para avaliação da conformação da nanopartícula.

3.4.4 Determinação do potencial zeta: o potencial zeta das nanocápsulas foi estabelecido em equipamento Zetasizer® (MULLER e SCHUHMANN, 1996).

3.4.5 Avaliação do comportamento reológico (VOIGT e BORNSCHEIN, 1982; MARTINI e col., 2007)

Foi realizada com auxílio de viscosímetro rotacional digital Brookfield, as velocidades de rotação e os spindle foram selecionados com base em determinações preliminares. Assim, foi escolhido o spindle LV 6,2.

3.4.6 Teste de centrifugação (SEILLER e PUISIEUX, 1983)

A avaliação da estabilidade das formulações frente á centrifugação foi realizada empregando-se 5 g da amostra de suspensão de nanocápsulas, centrifugando-se a 3000 rpm, durante 30 minutos.

3.5 Estatística

Os resultados dos experimentos foram expressos através de média aritmética e desvio padrão.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização dos óleos vegetais

Os dados de caracterização físico-química dos óleos são fundamentais para direcionar a aplicação dos mesmos e atestar o estado de conservação. Mediante os resultados expressos na tabela 1, observou-se que o óleo em melhor estado de conservação é o oriundo do segundo lote, pois apresentou valores mais adequados quanto aos índices analisados, apresentando assim menor nível de oxidação. Dessa forma, utilizou-se o óleo derivado do segundo lote para a preparação das nanocápsulas.

Ensaio	Lote 1 X ± s	Lote 2 X ± s
Identificação organoléptica	Líquido denso, amarelo escuro, odor característico-aromático, sabor amargo e desagradável.	Líquido denso, amarelo pardo, odor característico-aromático, sabor amargo e desagradável.
Densidade relativa (g/ml)	0,907±3,21	0,872 ± 0,06
Índice de refração	1,464	1,502
Índice de acidez (mgKOH/g)	23,55 ±0,112	13,65 ± 2,74
Índice de saponificação (mgKOH/g)	198,20±2,67	47,33±2,46
Índice de ésteres (mgKOH/g)	174,65	44,87
Índice de peróxidos	Não apresentou	Não apresentou

Tabela 2 – Caracterização dos óleos vegetais.

Quanto ao comportamento reológico, o óleo de andiroba apresentou um comportamento newtoniano, ou seja, com o aumento da velocidade a viscosidade ficou constante e permaneceu assim, como pode ser observado no gráfico (1):

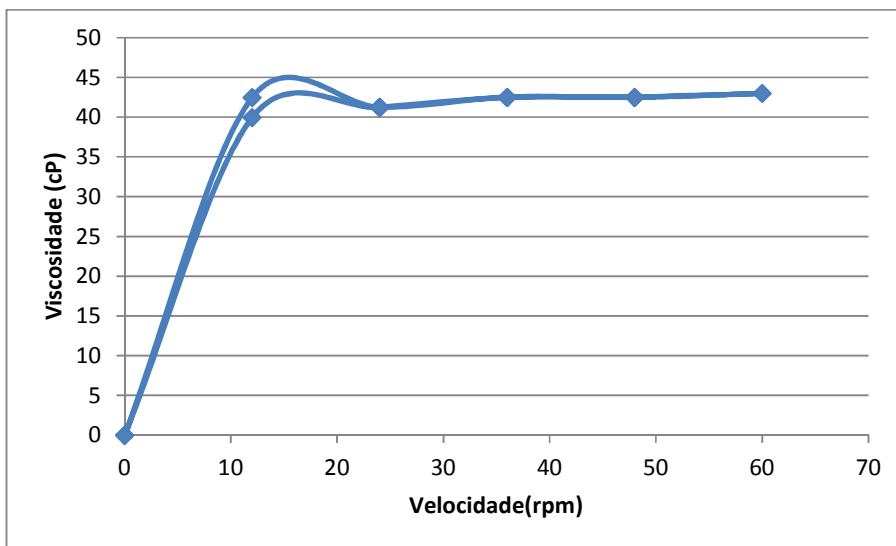


Gráfico 1 – Reograma do óleo de andiroba

4.2 Caracterização da suspensão de nanopartículas

De acordo com Fessi (1989), após a fase orgânica ser vertida sobre a fase aquosa, se a suspensão resultante apresentar aspecto leitoso é indicativo da formação de nanocápsulas, e isso foi observado na suspensão preparada, cujas características físico-químicas estão descritas na tabela (4).

Ensaio	Resultados $\bar{X} \pm s$
Aparência	Líquido branco leitoso.
Densidade relativa	0,982 g/ml
pH	4,1
Potencial zeta	-35,1 \pm 0,7
Tamanho das nanopartículas	399,5 \pm 6,45 nm
Índice de polidispersão	0,498 \pm 0,28

Tabela 4 – Caracterização da suspensão de nanopartículas

A densidade apresentou-se próxima à densidade relativa da água, e o pH mostrou-se levemente ácido.

As partículas apresentaram, em módulo, um potencial zeta alto, o que é um bom parâmetro para a estabilidade físico-química da suspensão de nanocápsulas, pois previne que as nanopartículas se agreguem (SCHAFFAZICK, 2003).

O tamanho das nanopartículas, geralmente, varia entre 100 e 500 nm. No entanto, partículas acima de 300 nm são mais rapidamente reconhecidas pelo sistema fagocitário mononuclear e facilmente retiradas da circulação (LEGRAND *et al*, 1999). Portanto, o tamanho médio das nanopartículas analisadas apresentou um tamanho dentro do esperado, porém o ideal seria abaixo de 300 nm. No entanto, esse valor pode representar um valor não real, pois a amostra de suspensão de nanopartículas passou por um congelamento indevido, o que pode ter levado a uma agregação de partículas, aumentando o tamanho das mesmas e

fazendo com que elas não apresentassem uma uniformidade de tamanho entre si, por isso, elevando o índice de polidispersão.

4.2.1 Comportamento reológico da suspensão de nanopartículas

A avaliação do comportamento reológico demonstrou que a suspensão de nanopartículas não apresentou histerese, ou seja, embora a viscosidade modifique com o aumento da tensão de cisalhamento, esta permanece igual na retirada da tensão. Isso demonstra que a suspensão não apresentou tixotropia, ou seja, retornou ao ponto original após cada tensão cizalhamento. No entanto, demonstrou um comportamento dilatante, visto que, a viscosidade aumentou com o aumento da velocidade de cisalhamento (gráfico2).

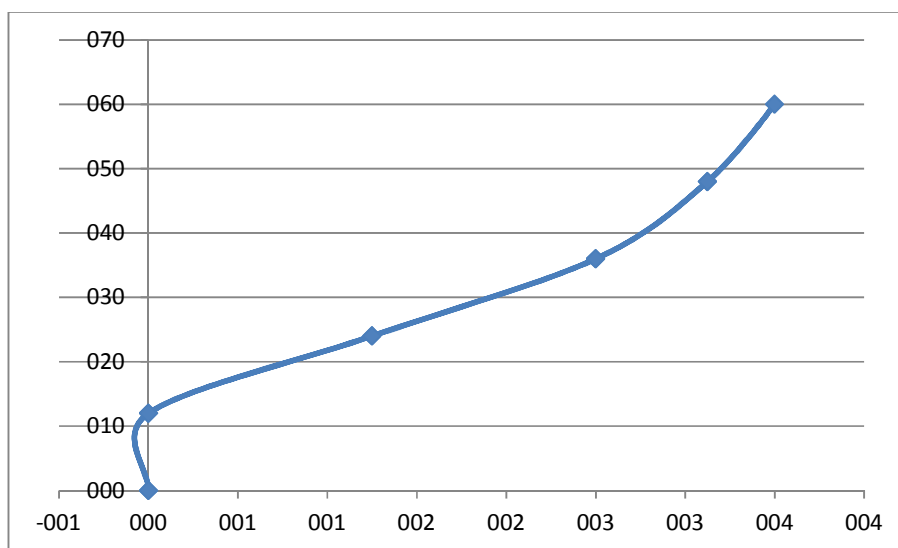


Gráfico 2 – Reograma da suspensão de nanopartículas.

4.2.2 Análise morfológica

Para ter uma ideia à respeito da morfologia das nanocápsulas foi realizada uma avaliação da suspensão de nanopartículas em microscópio invertido e também foi feita uma comparação com a morfologia apresentada por nanoemulsões (cedidas pelo laboratório de Desenvolvimento Galênico da UFRGS).

Na figura 5, especialmente na partícula circulado de vermelho, pode ser visualizada uma estrutura que apresenta um envoltório espesso, com um núcleo oleoso. A partir, dessas características pode-se sugerir a formação de nanocápsulas.

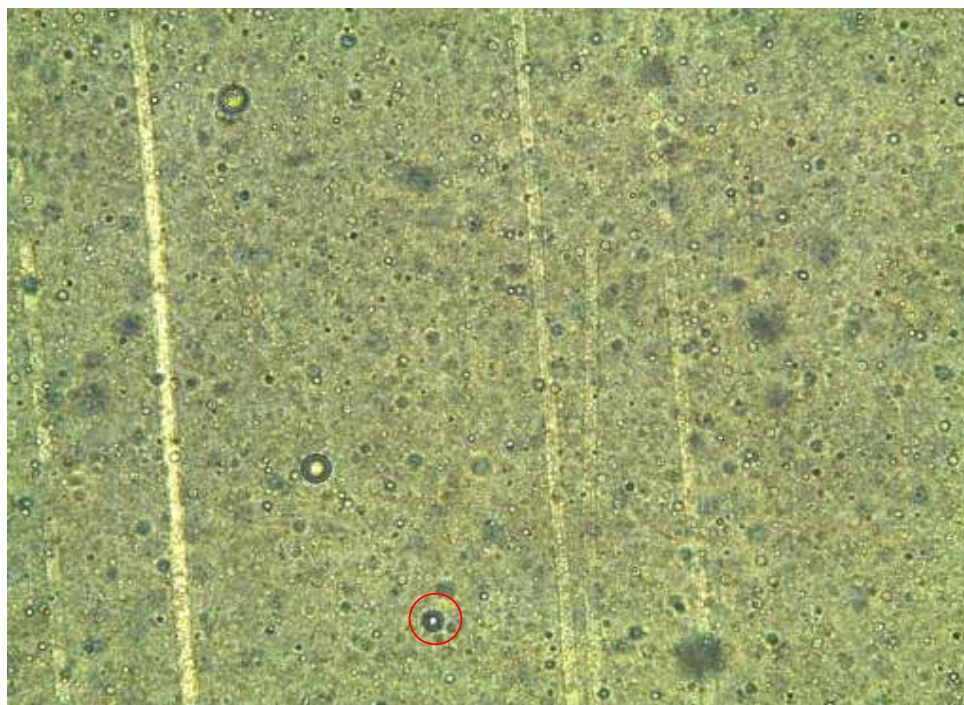


Figura 5 – Morfologia microscópica de nanocápsulas

Na figura 6, a qual representa a análise morfológica de nanoemulsões, pode-se diferenciar claramente quanto ao aspecto estrutural das nanocápsulas. As nanoemulsões apresentam-se maiores, refringentes, com envoltório menos espesso, aparentando o óleo está mais exposto.

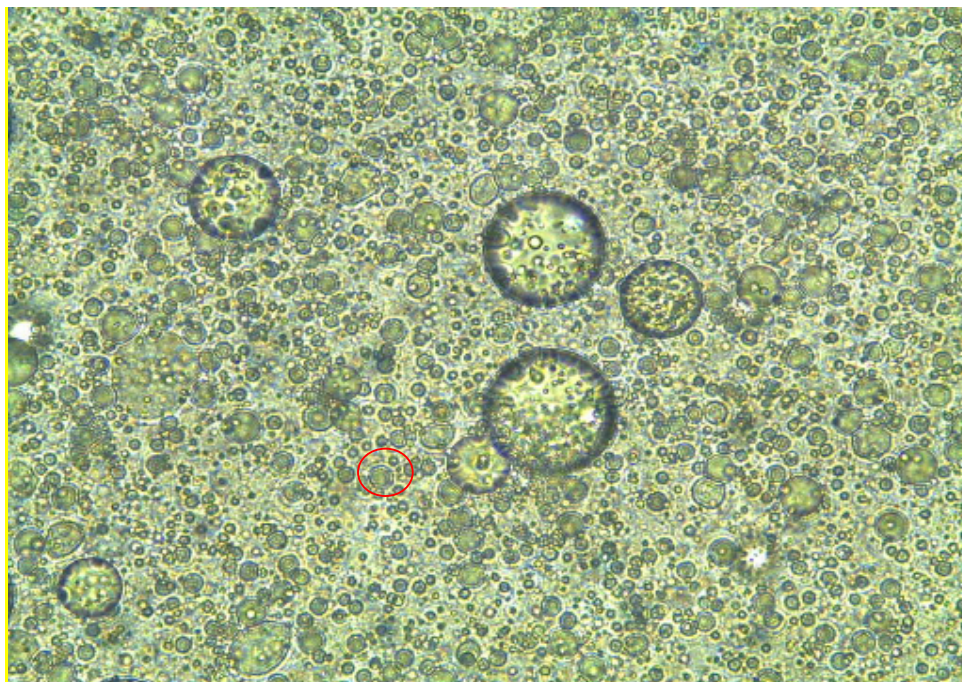


Figura 6 – Morfologia microscópica de nanoemulsões

4.2.2 Teste de centrifugação

O teste de centrifugação é um dos parâmetros que demonstra o nível de estabilidade. Na figura 7, o tubo à esquerda corresponde a suspensão de nanopartículas que ainda não havia sido submetida a centrifugação, por isso é possível visualizar que a suspensão apresenta-se homogênea, sem separação de fases e sem sedimento no fundo do tubo.



Figura 7 – Tubos antes e após o teste de centrifugação

O tubo à direita mostra a suspensão após ter sido submetida a centrifugação. É possível visualizar um sedimento ao fundo do tubo e uma gotícula de óleo. Este resultado sugere que houve rompimento de nanocápsulas e, por isso, ocorreu deposição de polímeros e liberação de óleo, o que demonstra que são necessários maiores estudos para aumentar a estabilidade das nanopartículas.

CONCLUSÃO

A caracterização físico-química dos dois óleos, oriundos de fontes diferentes, demonstrou que apenas um dos óleos estava em melhor estado de conservação, ou seja, com menores níveis de oxidação e menos alterado, por isso, este foi utilizado para compor a formulação da suspensão de nanocápsulas. Dessa forma, após a preparação das nanocápsulas, estas foram caracterizadas, e os resultados sugeriram que houve a formação de nanocápsulas, ou seja, o óleo de *Carapa guianensis* foi incorporado ao polímero. O método utilizado para a preparação da suspensão de nanocápsulas mostrou-se eficaz para tal procedimento, mediante a análise dos resultados obtidos. No entanto, são necessários maiores estudos para o melhoramento do método e da formulação, para que assim aprimore a viabilidade de obtenção de nanocápsulas contendo óleo de *Carapa guianensis*, e também a estabilidade da suspensão, podendo assim ser incorporado em cosméticos e compor fitoterápicos.

REFERÊNCIAS

COSTA-SILVA, J.H.; LYRA, M.M.A.; LIMA, C.R.; ARRUDA, V.M.; ARAÚJO, A.V.; RIBEIRO E RIBEIRO, A. A toxicological evaluation of the effect of *Carapa guianensis* Aublet on pregnancy in Wistar rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 112, p.122–1266, 2007.

DIN 66145. Darstellung von Korn-(teilchen-)größenverteilungen - RRSB-Netz. In: DINTaschenbuch 133 - Particlemeßtechnik Normen. 3. Auf. Beuth, Berlin, 191-193, 1997.

EBRAHIMZADEH, H.; YAMINI, Y.; SEDKON, F.; CHALOOSI, M. Chemical composition of the essential oil and supercritical CO₂ extracts of *Zataria Multiflora* Boiss. *Food Chemistry*. 83, p. 357-361, 2003.

FARIAS, M. P. O. SOUSA, D. P; ARRUDA, A. C; WANDERLEY, A. G; TEXEIRA, W. C; ALVES, L. C; FAUSTINO, M. A. G. Potencial acaricida do óleo de andiroba *Carapa guianensis* Aubl. sobre fêmeas adultas ingurgitadas de *Anocentor nitens* Neumann, 1897 e *Rhipicephalus sanguineus* Latreille, 1806. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.61, n.4, 877- 882, 2009.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA V, 5. Ed.,São Paulo:Atheneu 2010.

FERREIRA, M.R.A.; OLIVEIRA, E.E.; SANTIAGO, R.R.; DE SOUZA, T.P.; EGITO, E.S.T; SOARES, L.A.L. Development and evaluation of emulsions from *Carapa guianensis* (Andiroba) oil. *AAPS PharmSciTech*. 11, p. 1383-1390, 2010.

FESSI, H., PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J.P.; AMMOURY, N.; BENITA, S. Nanocapsules formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *International Journal of Pharmaceutics* 55, 1-4, 1989.

HOFFMANN, F.; CINATL Jr., J.; KABICKOVÁ, H.; CINATL, J.; KREUTER, J.; STIENEKER, F.; *Int. J. Pharm.* 1997, 157, 189.

JÄGER, E. Controle da liberação do éster etílico de endometacina a partir de nanocápsulas poliméricas através da variação da concentração de monoestereato de sorbitano. Porto Alegre. 2008. 130pg. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas. Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.

LAI, F.; WSSING, S.A.; MÜLLER, R.H.; FADDA, A.M. Artemisia arborescens essential oil loaded solid lipid nanoparticles for potencial agricultural applications: preparation and characterization. *AAPS PharmSciTech* 7, E1 – E9, 2006.

LEE, M. R.; SONG, Y.S.; HWANG, B.H.; CHOU, C.C. Determination of amphetamine and methamphetamine in serum via headspace derivatization solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectroscopy. *Journal of Chromatography A.* 896, 265-273, 2000.

LEGRAND, P.; BARRATT, G.; MOSQUEIRA, V.; FESSI, H.; DEVISSAGUET, J-Ph.; *S.T.P. Pharma Sci.* 1999, 9, 411.

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

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

MIDDLETON, J. C., TRIPTON, A. J. Synthetic Biodegradable Polymers as Medical Devices. Disponível em <http://www.devicelink.com/mpb/archive/98/03/002.html>.>Acesso em Janeiro de 2012.

MIOT, H.A.; BATISTELLA, R.F.; BATISTA, K.A.; VOLPATO, D.E.C.; AUGUSTO, L.S.T.; MADEIRA, N.G.; HADDAD Jr, V.; MIOT, L.D. Comparative study of the topical effectiveness of the andiroba oil (*Carapa guianensis*) and DEET 50% as repellent for *Aedes* sp. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 45, 5, 253-256, 2004.

MORETTI, M.D.L.; SANNA-PASSINO, G.; DEMONTIS, S.; BAZZONI, E. Essential oil formulations useful as a new tool for insect pest control. *AAPS PharmSciTech* 3, 1-11, 2002.

MOHAMAD, K; HIRASAWA, Y; LITAUDON, M; AWANG, K; HADI, H, A; TAKEYA, K; EKASARI, W; WIDYAWARUYANTI, A; ZAINI, N, C; MORITA, H. Ceramicines B–D, new antiplasmodial limonoids from *Chisocheton ceramicus*. *Bioorganic & Medicinal Chemical* v. 17, 727–730, 2009.

MÜLLER, C.R.; SCHAFFAZICK, S.R.; POHLMANN, A.R.; DE LUCCA FREITAS, L.; PESCE DA SILVEIRA, N.; DALLA COSTA, T.; GUTERRES, S.S. Spray-dried diclofenac poly(ϵ -caprolactone) nanocapsules and nanospheres. Preparation and physicochemical characterization. *Pharmazie* 56, 11, 864-867, 2001.

MÜLLER, R.H.; SCHUHMANN, R. Teilchengrößenmessung in der Laborpraxis. APV Paperback; Band 38, Stuttgart: WVG, 1996.

ORELLANA, B. J. P; KOBAYASHI, E. S; LOURENÇO, G. M. Terapia alternativa através do uso da andiroba. *Lato & Sensu*, V. 5, n.1.

PAULA, J.P.; GOMES-CARNEIRO, M.R.; PAUMGARTTEN, J.R. Chemical composition, toxicity and mosquito repellency of *Ocimum selloi* oil. *Journal of Ethnopharmacology* 88,253-260, 2003.

PENIDO, C., CONTE, F.P., CHAGAS, M.S.S., RODRIGUES, C.A.B., PEREIRA, J.F.G., HENRIQUES, M.G.M.O. Antiinflammatory effects of natural tetranortriterpenoids isolated from *Carapa guianensis* Aublet on zymosan-induced arthritis in mice. *Inflammatory Research*. 55, p. 457–464, 2006.

POHLMANN, A.R.; WEISS, V.; MERTINS, O.; PESCE DA SILVEIRA, N.; GUTERRES, S.S. Spray-dried Indomethacin-loaded polyester nanocápsulas and nonospheres: development, stability evaluation and nanostructures models. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 16, 305-312, 2002.

POMBEIRO, A. J. L. O.; Técnicas e operações unitárias em química laboratorial, 3a ed., Calouste Gulbenkian: Lisboa, 1998.

REIS, P.C.; NEUFELD, J.R.; RIBEIRO, J.A.; VEIGA, F. Nanoencapsulation I: Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine Journal*, v. 2, p. 8-21, 2006.

ROY, A; et al. Limonoids: Overview of Significant Bioactive Triterpenes Distributed in Plants Kingdom. *Biol. Pharm. Bull.* v. 29 (2) 191-201. 2006.

SCHAFFAZICK, Sheila Rezende; GUTERREZ, Sílvia. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Quim. Nova*, Vol. 26, No. 5, 726-737, 2003.

SEIJO, B.; FATTAL, E.; TREUPEL, L. R.; COUVREUR, P.; *Int. J. Pharm.* 1990, 62,

SEILLER, M. ; PUISIEUX, F. Galênica 5 – les systèmes dispersés : I – agents de surfasse et émulsions. Paris : Technique et Documentation (Lavoisier), 1983.

SILVA, V. P.; OLIVEIRA, R. R.; FIGUEIREDO, M. R. Isolation of limonoids from seeds of *Carapa guianensis* Aublet (Meliaceae) by high-speed countercurrent chromatography. *Phytochemical Analysis*, v.20 (1), 77-81. 2009.

SIMÕES, C.M.O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5. ed. Porto Alegre:UFRGS, Florianópolis:UFSC, 2003. Cap. 18, p. 467.

SPEISER, P.P. Nanopartikel. In: MÜLLER, R.H.; HIDELBRAND, G.E. *Pharmazeutische Technologie: Moderne Arzneiformen*. 2. Auf. Stuttgart: WVA, 1998.

VEIGA JUNIOR, V.F.; ROSAS, E.C.; CARVALHO, M.V.; HENRIQUES, M.G.M.O.; PINTO, A.C. chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne—a comparative study. *Journal of Ethnopharmacology* 112, 248–254, 2007.

VOIGT, R.; BORNSCHEIN, M. *Tratado de tecnologia farmacêutica*. Zaragoza: Acribia, 1982.

