

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

RODRIGO JOSÉ LUPATINI NOGUEIRA

AVALIAÇÃO DA PERMEAÇÃO CUTÂNEA DO FÁRMACO IBUPROFENO
UTILIZANDO O ÓLEO DE COPAÍBA COMO PROMOTOR DE ABSORÇÃO EM
MODELOS EXPERIMENTAIS *IN VITRO* E *IN VIVO*.

JUIZ DE FORA, MG

2014

RODRIGO JOSÉ LUPATINI NOGUEIRA

AVALIAÇÃO DA PERMEAÇÃO CUTÂNEA DO FÁRMACO IBUPROFENO
UTILIZANDO O ÓLEO DE COPAÍBA COMO PROMOTOR DE ABSORÇÃO EM
MODELOS EXPERIMENTAIS *IN VITRO* E *IN VIVO*.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração em Produtos Naturais Bioativos, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito para obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Ademar Alves da Silva Filho

JUIZ DE FORA, MG
2014

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Nogueira, Rodrigo José Lupatini.

Avaliação da permeação cutânea do fármaco ibuprofeno utilizando o óleo de copaíba como promotor de absorção em modelos experimentais "in vitro" e "in vivo". / Rodrigo José Lupatini Nogueira. -- 2014.

82 f.

Orientador: Ademar Alves da Silva Filho

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2014.

1. ibuprofeno. 2. óleo de copaíba. 3. promotor de permeação.
I. da Silva Filho, Ademar Alves, orient. II. Título.

*“Mas é claro que o sol vai voltar amanhã
Mais uma vez, eu sei
Ecuridão já vi pior, de endoidecer gente sã
Espera que o sol já vem.
Quem acredita sempre alcança!”
(Renato Russo)*

A Deus

“Grande foi a luta, maior a vitória.

Sempre estiveste comigo.

Muitas vezes, pensei que este momento nunca chegaria.

Queria recuar ou parar, no entanto Tu estavas presente,
na alegria ou na tristeza, fazendo da derrota uma vitória, da fraqueza uma força.

Com Tua ajuda venci. A emoção é forte.

Não cheguei ao fim, mas ao início de uma longa caminhada.

Quero, Deus, agradecer-te pela incomparável e inconfundível bondade, por estar
sempre comigo, compreendendo os meus anseios, me dando coragem para
atingir o meu objetivo, trilhando meu caminho.”

Boanerges e Celia

“De vocês recebi o dom mais precioso do universo: A VIDA.
De cada noite não dormida nos primeiros dias de minha vida;
da emoção estampada em suas faces ao me verem ensaiando os primeiros passos;
da preocupação dispensada a minha saúde e a minha educação;
de muitas vezes terem sido o bote salva-vidas nas minhas tempestades;
mas também de me ralharem quando disso carecia;
de me tolerarem quando não era tolerável;
até mesmo de errarem e com isso me ensinarem a questionar,
nasceu a minha personalidade,
e dela nasceu a conquista desse meu sonho, que, por isso,
foi, na verdade realizado por vocês, **pai e mãe.**”
Se eu pudesse fazê-los eternos...
Eternos eu os faria.
A vocês, pai e mãe, não mais que com justiça, dedico esta vitória.
Obrigado pelo apoio que me deram em todos os momentos
e pela presença constante em meu coração.

Ana Paula e Sulimar

Obrigado a vocês, minhas queridas irmãs, que se fizeram, se fazem e sempre se farão
presentes nos momentos da minha vida. Sem vocês, sem a compreensão
de vocês, conselhos e ajuda, jamais eu teria conseguido.
Gostaria que soubessem que as amo muito.
A vocês, muito obrigado.

Vanessa

A você Paxion que é minha companheira, amiga, conselheira e mulher, não poderia de deixar de lhe agradecer por estar ao meu lado em todos os momentos da minha vida. Obrigado por ter entrado na minha vida e por me fazer feliz! Peço a Deus que continue iluminando e fortalecendo nossa união e nossa família, pois estes são os maiores bens que um homem pode conquistar.

Manuela

Minha filha linda e amada. Chegou há tão pouco tempo e me despertou a maior revolução de sentimentos que já tive nesses quase quarenta anos de idade. Seu amor puro, singelo e honesto é a fonte de toda minha vontade de viver e continuar acreditando na existência de Deus.

Papai te ama muito filha!

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Ademar Alves da Silva Filho por aceitar me orientar, pelo apoio, pela preocupação, pela paciência e amizade demonstrados durante estes dois anos de convivência.

Ao Prof. Dr. Jorge Willian Leandro Nascimento, pelo ensino, orientação, amizade e preocupação constante durante o período do meu mestrado. O meu sincero obrigado amigo.

Ao Prof. Dr. José Otávio do Amaral Corrêa, pelo incentivo e ajudas preciosas que, certamente, foram essenciais para a conclusão deste trabalho.

Aos Professores Dra. Elita Scio e Dr. Richard Michael Grazul pela parceria e ajuda para realização dos meus experimentos.

À Dra. Zaida Maria Faria de Freitas e toda a equipe do Laboratório Ladeg da UFRJ pela acolhida em seu laboratório e inestimável ajuda a desenvolver parte deste trabalho.

Aos amigos e mestres Nícolas de Castro Campos Pinto e Josiane Mello da Silva pela amizade e auxílio durante todo o tempo em que estive no laboratório de Bioquímica do ICB/UFJF.

Ao mestre Arthur Girardi Carpanez pela ajuda nas análises realizadas no departamento de Química da UFJF.

Às estagiárias Marcella e Milainy pela ajuda, esforço e dedicação durante a parte experimental do meu trabalho no Laboratório de Farmacologia do ICB/UFJF.

Aos amigos do Laboratório NIPPAN da Faculdade de Farmácia da UFJF pela ajuda, incentivo e amizade sincera.

Aos amigos da turma de mestrado pela convivência e aprendizado.

Aos amigos e mestres Anderson de Oliveira Ferreira e Gustavo Rezende Bellei de Oliveira pela constante ajuda e incentivo para realização das minhas análises.

Às empresas Medisca (Canadá), Beraca e Fripai pela colaboração no envio de amostras, fornecimento de matérias-primas e materiais que foram essenciais para a realização deste trabalho.

Ao amigo e irmão Luis Cláudio de Lima pelo companheirismo, força, incentivo e ajuda. À você deixo meu eterno agradecimento.

Aos meus sobrinhos queridos Paulo Roberto Lupatini Fontes e João Pedro Lupatini Fonte pelo carinho e incentivo.

Ao Sr. José Roberto Vieira Pinheiro e Dona Ana Maria Alves Pinheiro pelo incentivo e torcida em todos os momentos.

A todos os meus familiares e amigos e em especial ao meu padrinho Paulo Roberto Fois pelo exemplo e amizade eterna.

RESUMO

A administração de medicamentos na pele através da via transcutânea é uma prática que tem sido utilizada pela humanidade ao longo de milênios. Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) apresentam-se como uma classe de fármacos de interesse para o desenvolvimento de formulações transcutâneas já que apresentam efeitos gastrointestinais graves ao serem utilizados para o tratamento crônico de doenças, como por exemplo artrite reumatóide. Entre os fármacos desta classe, o ibuprofeno (IBU) representa um bom candidato para a permeação cutânea, já que apresenta baixo peso molecular (206,28), coeficiente de partição ($\log P$) inferior a 4 e curta meia vida plasmática. Uma estratégia efetiva para facilitar a passagem de fármacos pela pele é o emprego de promotores de permeação na pele. Recentemente, alguns trabalhos vem relacionando o uso de terpenos e óleos naturais ricos em terpenos na promoção de permeação cutânea de fármacos. O óleo de copaíba, devido ao seu rico conteúdo em terpenos, apresenta-se como uma ótima escolha de promotor de permeação de fármacos administrados na pele. Neste trabalho foram desenvolvidas duas formulações em creme contendo IBU 5% com duas concentrações diferentes de óleo de copaíba: IBOC5, contendo 5% de óleo de copaíba e IBOC10, com 10% do mesmo óleo. Os ensaios de permeação e penetração *in vitro* do IBU foram realizados utilizando-se pele de orelha suína como membrana biológica no aparelho de células de difusão vertical do tipo *Franz*. Já a avaliação da permeação *in vivo* foi realizada através do teste de atividade anti-inflamatória induzida pelo óleo de cróton em orelhas de camundongos. O fluxo de permeação (J) do IBU nas amostras IBOC5 ($35,72 \pm 6,35$) e IBOC10 ($29,78 \pm 2,41$) foram superiores ($p < 0,01$ e $p < 0,05$, respectivamente) ao creme controle, sem óleo de copaíba ($10,32 \pm 1,52$) e produto comercial ($14,44 \pm 2,39$). Na análise de penetração, a quantidade de IBU nas amostras IBOC5 e IBOC10 foi maior ($p < 0,01$ e $p < 0,05$, respectivamente) na derme quando comparada à epiderme. No ensaio *in vivo*, as amostras IBOC5 e IBOC10 reduziram ($p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente) o processo inflamatório quando comparadas ao controle negativo, entretanto, não foram diferentes ($p > 0,05$) do controle positivo. Face aos resultados, pode-se concluir que a adição do óleo de copaíba apresentou capacidade de promoção de permeação e penetração cutânea do ibuprofeno nas amostras em creme para o teste de células de difusão *in vitro*. Já o modelo *in vivo* de edema de orelha em camundongos, sugere-se que este não foi o teste mais adequado para avaliação da permeação do ibuprofeno nas amostras analisadas.

Palavras-chave: 1. ibuprofeno. 2. óleo de copaíba. 3. promotor de permeação.

ABSTRACT

The administration of medications on the skin through transcutaneous route is a practice that has been used by mankind for millennia. The non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) have been shown to be a class of drugs of interest for transcutaneous formulation development, since they present severe gastro-intestinal effects when used for treatment of chronic diseases such as rheumatoid arthritis. Among drugs of this class, Ibuprofen (IBU) is considered a good candidate for skin permeation, since it has a low molecular weight (206.28), partition coefficient ($\log P$) lower than 4 and short plasma half-life. Therefore, an effective strategy to facilitate the drug diffusion through the skin is the use of permeation enhancers. Recently, some studies have been reporting the use of terpenes and natural oils rich in terpenes and their roles in promoting cutaneous drug penetration. Copaiba oil, due to its rich content of terpenes, presents itself as a great choice of penetration enhancer for drugs administered on the skin. In this study, two cream formulations containing 5% of IBU were developed: IBOC5 with 5% of Copaiba oil and IBOC10 with 10% of the same oil. *In vitro* cutaneous penetration/permeation studies of IBU were performed using pig ear skin as biological membrane in the Franz-type diffusion cells. *In vivo* permeation tests were also performed through anti-inflammatory activity evaluation using Croton oil-induced mouse ear edema test. The permeation flux (J) of IBU samples, IBOC5 (35.72 ± 6.35) and IBOC10 (29.78 ± 2.41) were significantly higher ($p < 0.01$ and $p < 0.05$, respectively) when compared to control cream, without Copaiba oil (10.32 ± 1.52) and to commercial product (14.44 ± 2.39). In the penetration analysis, the amount of IBU found in the samples IBOC5 and IBOC10 was higher ($p < 0.01$ and $p < 0.05$, respectively) in dermis than epidermis. *In vivo* tests showed that samples IBOC5 and IBOC10 decreased ($p < 0.05$ e $p < 0,001$, respectively) inflammatory process when it was compared to the negative control, however they weren't considered statistically different ($p > 0.05$) of positive control. Concluding, Copaiba oil showed a significant capability to promote skin penetration and permeation of ibuprofen when it was added into the cream samples, according to the *in vitro* diffusion cells test results. On the other hand, the results obtained from the *in vivo* method weren't enough satisfactory considering the analyzed samples.

Keywords: 1. ibuprofen. 2. copaiba oil. 3. penetration enhancer.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINE	Anti-inflamatório não esteroideal
ANOVA	Análise de variância
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada à Espectroscopia de Massas
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
COX	Ciclooxigenase
CP	Controle Positivo
DEF	Dicionário de Especialidades Farmacêuticas
DPR	Desvio padrão relativo
Exp	Experimento
FDA	Food and Drug Administration
FPP	Farnesil-Pirofosfato
GRAS	Generally Recognized as Safe
IBOC5	Creme contendo 5% de ibuprofeno e 5% de óleo de copaíba
IBOC10	Creme contendo 5% de ibuprofeno e 10% de óleo de copaíba
IBU	Ibuprofeno
IK	Índice de Kovátz
IR	Índice de retenção
IS	Índice de similaridade
Lit	Literatura
LOD	Limite de detecção
LOQ	Limite de quantificação
OC10	Creme com óleo de copaíba 10%
PA	Para análise
pH	Potencial hidrogeniônico
SRQ	Substância Química de Referência
TR	Tempo de retenção
UV	Ultravioleta
VDC	Vertical Diffusion Cells

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura da pele	04
Figura 2. Estrutura da epiderme.....	05
Figura 3. Corte de uma secção de pele humana com as vias de absorção	07
Figura 4. Vias de permeação de fármacos na pele. 1. Via intracelular, 2. Via intercelular, 3. Via folicular, 4. Via sebácea, 5. Via sudorípara	08
Figura 5. Representação de uma célula de difusão onde o compartimento doador contém o soluto na concentração C.....	09
Figura 6. Perfil de penetração <i>versus</i> tempo com ilustração do fluxo no estado estacionário e <i>lag time</i> Corte de uma secção de pele humana com as vias de absorção	10
Figura 7. Unidade de isopreno - C ₅	14
Figura 8. Estrutura química do β-cariofileno	15
Figura 9. Representação esquemática da célula de difusão vertical e seus acessórios.....	16
Figura 10. Aparelho de célula de difusão vertical automatizado – Célula de Franz.....	17
Figura 11. Parte superior da orelha suína com identificação das áreas mais adequadas (A e B) para experimento <i>in vitro</i>	18
Figura 12. Estrutura química do ibuprofeno	19
Figura 13. Representação esquemática de uma emulsão. A: Fase interna ou dispersa; B: Fase externa ou dispersante.....	22
Figura 14. Cromatograma do padrão de hidrocarbonetos C ₆ -C ₂₆ , C ₂₈ e C ₃₀	26
Figura 15. Cromatógrafo gasoso acoplado a espectrometria de massas	28
Figura 16. Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência	29
Figura 17. Materiais utilizados para a preparação das amostras de ibuprofeno 5% e óleo de copaíba nas concentrações de 5 e 10%.....	30
Figura 18. Teste de espalhabilidade da formulação IBOC10 no tempo zero (t ₀): (A) amostra introduzida no orifício da placa molde; (B) amostra após retirada da placa circular; (C) espalhabilidade da amostra após acréscimo de 200g; (D) espalhabilidade da amostra após acréscimo de 400g; (E) espalhabilidade da amostra após acréscimo de 600g; (F) espalhabilidade da amostra após acréscimo de 800g.	32

Figura 19. A) Sistema empregado nos estudos de penetração/permeação <i>in vitro</i> . B) Aplicação da amostra.	35
Figura 20. A) Retirada do segmento de pele; B) Pele após remoção da formulação; C) Separação dos estratos cutâneos: epiderme e derme com auxílio do bisturi; D) Derme sendo recortada para processo de extração.....	37
Figura 21. Imagem em microscopia de luz da amostra pele suína (separação de derme e epiderme). Corante: hematoxilina-eosina (HE); Barra = 20µm.....	37
Figura 22. Cromatograma de CG-EM do padrão de β-cariofileno.....	41
Figura 23. Cromatograma de CG-EM do óleo de copaíba.....	41
Figura 24. Estruturas químicas dos metabólitos especiais do óleo de copaíba.	43
Figura 25. Espectro de Massas do β-cariofileno contido no óleo de copaíba (1) e espectro de Massas do β-cariofileno da biblioteca de massas do equipamento (2).	46
Figura 26. Biossíntese do β-cariofileno.	47
Figura 27. Curva analítica do padrão do IBU em CLAE para o teste de linearidade, utilizando como fase móvel o metanol:água (75:25 v/v) ajustado a pH 3,0 com ácido ortofosfórico.....	48
Figura 28. Emulsão contendo 5% de ibuprofeno e 10% de óleo de copaíba.	51
Figura 29. Amostras após estresse mecânico no tempo zero (t ₀): A (IBOC5); C (IBOC10) e no tempo 12 dias(t ₁₂): B (IBOC5); D (IBOC10).....	54
Figura 30. Valores de espalhabilidade das emulsões IBOC5, IBOC10 e Produto Comercial em relação às massas aplicadas no tempo zero (t ₀)..	55
Figura 31. Valores de espalhabilidade das emulsões IBOC5, IBOC10 e Produto Comercial em relação às massas aplicadas após 12 dias de estresse térmico (t ₁₂)..	55
Figura 32. Imagens em microscopia óptica das amostras IBOC5 (A) e IBOC10(B) com aumento de lente objetiva de 40x.....	56
Figura 33. Imagens em microscopia óptica das amostras IBOC5 (A) e IBOC10(B) com aumento de lente objetiva de 100x.....	57
Figura 34. Curva analítica do padrão do IBU em CLAE para o teste de linearidade, utilizando como fase móvel o metanol: água (75:25 v/v) ajustado a pH 3,0 com ácido ortofosfórico.....	58

Figura 35. Evolução dos picos cromatográficos em CLAE de IBU da amostra do controle positivo (CP) entre a primeira (90min.) e a quinta coleta (450min.) em uma célula de difusão vertical de Franz. Tempo de retenção IBU: 5,301min.	60
Figura 36. Evolução dos picos cromatográficos em CLAE de IBU da amostra do produto comercial entre a primeira (90min.) e a quinta coleta (450min.) em uma célula de difusão vertical de Franz. Tempo de retenção IBU: 5,301min.	60
Figura 37. Evolução dos picos cromatográficos em CLAE de IBU da amostra IBOC5 entre a primeira (90min.) e a quinta coleta (450min.) em uma célula de difusão vertical de Franz. Tempo de retenção IBU: 5,301min.	61
Figura 38. Evolução dos picos cromatográficos em CLAE de IBU da amostra IBOC10 entre a primeira (90min.) e a quinta coleta (450min.) em uma célula de difusão vertical de Franz. Tempo de retenção IBU: 5,301min.	61
Figura 39. Gráfico comparativo da permeação das amostras CP (Controle positivo), produto comercial, IBOC5 e IBOC10 expressos pela quantidade total cedida de IBU em função da área da pele suína versus o tempo em minutos.	62
Figura 40. Comparação da eficiência de permeação das amostras do CP (controle positivo), produto comercial, IBOC5 e IBOC10 no tempo de 450 minutos após o início do experimento de permeação utilizando células de difusão de Franz com pele suína.	63
Figura 41. Gráfico comparativo das quantidades de IBU presentes nos diferentes extratos da pele suína (Epiderme e Derme) após 450 minutos da aplicação das amostras.	66
Figura 42. Efeito do creme de ibuprofeno 5% e óleo de copaíba 5% (IBOC5), creme de ibuprofeno 5% (C+), creme com óleo de copaíba 10% (OC10) e produto comercial (Comercial) sobre o edema de orelha em camundongo induzido pelo óleo de cróton.	67
Figura 43. Efeito do creme de ibuprofeno 5% e óleo de copaíba 10% (IBOC10), creme de ibuprofeno 5% (C+), creme com óleo de copaíba 10% (OC10) e produto comercial (Comercial) sobre o edema de orelha em camundongo induzido pelo óleo de cróton.	68

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1. Promotores de permeação cutânea	12
Tabela 1. Principais produtos comerciais contendo ibuprofeno comercializados no Brasil.	21
Tabela 2. Constituição química do óleo refinado de copaíba comercial	44
Tabela 3. Comparação entre os constituintes majoritários (> 5%) obtidos do óleo de copaíba neste trabalho com os dados da literatura.....	45
Tabela 4. Resultados da análise de precisão do método analítico para quantificação do IBU por CLAE	49
Tabela 5. Resultado do teor do Ibuprofeno matéria prima e padrão USP por CLAE	50
Tabela 6. Resultados do teste de estabilidade preliminar dos cremes preparados no tempo zero e tempo 12 dias após estresse térmico (ciclo gelo-degelo).....	53
Tabela 7. Cálculo do Limite de Detecção e Quantificação para avaliação dos resultados do experimento de permeação e penetração <i>in vitro</i>	59
Tabela 8. Resultado das médias dos fluxos, coeficiente de permeabilidade e lag time (min.) das amostras.....	63
Tabela 9. Comportamentos cinéticos de permeação cutânea do fármaco IBU e seus respectivos coeficientes de correlação linear das amostras analisadas.....	65
Tabela 10. Quantidade de IBU na epiderme e derme após 450 minutos da aplicação das amostras para o teste de permeação cutânea em aparelho de difusão vertical de Franz utilizando pele de orelha suína....	66
Tabela 11. Porcentagem de inibição da atividade inflamatória das amostras avaliadas pelo método de edema de orelha utilizando óleo de cróton como agente flogístico.....	69

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Considerações gerais	01
1.2. Anatomia e fisiologia da pele	03
1.3. Transporte de fármacos pela pele.....	06
1.4. Promotores de permeação cutânea.....	11
1.5. O óleo de Copaíba.....	14
1.6. Estudos <i>in vitro</i> de permeação e/ou penetração cutânea	15
1.7. O fármaco Ibuprofeno	18
1.7.1. Propriedades Físico químicas	19
1.7.2. Uso tópico do ibuprofeno	19
1.8. Utilização de emulsão para sistemas transdérmicos	21
2. OBJETIVOS.....	24
2.1. Objetivo Geral.....	24
2.2. Objetivos Específicos	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
3.1. Materiais	25
3.1.1. Matérias primas e reagentes.....	25
3.1.2. Equipamentos.....	25
3.2. Métodos	26
3.2.1. Caracterização e identificação do óleo de copaíba	26
3.2.1.2. Análise de Cromatografia de fase Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM)	26
3.2.1.2.1 Condições Cromatográficas	27
3.2.2. Identificação e análise quantitativa do Ibuprofeno matéria prima.....	28
3.2.2.1. Análise quantitativa por Cromatografia de Alta Eficiência (CLAE)	28
3.2.2.1.1. Condições cromatográficas	28
3.2.3. Desenvolvimento farmacotécnico das amostras	29
3.2.4. Estudo de estabilidade preliminar das amostras preparadas.....	30
3.2.4.1. Caracteres organolépticos	30
3.2.4.2. Determinação do pH.....	30
3.2.4.3. Teste de resistência física	31
3.2.4.4. Avaliação da espalhabilidade das amostras	31

3.2.4.5. Avaliação do aspecto físico e presença de cristais nas amostras por microscopia óptica	32
3.2.5. Análise quantitativa do ibuprofeno na base emulsionada	33
3.2.5.1. Preparo da amostra	33
3.3. Análise <i>in vitro</i> de permeação e penetração cutânea do ibuprofeno em pele suína	33
3.3.1. Escolha da solução receptora	33
3.3.1.1. Preparo da solução tampão fosfato pH 7,4.....	33
3.3.2. Elaboração da curva analítica	34
3.3.3. Obtenção e preparo da pele de orelha suína	34
3.3.4. Ensaio de permeação e penetração cutânea <i>in vitro</i>	34
3.4. Teste <i>in vivo</i> da atividade anti-inflamatória	38
3.4.1. Animais e manutenção	38
3.4.2. Análise de edema de orelha induzido por óleo de cróton.....	38
3.5. Análise estatística.....	39
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4.1. Constituição química do óleo de copaíba avaliada pelo método de CG-ME.....	40
4.2. Identificação e quantificação do fármaco modelo Ibuprofeno	47
4.3. Desenvolvimento e estudo de estabilidade das formulações de IBU 5% em creme com diferentes concentrações de óleo de copaíba.	50
4.3.1. Estudo de estabilidade preliminar	51
4.3.1.1. Avaliação por microscopia óptica das amostras IBOC5 e IBOC10 no tempo zero (t_0)	56
4.4. Avaliação da permeação e penetração cutânea <i>in vitro</i> do IBU	57
4.4.1. Análise da metodologia analítica de IBU	57
4.4.2. Análises de permeação e penetração cutânea do IBU com utilização da pele de orelha suína	59
4.5. Avaliação da atividade anti-inflamatória através do teste de edema de orelha induzida pelo óleo de cróton.	67
5. CONCLUSÕES	70
6. REFERÊNCIAS.....	71

1. INTRODUÇÃO

1.1. Considerações gerais

A aplicação de medicamentos na pele para tratar doenças é uma prática que tem sido utilizada pela humanidade ao longo de milênios e inclui aplicação de emplastos, géis, pomadas, cremes e pastas (MARGETTS & SAWYER, 2007). Estas preparações são utilizadas tanto por seus efeitos tópicos quanto sistêmicos (ALLEN JR., 2013).

A administração tópica é conhecida como uma via alternativa da administração oral de ativos medicamentosos e oferece muitas vantagens como a ausência de efeito de primeira passagem, o fato de ser indolor e a facilidade de aplicação. Todavia, um efeito sistêmico só é obtido a partir de fármacos com adequado grau de penetração na pele. Isto tem levado a um crescente interesse pela utilização de promotores de permeação em formulações tópicas, assim como o uso de sistemas de liberação de fármacos com esta capacidade promotora de permeação (SILVA et al., 2009).

A liberação transcutânea de fármacos é definida como uma entrega não invasiva de medicamentos pela superfície da pele. O uso de anti-inflamatórios e analgésicos na forma transcutânea vem ganhando popularidade. Quando aplicado na pele estas formas podem liberar o fármaco em uma taxa pré-determinada pela derme e promover um efeito local ou sistêmico. Atualmente, preparações na forma de géis, cremes, adesivos e soluções são amplamente utilizadas para aplicação na pele e mucosa do corpo para efeitos locais assim como efeitos sistêmicos pela penetração do fármaco no sistema circulatório (HUSSAIN et al., 2012; BAJAJ et al., 2011).

As vantagens da via transcutânea de administração de fármacos são: diminuir as variações plasmáticas de fármaco; diminuir a frequência de administração; anular a variabilidade da absorção oral; anular o metabolismo pré-sistêmico; possibilidade imediata de interromper a administração e constituir-se em boa alternativa à via intravenosa (OBATA et al., 2010; MARTINS & VEIGA, 2002).

O desenvolvimento de formulações transcutâneas é uma estratégia interessante para o transporte de diversas classes de fármacos, tanto hidrofílicos quanto lipofílicos, representando uma alternativa para superar aspectos relacionados às características farmacocinéticas e farmacodinâmicas de diversos medicamentos quando utilizados por outras vias (MARTINS e VEIGA, 2002; HUSSAIN et al., 2012). Durante a fase de desenvolvimento de produtos dermatológicos é adequado empregar procedimentos de liberação *in vitro* para selecionar

excipientes para as formulações que possam proporcionar uma atividade terapêutica adequada. Pode-se considerar que os estudos de liberação medicamentosa proporcionam dados valiosos sobre as particularidades estruturais do veículo e a capacidade deste em liberar os fármacos (SATO et al., 2007).

Com o objetivo de, por um lado, ultrapassar os problemas devidos à impermeabilidade da pele e à variabilidade biológica e, por outro, de aumentar o número de fármacos candidatos ao desenvolvimento de medicamentos transcutâneos, vários métodos para remover, reversivelmente, a resistência da barreira da pele têm sido investigados, entre os quais, a utilização de promotores de permeação (MARTINS e VEIGA, 2002).

Os promotores de permeação ou absorção são substâncias químicas que se utiliza como excipientes, incorporando-os aos sistemas transcutâneos e tópicos com a finalidade de que estes ajam como alternadores da permeabilidade cutânea de maneira reversível e segura. Podem permear ou interagir com constituintes do estrato córneo diminuindo, assim, a resistência da pele à difusão do fármaco ou, ainda, podem aumentar o fluxo do fármaco devido ao incremento da atividade termodinâmica deste na formulação (WILLIAMS & BARRY, 2012; BERTOLINI, 2009; WALTERS, 1989; BARRY & BENNETT, 1987).

Os terpenos e sesquiterpenos encontrados, frequentemente, em óleos essenciais tem sido sugeridos como promissores promotores de permeação cutânea de várias substâncias hidrofílicas e lipofílicas (PRASANTHI & LAKSHMI, 2012; NOKHODCHI et al., 2007). Acredita-se que estes atuem causando sua ação promotora devido à capacidade de romper a organização intercelular dos lipídeos do estrato córneo. Um aspecto muito relevante é que este rompimento é completamente reversível e causa baixa irritação cutânea (BERTOLINI, 2009). O óleo de copaíba, devido a sua constituição de compostos terpênicos como sesquiterpenos e diterpenos é uma boa opção como promotor de permeação de outras substâncias (OLIVEIRA et al., 2010).

Os testes *in vitro* de liberação de fármacos são uma ferramenta muito importante na indústria farmacêutica, tanto no desenvolvimento de produtos quanto no controle de qualidade de rotina. Apesar de terem sido inicialmente desenvolvidos para formas farmacêuticas sólidas, estes testes vem sendo aplicados também para formas farmacêuticas não sólidas, como emulsões, géis, pastas, entre outros (PRAÇA, 2010; MARCOLONGO, 2003).

A literatura científica descreve métodos *in vitro* que mimetizam o processo de liberação e penetração transcutânea *in vivo* com e sem membranas (artificiais ou naturais) e diferentes tipos de células de difusão das quais a *Vertical Diffusion Cell* (VDC) de Franz em sistema estático e fluxo contínuo, tem sido a mais empregada no desenvolvimento farmacotécnico, caracterização biofarmacêutica e controle de qualidade, tanto para adesivos

transcutâneos como para formas farmacêuticas semissólidas (SANTIS et al., 2012; PRAÇA, 2010).

A grande vantagem dos métodos *in vitro* para a determinação da permeabilidade de fármacos é que estes permitem uma avaliação mais direta da interação do fármaco com a respectiva membrana além da sua facilidade de execução, maior controle da variável temperatura e baixo custo operacional. (SILVA et al., 2010; LENNERNAS & DRESSMAN, 2000).

De acordo com Thong et al. (2007), muitos estudos têm sido realizados para facilitar a liberação transcutânea de fármacos que não possuem boa permeação ou para aumentar a permeabilidade de substâncias com baixos perfis de permeação. O veículo tem um papel mais dominante na terapia tópica do que na maioria das outras vias de administração (FLORENCE & ATTWOOD, 2003).

Estudos comparativos de formulações que garantam a permeabilidade cutânea são necessários para comprovar a eficácia dos produtos disponíveis comercialmente, tais como cremes, géis, sprays, mousses e pomadas (STAHL et al., 2011).

Diversos estudos que visam determinar e quantificar a absorção cutânea *in vivo* e os diferentes níveis de penetração e concentração tecidual de fármacos vem sendo propostos (RANG et al., 2008). O modelo de edema de orelha é bastante útil na avaliação da atividade anti-inflamatória tópica de compostos, uma vez que é uma metodologia bastante simples e que permite verificar a atividade de compostos no edema induzido por diferentes agentes irritantes, e ainda identificar compostos que tenham a capacidade de penetrar na pele (HORINOUCI et al., 2013).

1.2. Anatomia e fisiologia da pele

A pele é o maior órgão do corpo com uma área superficial de aproximadamente 2 m² e um peso total entre 2 a 4 Kg. Recebe aproximadamente um terço da circulação sanguínea e caracteriza-se pelo fato de apresentar uma espessura variável (1,5mm a 4mm), de acordo com a região do corpo (mais espessa na palmas das mãos ou plantas dos pés e extremamente fina como as pálpebras), e vários apêndices como as glândulas sudoríparas, as glândulas sebáceas e os folículos pilosos (**FIGURA 01**) (HARRIS, 2011; KIELHORN et al., 2006).

A pele se associa as mucosas de revestimento urogenital, digestivo e do trato respiratório para proteger as estruturas internas do corpo do ambiente externo hostil, incluindo as várias formas de poluição, temperatura, umidade e radiação. Ela limita a passagem de

produtos químicos dentro e fora do corpo, estabiliza a pressão sanguínea e a temperatura e medeia as sensações de calor, frio, toque e dor.

A pele expressa emoções como a palidez de medo e o vermelhão característico do constrangimento e da raiva, o suor da ansiedade. O integumento permite identificar os indivíduos por meio das características humanas particulares, tais como cor, cabelos, odor e textura (AULTON, 2005).

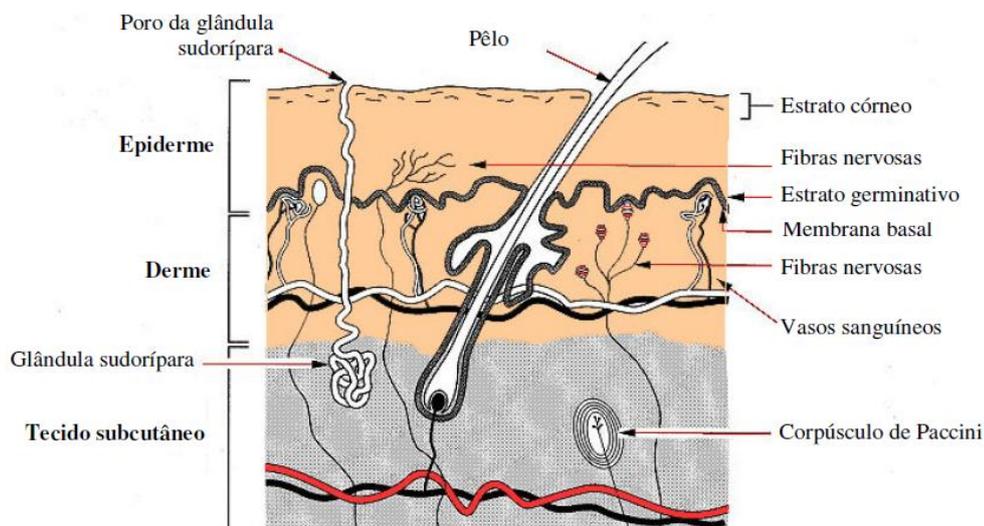


Figura 01. Estrutura da Pele (Adaptado de KIELHORN et al., 2006)

A pele é um órgão heterogêneo que inclui múltiplos tipos de tecidos diferentes. Está organizada em três camadas sobrepostas interdependentes, nas quais se distribuem seus anexos: aparelhos pilosebáceos, glândulas sudoríparas écrinas e apócrinas e unhas. É formada por três camadas intimamente relacionadas entre si: a epiderme, a derme e a hipoderme ou tecido subcutâneo (LÉPORI, 2002).

A camada mais externa chamada de epiderme consiste em uma complexa estrutura constituída de diferentes camadas formadas pelos queratinócitos, células epiteliais estratificadas que sofrem diferenciação à medida que vão da camada basal até a superfície da pele, quando descamam e numerosas camadas de células queratinizadas, anucleares e sem organelas chamadas corneócitos (RIBEIRO, 2010).

As camadas que formam a epiderme são conhecidas como basal, espinhosa, granulosa e córnea (**FIGURA 02**). Uma quinta camada, a lúcida, é encontrada entre as camadas córnea e granulosa na palma da mão e sola dos pés, conferindo maior espessamento da pele nestas regiões, ao contrário das demais regiões do corpo onde a pele é mais fina (RIBEIRO, 2010).

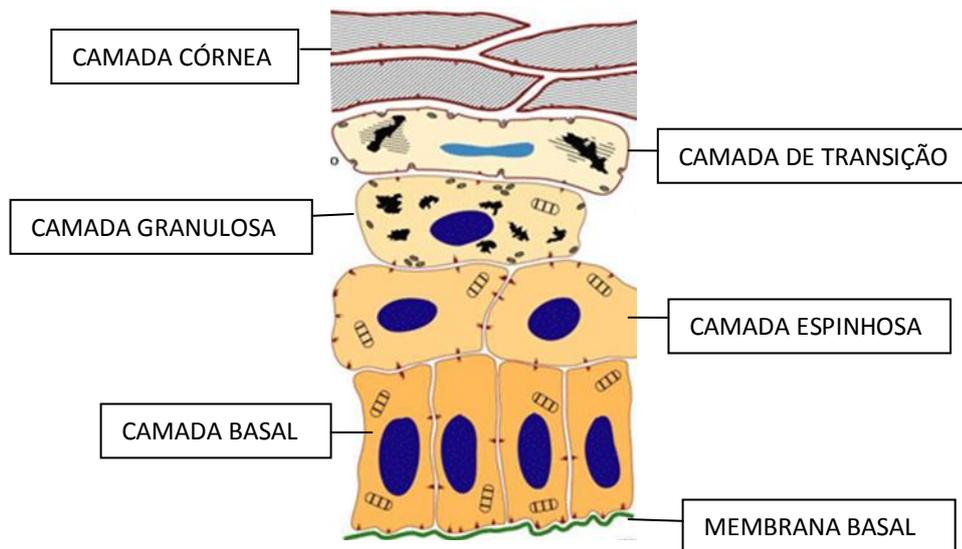


Figura 02. Estrutura da epiderme (<http://ltc.nutes.ufrj.br/toxicologia/mII.pele.htm>, acesso em 05/09/2013)

A epiderme possui ainda outros tipos de células, os melanócitos, as células de Merkel e as células de Langerhans e é transpassada pelas estruturas dos anexos invaginados da derme: os folículos pilosebáceos e as glândulas sudoríparas (HARRIS, 2011).

A principal função da epiderme é atuar como uma barreira protetora contra o ambiente externo, evitando a entrada de substâncias estranhas ao organismo e, ao mesmo tempo, reter o conteúdo interno, principalmente água, eletrólitos e nutrientes (HARRIS, 2011).

Já a derme é uma camada conjuntiva, intermediária, de espessura variável que forma a parte estrutural do tegumento do corpo. Consiste em um tecido resistente e elástico que proporciona resistência física ao corpo frente a agressões mecânicas, fornece nutrientes à epiderme e abriga os apêndices cutâneos (pêlos e glândulas sudoríparas e sebáceas), vasos sanguíneos e linfáticos, nervos e componentes celulares contendo células matrizes, fibroblastos (responsável pela síntese do colágeno e elastina), miofibroblastos e macrófagos (HARRIS, 2011; RIBEIRO, 2010; LEONARDI, 2008).

A derme é parcialmente responsável pela termorregulação, pelo suporte da rede vascular e pela defesa imunológica, em associação com as células de Langerhans da epiderme. Estas células têm origem no tecido mesodérmico e medula óssea, e fazem parte do sistema macrófago-monocítico, atuando como apresentadores de antígeno ao sistema imunológico, na indução de rejeição ao enxerto, na sensibilização e na imunovigilância (HARRIS, 2011; GARCIA, 2006).

A hipoderme ou tecido celular subcutâneo localiza-se logo abaixo da derme, é composta principalmente de lóbulos de lipócitos ou células adiposas (adipócitos), que são

separadas pelos septos fibrosos compostos por colágeno e vasos sanguíneos dilatados. Nos septos, o colágeno do tecido celular subcutâneo é contínuo ao da derme. Tem por função o isolamento térmico, o amortecimento de traumas mecânicos e de servir como reservatório de lipídeos (SALGADO, 2008; KIELHORN et al., 2005).

1.3. Transporte de fármacos pela pele

O sistema de transporte de fármacos pela pele oferece muitas vantagens sobre outras vias de administração convencionais, tais como a melhor adesão do paciente ao tratamento, a redução dos efeitos adversos, o não efeito de primeira passagem hepática, a comodidade de interrupção ou encerramento de tratamento quando necessário, além de ser uma via não-invasiva de administração de fármacos. Em comparação com a administração por via oral esta via reduz, significativamente, a degradação do fármaco devido à sua baixa atividade metabólica no local de administração (SHEN et al., 2007; WILLIAMS & BARRY, 1989).

O termo absorção percutânea descreve o processo de passagem de compostos pela pele até à circulação sistêmica, o qual envolve interações bastante complexas. Este processo pode ser dividido em:

- penetração, que consiste no transporte de uma substância para uma determinada camada (exemplo, entrada no estrato córneo);
- permeação, que compreende a penetração através das várias camadas com características funcionais e estruturais distintas (**FIGURA 03**);
- reabsorção que é a entrada de uma substância na circulação sanguínea.

Resumindo, a absorção percutânea consiste na penetração de uma molécula pelo estrato córneo, difusão pela epiderme, e difusão pela camada papilar da derme onde a molécula entra na microcirculação (SALGADO, 2008).

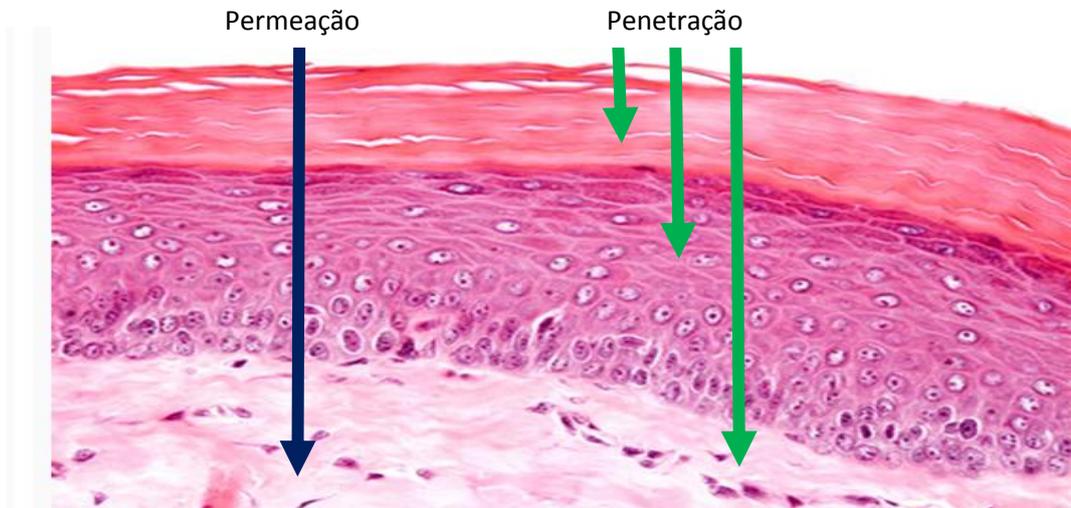


Figura 03: Corte de uma secção de pele humana com as vias de absorção tópica (Adaptado de <http://www.icb.usp.br/mol/2-23pavestrat-corn23.html>. Acesso em 23/09/2013)

A camada córnea é muito impermeável à maioria dos produtos químicos e, usualmente, contribui para o passo limitante da absorção transcutânea. A pele intacta é uma barreira muito efetiva porque a resistência difusional da camada córnea é alta, e a rota alternativa dos apêndices propicia apenas uma pequena área fracional, cerca de 0,1% (AULTON, 2005).

O extrato córneo, sendo um tecido queratinizado, comporta-se como uma membrana semipermeável artificial, na qual as moléculas penetram por difusão passiva (ALLEN JR., 2013; MOGHIMI, 1996). Assim, a velocidade de movimentação de um medicamento através dessa camada da pele depende da concentração do fármaco no veículo, de sua solubilidade e do coeficiente de partição óleo/água no estrato córneo e no veículo. As substâncias que tem características de solubilidade tanto em água quanto em lípides são boas candidatas à difusão pelo estrato córneo, bem como nas camadas epidérmicas e dérmica (ANSEL et al., 2000).

A permeação de solutos pelo estrato córneo pode ocorrer por difusão passiva através de três mecanismos sugeridos por Cleary (1982) e Ansel et al. (2000):

- i. Permeação transcelular (através das células);
- ii. Permeação intercelular (entre as células);
- iii. Permeação transanexal (através dos folículos pilosos, glândulas sebáceas e sudoríparas e dispositivos polissebáceos) (**FIGURA 04**).

A composição lipídica entre as camadas epidérmicas é bastante diferente. Os fosfolípidos polares, que são componentes da membrana celular, estão ausentes no estrato córneo morto. Esses lípidos formam bicamadas e suas cadeias acila podem existir nos estados de gel e líquido cristalino (SINKO, 2008).

Os principais lipídeos do estrato córneo são a ceramida (50%), ácidos graxos (25%), colesterol e ésteres de colesterol. Embora o estrato córneo não contenha fosfolipídeos, a mistura de ceramidas, colesterol e ácidos graxos é capaz de formar as bicamadas e estas camadas geram a função de barreira do estrato córneo (SINKO, 2008). Como a principal via de permeação dos fármacos são os canais intercelulares, o componente lipídico é considerado um determinante importante do primeiro passo do processo de absorção (ANSEL et al., 2000).

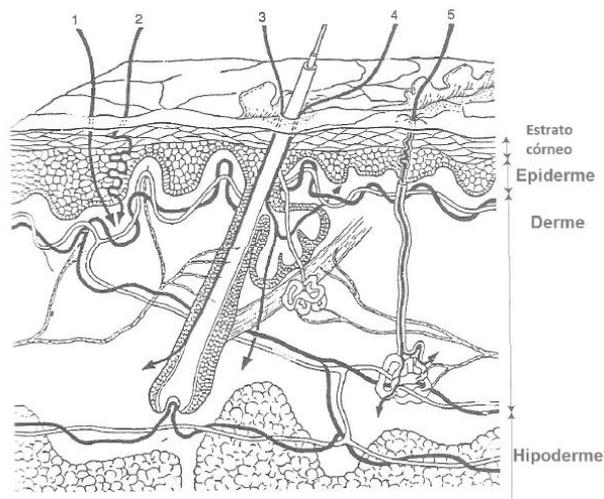


Figura 04. Vias de permeação de fármacos na pele. 1. Via intracelular, 2. Via intercelular, 3. Via folicular, 4. Via sebácea, 5. Via sudorípara (KOOP, 2012).

Depois que uma molécula atravessa o estrato córneo, não há outra barreira à difusão nas outras camadas da pele, se a molécula não for segura ou metabolizada no caminho (LEONARDI, 2008). Uma vez atravessada a camada córnea, as moléculas difundem-se rapidamente pelo tecido vivo, dirigindo-se à circulação sistêmica da camada dérmica (AULTON, 2005; ALLEN JR., 2013).

A difusão pode ser definida como, a transferência espontânea de um componente de uma região com alto potencial químico, para uma região com potencial mais baixo, sendo o gradiente de concentração a força condutora neste processo (AULTON, 2005).

As leis que descrevem o fenômeno de difusão, normalmente são expressas em termos de gradientes de concentração. A primeira lei de Fick (Equação 1) indica que a taxa de difusão é proporcional ao gradiente de concentração conforme descrito abaixo.

$$J = \frac{D_M}{D_T} = -D \frac{D_C}{D_x} (1)$$

Onde, o fluxo (J) do soluto expresso em termos de quantidade (D_M) e transportada em determinado tempo (D_T) através de um plano por unidade de área D_C/D_x fornece o gradiente de concentração D que representa o coeficiente de difusão do soluto expresso em unidade de área por unidade de tempo (ANTONIO, 2007; AULTON, 2005).

Já a segunda Lei de Fick é geralmente utilizada em experimentos onde se emprega uma membrana permeante separando dois compartimentos (**FIGURA 05**), tendo-se num deles a maior concentração do fármaco (compartimento doador) e no outro (compartimento receptor) na concentração zero (condição *sink*) mantendo assim o gradiente de concentração.

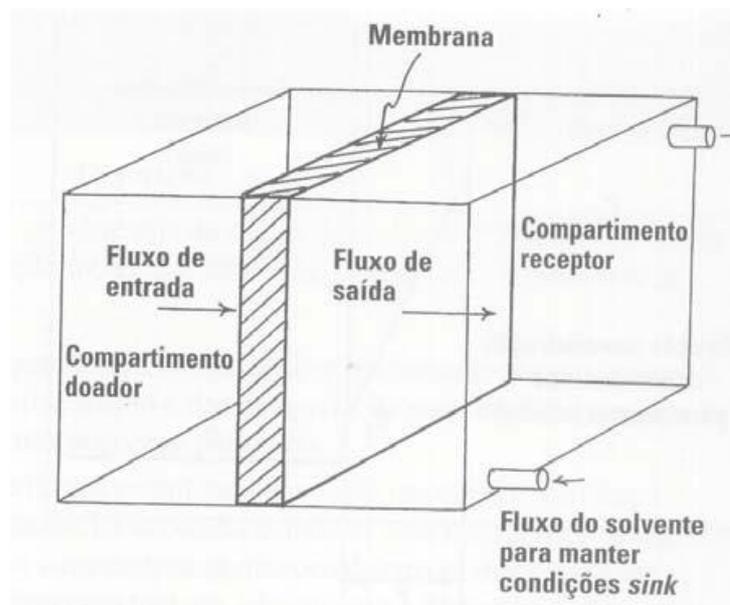


Figura 05: Representação de uma célula de difusão onde o compartimento doador contém o soluto na concentração C (SINKO, 2008).

A quantidade acumulada do fármaco (m) que passa pela membrana, por unidade de área em função do tempo até alcançar o estado de equilíbrio pode ser expressa na equação (2) a seguir:

$$J = \frac{D_M}{D_T} = \frac{DC_0K}{h} \quad (2)$$

Onde:

C_0 é a concentração constante do fármaco na solução doadora,

K é o coeficiente de partição do soluto entre o veículo e a membrana,

h é a espessura da membrana.

Ao plotar em um gráfico, o tempo de absorção (t) e a quantidade acumulada absorvida (m) por unidade de área de membrana como função do tempo, o equilíbrio é verificado quando o gráfico se torna linear (estado estacionário ou ponto de equilíbrio), e os dados desta porção linear, extrapolados, de modo a obter o intercepto da curva quando $m = 0$ fornecem o *lag time* (**FIGURA 06**) que é o tempo que leva para começar ocorrer a absorção (SINKO, 2008, ANTONIO, 2007; AULTON, 2005).

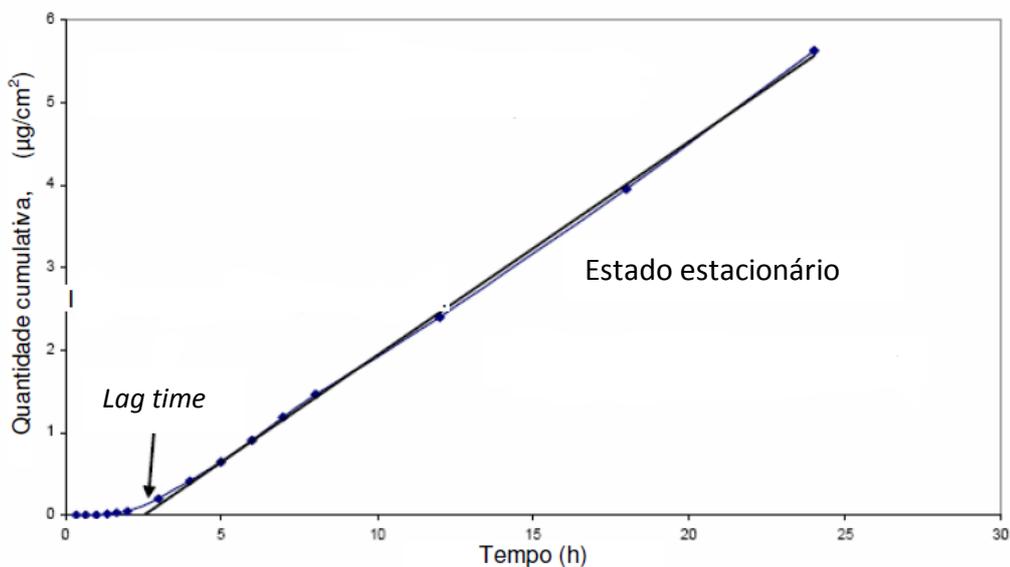


Figura 06: Perfil de penetração *versus* tempo com ilustração do fluxo no estado estacionário e *lag time* (Adaptado: KIELHORN et al., 2005)

Nem todas as substâncias apresentam características adequadas à via liberação transcutânea. Entre os fatores que afetam a absorção percutânea de um fármaco, estão o estado de hidratação e condições biológicas da pele, as propriedades físicas e químicas do fármaco, incluindo massa molecular, solubilidade, coeficiente de partição e constante de dissociação (pK_a), a forma farmacêutica e adjuvantes utilizados para veicular o fármaco (ALLEN JR., 2013; SINKO, 2008).

Os fármacos que são bons candidatos ao desenvolvimento por esta via de administração são aqueles que apresentam baixo peso molecular (menor que 500 daltons), coeficiente de partição inferior a 4, fármacos potentes, não-irritantes, com extensa metabolização hepática, com tempos de meia-vida curtos e que não sofrem metabolismo na pele (KIELHORN et al., 2005, MARTINS, 2002).

Uma estratégia, reconhecidamente, efetiva para favorecer a passagem de substâncias pela pele é o emprego de promotores de permeação. Uma vasta gama de substâncias químicas foi avaliada para utilização como promotora de permeação cutânea, todavia, a incorporação

em veículos cosméticos ou farmacêuticos é restrita devido à elucidação limitada de seus mecanismos de ação que se apresentam, comumente, complexos (BABY et al., 2008).

1.4. Promotores de permeação cutânea

Os promotores de permeação são substâncias farmacologicamente inativas que podem permear ou interagir com os constituintes do estrato córneo quando incorporados em uma formulação transcutânea e, desse modo, diminuir a resistência da pele à difusão do fármaco (SILVA et al., 2010).

Este termo tem sido usado para descrever substâncias que facilitam a absorção pela pele. Enquanto a maioria dos materiais possui um efeito direto na permeabilidade da pele, outros chamados promotores de permeação (ex. polióis, como glicerina e propilenoglicol) parecem aumentar a absorção percutânea através da elevação da atividade termodinâmica do penetrante, elevando assim a tendência efetiva de evasão e o gradiente de concentração das espécies difusoras (GENNARO, 2004).

Os promotores de permeação com efeito direto na permeabilidade da pele incluem solventes, surfactantes e uma mistura de substâncias químicas como terpenos (**QUADRO 01**). O efeito predominante desses promotores de permeação no estrato córneo é a elevação do grau de hidratação, quebra de sua matriz lipídica e/ou protéica e modificação do comportamento de partição. Em qualquer desses casos, o resultado final é uma diminuição na resistência à difusão do penetrante (WILLIAMS & BARRY, 2012; GENNARO, 2004).

QUADRO 01. Promotores de permeação cutânea

Solventes	<p>Água</p> <p>Álcoois</p> <p>Metanol</p> <p>Etanol</p> <p>2-Propanol</p> <p>Sulfóxidos</p> <p>Dimetil sulfóxido</p> <p>Decilmetil sulfóxido</p> <p>Tetradecilmetil sulfóxido</p> <p>Pirrolidonas</p> <p>2-Pirrolidona</p> <p>N-Metil-2-pirrolidona</p> <p>N-(2-Hidroxietil)pirrolidona</p> <p>Azonas</p> <p>Laurocapram</p> <p>Glicóis</p> <p>Propilenoglicol</p> <p>Solventes mistos</p> <p>Acetona</p> <p>Dimetilacetamida</p> <p>Dimetilformamida</p>
Anfifílicos	<p>L-α-Aminoácidos</p> <p>Surfactantes aniônicos</p> <p>Surfactantes catiônicos</p> <p>Surfactantes anfóteros</p> <p>Surfactantes não-iônicos</p> <p>Ácidos graxos e alcoóis</p>
Mistos	<p>Amidas do ácido clofíbrico</p> <p>Hexametileno lauramida</p> <p>Enzimas proteolíticas</p> <p>Terpenos</p> <p>Mono e sesquiterpenos</p> <p>Uréia</p>

Fonte: Adaptado de GENNARO, 2004.

A escolha de determinado promotor de permeação deve ser baseada não somente em sua eficácia em aumentar a permeação pela pele, mas também em sua toxicidade dérmica (que deve ser baixa) e em sua compatibilidade físico-química e biológica com os outros componentes do sistema (ALLEN JR., 2013).

O promotor de permeação ideal será aquele que apresenta as seguintes características: não ser tóxico, apresentar ação imediata, não-irritante, não alérgico, de ação reversível, química e fisicamente compatível com o fármaco e excipientes, aceitável cosmeticamente, inodoro, insípido, incolor, acessível e com boas propriedades solventes (MARTINS & VEIGA, 2002).

Os terpenos são considerados menos tóxicos e com menor potencial de irritação em comparação com os tensoativos e outros promotores sintéticos de penetração na pele. Além disso, alguns terpenos estão incluídos na lista de agentes reconhecidos como seguros (GRAS), emitida pelo FDA nos EUA (SAPRA et al., 2008).

Para apresentar características ideais como promotor de permeação cutânea, alguns estudos tem sugerido que os terpenos apresentem propriedades como a natureza hidrofóbica, ser líquido e não ser tri ou tetraterpeno. Mono e sesquiterpenos são melhores promotores de permeação que os di, tri e tetraterpenos, pois, eles aumentam a difusão de fármacos pelo estrato córneo (PRASANTHI & LAKSHMI, 2012).

Nokhodchi e colaboradores (2007) avaliaram o efeito de alguns terpenos em diferentes concentrações na promoção da permeação cutânea do diclofenaco de sódio e verificaram que fatores como a natureza, concentração utilizada e características estruturais dos terpenos podem influenciar na promoção de permeação cutânea do fármaco estudado.

Kang e colaboradores (2007) investigaram como as propriedades físico-químicas de 49 terpenos influenciavam na promoção de permeação cutânea do fármaco haloperidol. Este estudo relatou que a hidrofobicidade, o estado físico (líquido), os grupos funcionais específicos (éter ou aldeído, mas não ácido) e a estrutura química (não ser triterpeno e tetraterpeno) dos terpenos podem melhorar a promoção de permeação cutânea do fármaco haloperidol.

Os terpenos formam uma grande família e estruturalmente diversificada de produtos naturais derivados de unidades de isopreno C₅ (**FIGURA 7**). Estruturas típicas contem esqueletos de carbono representados por (C_{5_n}), e são classificados como hemiterpenos (C₅), monoterpenos (C₁₀), sesquiterpenos (C₁₅), diterpenos (C₂₀), sesterterpenos (C₂₅), triterpenos (C₃₀) e tetraterpenos (C₄₀) (DEWICK, 2002).



Figura 07: Unidade de isopreno - C5

Recentemente, alguns trabalhos vem relacionando o uso de terpenos e óleos naturais ricos em terpenos na promoção de permeação cutânea de alguns fármacos (WILLIAMS & BARRY, 2012; SAPRA et al., 2008; NARISHETTY & PANCHAGNULA, 2005).

Oliveira et al. (2010) avaliou a atividade do óleo de copaíba como promotor de permeação cutânea do despigmentante Ácido Kójico pelo teste *in vitro* usando célula de difusão. Os resultados demonstraram que este óleo possui potencial capacidade de promoção de permeação cutânea para substâncias hidrofílicas quando adicionado em formulações tópicas.

1.5. O óleo de Copaíba

As copaíbas são árvores nativas da região tropical da América Latina e também da África Ocidental. Na América Latina são encontradas espécies desde o México até o norte da Argentina. O gênero *Copaifera*, pertencente à família Leguminosae Juss. Subfamília Caesalpinoideae Kunth, possui 72 espécies, sendo que dezesseis destas só são encontradas no Brasil, principalmente nas regiões amazônica, com uma grande diversidade de espécies, e no centro oeste onde o óleo de copaíba é amplamente comercializado e utilizado na medicina popular (HECK et al., 2012; DEUS et al., 2011).

O óleo resina retirado da copaíba possui grande importância econômica e social, pois é um produto nativo e muitas comunidades dependem da sua extração para sua subsistência. São muitas as denominações que o óleo das copaibeiras recebe nas diversas regiões da América Latina onde é utilizado. Na Região Amazônica o uso do óleo de copaíba é tão extenso, que a copaíba destaca-se como a planta medicinal mais utilizada e conhecida pela população (LIMA et al., 2011; VEIGA JUNIOR & PINTO, 2002).

O óleo de copaíba é um líquido transparente com cor e viscosidade variável. É constituído de dois grupos de substâncias distintas, solúveis entre si, sendo um constituído de substâncias voláteis (principalmente sesquiterpenos), correspondendo a cerca de 90% de massa do óleo resina e outro grupo constituído de substâncias não voláteis (diterpenos), resinosa de cor caramelo que começa a ser decomposta à temperatura próxima de 300°C, e que corresponde a 10% da massa total do óleo resina (LEANDRO et al., 2012; DEUS et al., 2011).

Suas principais aplicações terapêuticas são como anti-inflamatório, antisséptico, cicatrizante, antitumoral, expectorante, anti-ulceroso e uso no tratamento da asma, enxaqueca, dermatite, eczemas, herpes, infecções urogenitais e leishmaniose (GELMINI et al., 2013; CUSTÓDIO & VEIGA-JUNIOR, 2012; SANTOS et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2010).

Os principais sesquiterpenos encontrados no óleo resina de copaíba são: β -cariofileno, óxido de cariofileno, α e β -humuleno, γ e δ -cadineno, α -cadinol, α -cubebeno, α e β -selineno, β -elemeno, α -copaeno, α -bergamoteno, germacreno D e β -bisaboleno. Apesar da grande variação na constituição química do óleo resina proveniente das diferentes espécies de copaíba, o β -cariofileno (**FIGURA 08**), considerado o marcador químico deste óleo, é normalmente, o principal constituinte (LEANDRO et al., 2012; PIERI et al, 2009; VEIGA JUNIOR et al., 2007).

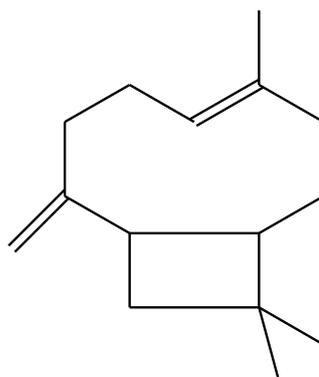


Figura 08. Estrutura química do β -cariofileno

O óleo de copaíba devido ao seu rico conteúdo em terpenos como sesquiterpenos, sesquiterpenos oxigenados e hidrocarbonetos diterpenos apresenta-se como uma ótima escolha na promoção de permeação cutânea de outras substâncias já que os terpenos apresentam comprovada ação promotora de permeação (OLIVEIRA et al., 2010).

No ano de 1972, o Food and Drug Administration, órgão americano para regulamentação de fármacos e alimentos, aprovou o óleo de copaíba para uso tópico, após ser submetido a testes de sensibilização e irritação, com o uso de 25 voluntários, obtendo-se resultado negativo para ambos (PIERI et al., 2009; VEIGA JUNIOR & PINTO, 2002).

1.6. Estudos *in vitro* de permeação e/ou penetração cutânea

No que concerne à liberação do fármaco e à sua penetração nas camadas da pele após a aplicação tópica, se faz necessário realizar estudos que caracterizem o processo de difusão e

permeação e/ou penetração de fármacos após a aplicação tópica (SANTIS et al., 2012; SILVA et al., 2010).

Para medir a permeação de substâncias pela pele, pode-se fazer uso de técnicas de permeação e/ou penetração *in vitro*. Estes experimentos tem sido considerados valiosos para estudar os mecanismos de permeação cutânea e tem demonstrado, muitas vezes, correlação com os testes *in vivo* (LEONARDI, 2008).

A célula de difusão vertical tipo Franz (**FIGURA 09**) apresenta um compartimento doador e outro receptor, que é preenchido com uma solução receptora capaz de criar uma condição de não saturação do sistema dinâmico e que é designada como condição *sink*. Entre os compartimentos supracitados, é colocada a membrana, que pode ser artificial (acetato de celulose, que é hidrofílica) ou natural (pele de coelhos, ratos, porco e humana obtida de autópsias ou de cirurgia plástica). Uma quantidade de formulação a ser estudada é aplicada sobre a pele, mimetizando as condições *in vivo* (ALLEN JR., 2013; MONTEIRO et al., 2012; SILVA et al., 2010; PRAÇA, 2010).

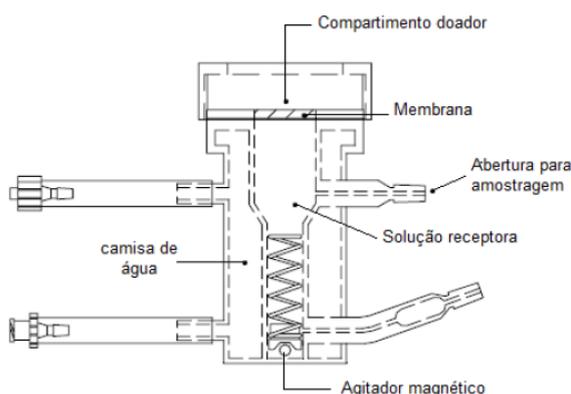


Figura 09. Representação esquemática da célula de difusão vertical e seus acessórios (HANSON, 2010).

De maneira geral, as células de difusão funcionam por dois sistemas: a) fluxo contínuo, onde a solução receptora é bombeada continuamente, ou b) fluxo estático, onde o volume da solução receptora é o mesmo durante todo o experimento. A presença da substância na solução receptora indicará que esta atravessou a membrana (LEONARDI, 2008).

O aparato de célula de difusão em sistema estático consiste em seis células de vidro termo-aquecidas, cuba com meio receptor para reposição de meio durante a amostragem, hélice para agitação do meio receptor, coletor manual ou automático e suporte para oclusão da célula de difusão a qual reduz efeitos de evaporação da amostra (**FIGURA 10**).

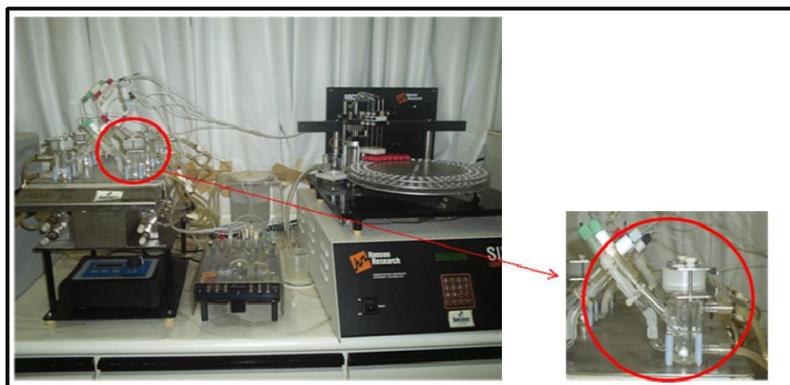


Figura 10. Aparelho de célula de difusão vertical automatizado – Célula de Franz (PRAÇA, 2010).

Nos experimentos *in vitro* de liberação e penetração cutânea, a quantidade de fármaco a ser analisada, normalmente, é muito pequena, o que requer metodologias analíticas seletivas e de alta sensibilidade. Em razão disso, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) tem sido empregada como método analítico de escolha na maioria dos estudos de liberação *in vitro* de fármacos (SANTIS et al., 2012; SILVA et al., 2009; SILVA et al., 2010).

Após a quantificação do fármaco, divide-se a concentração da substância encontrada na solução receptora pela área da membrana utilizada, a fim de determinar o Q/A , onde Q = quantidade (μg) permeada e A = superfície da membrana (cm^2). Através da realização de um gráfico, pode-se verificar a absorção transcutânea de uma determinada substância, em função do tempo, cruzando-se Q/A x tempo (t). E assim pode-se determinar através da equação (3) o fluxo (J) de uma substância.

$$Q/A = J \times t \quad (3)$$

Através da linearidade da curva obtida pode-se verificar se a substância é fortemente ou fracamente absorvida, pois a inclinação da reta representa o coeficiente de permeabilidade (K_p) do estrato córneo para a substância presente na solução receptora (LEONARDI, 2008).

As principais vantagens dos métodos *in vitro* relacionam-se com a sua facilidade de execução, maior controle da variável temperatura e baixo custo operacional. Entre as desvantagens, pode-se citar o transporte de moléculas de baixa solubilidade em água e, especialmente, o fato de não levar em conta o metabolismo da pele viva, pois as membranas sintéticas não possuem as propriedades anatômicas e fisiológicas da pele, sendo ideal realizar os estudos com membranas naturais, ou seja, pele humana e de animais (SATO et al., 2007; SILVA et al., 2010).

A membrana natural de referência para esses estudos é a pele humana, a qual muitas vezes apresenta disponibilidade de utilização limitada. Desta forma, alguns modelos de pele artificiais foram produzidos. No entanto, eles não representam uma boa alternativa, visto que a sua permeabilidade é maior que a da pele humana (NICOLI et al., 2008).

A pele de orelha de porco, devido a sua maior similaridade fisiológica, histológica e bioquímica com a pele humana, é atualmente considerado o melhor modelo a ser utilizado nos ensaios de permeação *in vitro* (BRASIL, 2012; CARMO, 2011).

São encontrados na literatura alguns estudos comparativos de permeação cutânea em pele humana, pele de orelha de porco e outros tecidos incluindo camundongos sem pêlos, na qual os resultados indicam a pele de orelha de porco, como modelo de membrana mais promissor para ensaios *in vitro* de permeação (PRAÇA, 2010). Entretanto, deve-se avaliar a região específica da porção superior da orelha suína que é a mais adequada para aplicação de amostras como modelo de correlação para pele humana como mostra na **FIGURA 11**.

No Brasil, a pele de orelha de porco é um modelo de membrana amplamente utilizado devido à sua disponibilidade e, por ser um subproduto da indústria de alimentos (indústria da carne), apresenta relativa facilidade na sua obtenção (BABY, 2008).

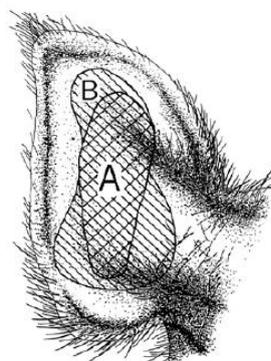


Figura 11: Parte superior da orelha suína com identificação das áreas mais adequadas (A e B) para experimento *in vitro* (MEYER et al., 2007).

1.7. O fármaco Ibuprofeno

O ibuprofeno (IBU) ou o ácido 2-(4-isobutilfenil) propiônico é um anti-inflamatório não esteroideal (AINE) pertencente ao subgrupo dos derivados do ácido propiônico (naproxeno, cetoprofeno, fenoprofeno, etc) que possui uma eficaz atividade anti-inflamatória, antipirética e analgésica (TISO et al., 2010).

1.7.1. Propriedades Físico químicas

O ibuprofeno (**FIGURA 12**) ocorre como um pó cristalino, branco ou quase branco e odor característico. É praticamente insolúvel em água, solúvel em soluções aquosas de hidróxidos alcalinos, facilmente solúvel em etanol, acetona, metanol e clorofórmio e ligeiramente solúvel em acetato de etila. Possui ponto de fusão na faixa de 75°C e 78°C e peso molecular de 206,28 (BRASIL, 2010).

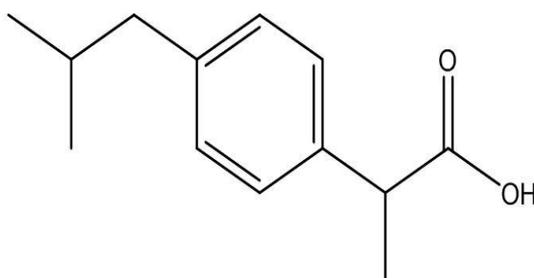


Figura 12: Estrutura química do ibuprofeno

É um fármaco hidrofóbico e possui um coeficiente de partição ($\log P$) igual a 3,4. Substâncias que apresentam valores de $\log P$ entre 1 e 4 a absorção percutânea é favorecida (KIELHORN et al., 2005). Apresenta, também, boa solubilidade em solução tampão fosfato (PBS) com pH 7,4 e por este motivo esta solução é bastante utilizada nos testes de permeação cutânea de formas farmacêuticas tópicas contendo ibuprofeno, pois, a mesma mantém a condição *sink* (STAHL et al., 2011; SHIOW-FERN et al., 2010; HERKENNE et al., 2007). Esta condição ocorre quando a concentração do fármaco dissolvida no meio de liberação é menor que 10% da sua concentração de saturação (SINKO, 2008).

1.7.2. Uso tópico do ibuprofeno

Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), amplamente utilizados em reumatologia e condições inflamatórias, apresentam-se como uma classe, potencialmente, adequada de ser incluída no desenvolvimento de formas farmacêuticas para administração tópica.

De uma maneira geral os AINEs atuam na inibição da enzima ciclooxigenase (COX) e, deste modo, inibição da produção de prostaglandinas e tromboxanos, que são mediadores do processo inflamatório. Como as prostaglandinas estão envolvidas na citoproteção gástrica,

na agregação plaquetária, na auto regulação vascular renal e na indução de trabalho de parto, entre outros efeitos, pode-se esperar que todos os AINEs compartilhem, até certo ponto, um perfil semelhante de efeitos colaterais dependentes de seus mecanismos de ação (RANG et al., 2008).

O ibuprofeno é o AINE que mostra a menor possibilidade de eventos gastrointestinais graves, essencialmente por sua meia vida curta no plasma (1-3 horas) e por este motivo é largamente utilizado para o tratamento da dor leve a moderada e inflamação associada à ortoartrite. Estudos *in vivo* demonstraram que o ibuprofeno tópico foi eficaz e seguro quando comparado a terapia oral no tratamento de osteoartrite associado a dor no joelho de pacientes (PADULA et al., 2011).

Esta perspectiva oferece um desafio especial em desenvolver uma formulação adequada que possibilite a penetração do fármaco pela barreira constituída pelo estrato córneo, permeação através das mais profundas camadas da pele e que garanta a atividade e efetividade terapêutica (GHOSH et al., 2010; SATO et al., 2007; ALVES, 2006; MILÃO, 2003).

Park e colaboradores (2000) avaliaram a capacidade promotora de permeação cutânea do tensoativo Alquil éter de polioxietileno para o ibuprofeno na pele. Os resultados mostraram que o estudo do equilíbrio hidrófilo lipófilo do tensoativo juntamente com as características estruturais do mesmo e das alterações físico químicas entre o tensoativo e o fármaco foram determinantes para o aumento da permeação cutânea do ibuprofeno na pele de ratos.

Padula et al. (2011) desenvolveu um sistema de liberação transcutâneo para o ibuprofeno 5% na forma de adesivo. Um método *in vitro* (difusão vertical com células de Franz) utilizando como membrana a pele de orelha suína foi usado para avaliação da permeabilidade cutânea. Os resultados mostraram que o bioadesivo desenvolvido pode ser utilizado como sistema de liberação do fármaco ibuprofeno por via tópica. Este estudo demonstrou ainda que a cinética de liberação do fármaco pela pele não foi linear, sugerindo que a forma farmacêutica atua como uma matriz de liberação controlada.

No Brasil, o ibuprofeno é encontrado no mercado nas formas farmacêuticas de cápsulas gelatinosas, comprimidos, envelope (granulado) e suspensão oral. Na tabela abaixo (TABELA 01) podemos observar os produtos comerciais disponíveis (DEF 2008/2009).

Tabela 01: Principais produtos comerciais contendo ibuprofeno comercializados no Brasil.

Medicamento	Apresentação	Fabricante	Substância Ativa
Advil [®]	400mg/cap.	Wyeth	Ibuprofeno
	400mg/comp.		
	600mg/comp.		
Alivium [®]	50mg/mL/susp.	Mantecorp	Ibuprofeno
	100mg/mL/susp.		
	400mg/comp.		
	600mg/comp.		
Artril [®]	300mg/comp.	Farmasa	Ibuprofeno
	600mg/comp.		
Dalsy [®]	100mg/5mL/susp.	Abbott	Ibuprofeno
	400mg/comp.		
	600mg/comp.		
Doraliv [®] gotas	50mg/ml/susp.	Aché	Ibuprofeno
Ibuprofan [®]	600mg/comp.	Bunker	Ibuprofeno
Ibuprofeno [®]	50mg/mL/susp.	Biosintética	Ibuprofeno
Ibuprofeno [®]	200mg/comp.	Sigma Pharma	Ibuprofeno
Maxifen [®]	50mg/mL/susp.	Janssen	Ibuprofeno
Motrin [®]	600mg/comp.	Pfizer	Ibuprofeno
Uniprofen [®]	600mg/comp.	União Química	Ibuprofeno
Spidufen [®]	400mg/env.	Zambon	Ibuprofeno/Arginina
	600mg/env.		

1.8. Utilização de emulsão para sistemas transcutâneos

As emulsões são os veículos mais usuais de sistemas de liberação em produtos de uso tópico. Por meio destas, é possível veicular ampla gama de substâncias que são liberadas de maneira rápida e conveniente (SATO et al., 2007).

Uma emulsão é um sistema disperso composto de pequenos glóbulos de líquido que se encontram distribuídos em um veículo no qual é imiscível (**FIGURA 13**). Nas emulsões, a fase dispersa é considerada fase interna, ou descontínua, e a fase dispersante de fase externa, ou contínua. De um modo geral, para preparar uma emulsão estável, uma terceira fase é necessária, ou seja, um agente emulgente (ALLEN JR., 2013).

Os tipos de emulsões são definidos de acordo com a composição da fase dispersa e dispersante. As emulsões farmacêuticas, geralmente, consistem na mistura de uma fase aquosa com vários óleos e/ou ceras. Quando as gotículas de óleo estão dispersas na fase aquosa, tem-se uma emulsão do tipo óleo-em-água (O/A). Sistemas nos quais a água encontra-se dispersa em óleo constituem emulsões do tipo água-em-óleo (A/O). Também é possível obtermos emulsões do tipo O/A/O, A/O/A e microemulsões. Neste último caso as gotículas da fase dispersa devem possuir dimensões entre 1nm a 1µm (AULTON, 2005).

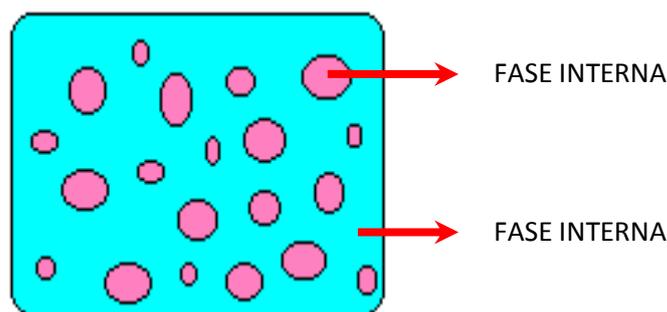


Figura 13: Representação esquemática de uma emulsão. A: Fase interna ou dispersa; B: Fase externa ou dispersante.

Dependendo da sua constituição, a viscosidade das emulsões pode variar bastante, podendo ser líquidas ou semissólidas. Para a aplicação tópica de fármacos veiculados em emulsão, as formas semissólidas são mais utilizadas. Estas são denominadas de cremes enquanto as preparações mais fluidas são chamadas de loções (ALLEN JR., 2013; AULTON, 2005).

Os cremes são formas farmacêuticas semissólidas que contem um ou mais fármacos dissolvidos ou dispersos em uma base adequada. O termo creme, recentemente, tem sido utilizado referindo-se a emulsões óleo-em-água ou dispersões aquosas microcristalinas de ácidos ou alcoóis graxos de cadeia longa, removíveis pela água e com características cosméticas e estéticas mais aceitáveis (USP, 2013; THOMPSON, 2006).

Muitas formulações modernas utilizadas como veículo de preparações semissólidas para uso transcutâneo são sistemas laváveis óleo-em-água. Entretanto, loções aquosas simples, também, são usadas por terem um efeito refrescante sobre a pele. Pomadas usadas para aplicação de medicamentos insolúveis ou solúveis em óleo deixam um filme gorduroso sobre a pele, inibindo a perda de umidade e estimulando a hidratação da camada de queratina. Os cremes do tipo O/A combinam as características de loções e pomadas (FLORENCE & ATTWOOD, 2003).

Os cremes do tipo O/A são evanescentes, ou seja, desaparecem na pele durante a fricção, logo, a fase contínua aquosa evapora aumentando a concentração de fármacos na fase oleosa. Por esta razão, o gradiente de concentração do fármaco pelo estrato córneo aumenta, promovendo a absorção percutânea (AULTON, 2005; FLORENCE & ATTWOOD, 2003).

Stahl e colaboradores (2011) realizaram um estudo sobre a influência do veículo na permeação cutânea do ibuprofeno em pele bovina em diferentes formulações. Foram avaliadas 3 formas farmacêuticas (gel, creme e solução) contendo ibuprofeno 5%. O estudo utilizou um sistema de célula de difusão vertical do tipo Franz para avaliação da permeação. O creme foi a forma farmacêutica mais eficaz na promoção da permeação do ibuprofeno quando comparado com as demais formas farmacêuticas. Este trabalho demonstra que existem diferenças na promoção da absorção do ibuprofeno ao utilizar veículos diferentes.

Diante do exposto na revisão da literatura, diversos sistemas terapêuticos sofisticados podem ser propostos para a liberação transcutânea de fármacos. Entretanto, o desenvolvimento de formas farmacêuticas simples combinadas com promotores de permeação cutâneos eficazes e características físico-químicas do fármaco favoráveis mostra ser uma alternativa mais barata e aplicável para a pesquisa de novos produtos transcutâneos. Em decorrência de estudos existentes que comprovam a atividade do óleo de copaíba como promotor de permeação cutânea de fármacos e o anti-inflamatório ibuprofeno, de apresentar capacidade de permear os estratos cutâneos em diferentes formas farmacêuticas, o presente estudo visa o desenvolvimento de uma emulsão simples contendo ibuprofeno associado a diferentes concentrações de óleo de copaíba como uma alternativa terapêutica para o tratamento de doenças inflamatórias tópicas. Os estudos de permeação e penetração cutânea foram feitos pela células de difusão vertical de Franz com pele de orelha suína como membrana natural (*in vitro*) e teste de edema de orelha induzido pelo óleo de cróton em camundongos (*in vivo*).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar em modelos experimentais *in vivo* e *in vitro* a capacidade do óleo de copaíba na promoção de absorção cutânea do ibuprofeno veiculado em base emulsionada.

2.2. Objetivos Específicos

- Realizar análise qualitativa e quantitativa de um óleo de copaíba, comercialmente disponível.
- Realizar análise qualitativa do ibuprofeno tanto da matéria prima como das preparações desenvolvidas.
- Realizar o desenvolvimento farmacotécnico de preparações contendo óleo de copaíba 5% e 10% com ibuprofeno 5% em uma base emulsionada comercial.
- Avaliar a estabilidade preliminar das formulações desenvolvidas contendo óleo de copaíba 5% e 10% com ibuprofeno 5% em creme.
- Verificar a capacidade de permeação e penetração cutânea do ibuprofeno a 5% em base emulsionada utilizando o óleo de copaíba, nas concentrações de 5% e 10%, como promotor de permeação e penetração cutânea em modelo de estudo com células de difusão vertical de Franz com pele de orelha suína como membrana natural.
- Avaliar e comparar a atividade anti-inflamatória das preparações contendo ibuprofeno 5% e óleo de copaíba 5 e 10% em base emulsionada em modelo *in vivo* de edema de orelha induzido pelo óleo de cróton.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

3.1.1. Matérias primas e reagentes

- Ibuprofeno SQR (USP, lote KOJ008);
- Ibuprofeno matéria prima (Henrifarma, lote 12093696);
- Óleo de copaíba (Beraca, lote 07133310R);
- β -cariofileno SQR (Sigma Aldrich, lote);
- Base emulsionada VersaPro[®] (Medisca, lote 98722/D);
- Dolgit[®] creme (Merck Serono, lote 5052);
- Metanol CLAE (Scharlau, lote ME03154000);
- Ácido ortofosfórico (Emsure-Merck, lote K43963373 246);
- Fosfato monobásico de potássio (Spectrum, lote 2AJ0949);
- Hidróxido de sódio PA (Spectrum, lote 1BJ0949).

3.1.2. Equipamentos

- Cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas (Shimadzu, modelo QP2010 Plus);
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência (Waters, modelo Alliance);
- Coluna cromatográfica C18, 4,6 x 250 mm, 5 μ m (Waters, modelo X-bridge);
- Detector de ultravioleta (Waters, modelo 2489)
- Balança analítica (Shimadzu, modelo AUY220);
- Banho ultratermostático (Cientec, modelo CT-281-28)
- Phmetro digital (Gehaka, modelo PG-2000);
- Centrífuga refrigerada (NT 835);
- Microscópio óptico (Olympus, modelo BH-100);
- Câmera digital para microscópio (Moticam – 1000);
- Sistema células de difusão vertical montado pela Universidade Federal do Rio de Janeiro;
- Refrigerador (Dako);
- Estufa de secagem (Nova ética, modelo HX-400).

3.2. Métodos

3.2.1. Caracterização e identificação do óleo de copaíba

3.2.1.2. Análise de Cromatografia de fase Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM)

A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) é um dos procedimentos mais utilizados e importantes para análise de misturas voláteis complexas e de baixo peso molecular. Muitos trabalhos científicos relatam a utilização desta técnica para análise qualitativa e quantitativa do óleo de copaíba (GELMINI et al, 2013; CUSTÓDIO, 2012; LIMA et al, 2011; BIAVATTI et al, 2006).

A identificação dos constituintes do óleo de copaíba foi realizada por comparação do cromatograma obtido da amostra com o padrão de β -cariofileno. Foi realizado o cálculo do índice de retenção ou índice de Kováts (IK) a partir dos tempos de retenção (TR) de cada pico e comparados com os dados da literatura (ADAMS, 1995). Cada pico do cromatograma foi, também, identificado pelo seu espectro de massas, por comparação com a biblioteca do equipamento. A quantificação do percentual relativo dos constituintes identificados foi obtida com base nas áreas dos picos cromatográficos correspondentes pelo método da normalização.

Para cálculo do índice de Kováts um padrão de hidrocarbonetos (C_6 - C_{26} , C_{28} e C_{30}) apresentado na **FIGURA 14** foi analisado no mesmo método de análise das amostras para obter os dados necessários para o cálculo.

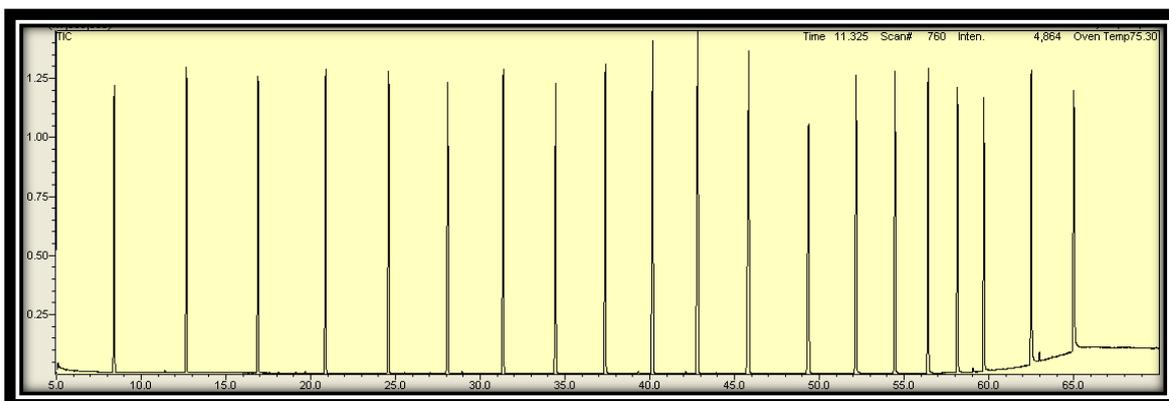


Figura 14: Cromatograma do padrão de hidrocarbonetos C_6 - C_{26} , C_{28} e C_{30} .

A obtenção do IK foi feita utilizando a equação (4) abaixo:

$$IK = 100 \left[n + \frac{(Tr_x - Tr_n)}{(Tr_{n+1} - Tr_n)} \right]$$

Onde:

Tr_x – Tempo de retenção do composto de interesse.

Tr_n – Tempo de retenção do hidrocarboneto com tempo de retenção inferior a Tr_x

Tr_{n+1} – Tempo de retenção do hidrocarboneto com tempo de retenção superior a Tr_x

n – número de carbonos do hidrocarboneto de menor tempo de retenção

3.2.1.2.1. Condições Cromatográficas

As análises de CG-EM foram realizadas empregando-se um cromatógrafo a gás acoplado a um detector seletivo de massas de marca Shimadzu e modelo GCMS-QP2010 Plus (**FIGURA 15**), operando com uma fonte de elétrons com energia de ionização de -70 eV. O cromatógrafo foi operado com coluna capilar de sílica fundida do tipo Rtx-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m). Foi operado com hélio de alta pureza como gás de arraste, com fluxo de 1,46mL/min. As análises foram realizadas com injetor operando a 245°C, forno a 80°C e detector a 300°C. Os volumes injetados foram de 0,1 μ L de uma solução contendo 2 μ L do óleo de copaíba e padrão de β -cariofileno em 1000 μ L de Hexano, sem divisão de fluxo.

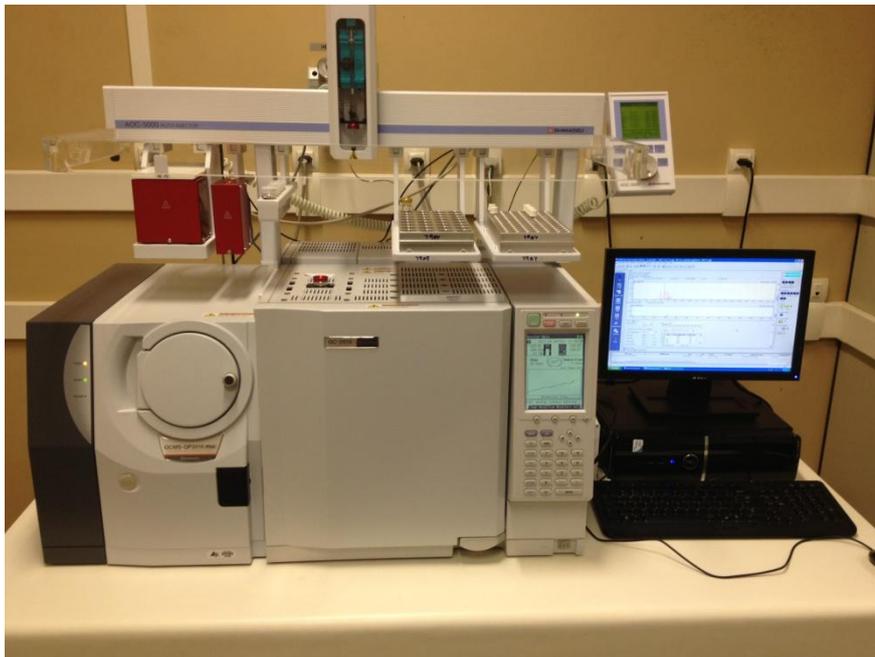


Figura 15: Cromatógrafo de fase gasosa acoplado a espectrometria de massas

3.2.2. Identificação e análise quantitativa do Ibuprofeno matéria prima

3.2.2.1. Análise quantitativa por Cromatografia de Alta Eficiência (CLAE)

3.2.2.1.1. Condições cromatográficas

As análises foram realizadas no Laboratório de Farmacologia clínica e experimental do ICB/UFJF de acordo com a metodologia descrita na BRITISH PHARMA COEIA (2014), por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em equipamento da marca Waters e modelo Alliance 2695 (**FIGURA 16**), equipado com detector de ultravioleta (UV) modelo 2489 de duplo comprimento de onda, no qual foi utilizado o comprimento de 222 nm para obtenção dos cromatogramas. Foi utilizado sistema de fase reversa e modo isocrático. As condições cromatográficas foram as seguintes: coluna X-Bridge C18 150 mm x 4,6 mm, 5 μ m (Waters, EUA); fase móvel, metanol:água (75:25 v/v) ajustado a pH 3,0 com ácido ortofosfórico; fluxo, 1,0mL/min e volume de injeção de 20 μ L.

O teor de ibuprofeno matéria prima e aquele contido no creme foram calculados através da curva analítica obtida a partir de uma solução padrão de ibuprofeno na concentração de 2000 μ g/mL.

A linearidade do método assim como a precisão, limite de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) foram avaliados de acordo com a Resolução RE 899 de 2003 (BRASIL, 2003).



Figura 16: Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (Waters, modelo Alliance).

3.2.3. Desenvolvimento farmacotécnico das amostras

Para o preparo da amostra contendo óleo de copaíba 10% em creme, primeiramente, a base emulsionada foi pesada em balança eletrônica e adicionada a um gral de porcelana. Em seguida o óleo de copaíba foi, também, pesado na concentração proposta e adicionado na base e homogeneizada por 10 minutos com o auxílio de um pistilo. A preparação foi acondicionada em pote plástico e identificada como OC10. Esta amostra foi utilizada para o teste *in vivo* de edema de orelha em camundongos para avaliação da atividade anti-inflamatória do óleo de copaíba.

Já a amostra contendo ibuprofeno (IBU) 5% em creme, o IBU foi pesado e transferido para um gral e triturado com o auxílio de um pistilo. Em seguida a base emulsionada foi pesada, adicionada ao IBU e homogeneizada por 10 minutos. Esta preparação foi acondicionada em pote plástico e identificada como controle positivo (CP) para ser utilizada nos testes *in vitro* de permeação e penetração cutânea e *in vivo* com indução de edema pelo óleo de cróton em orelha de camundongos.

No preparo das amostras contendo IBU 5% e óleo de copaíba 5% e 10% (**FIGURA 17**), primeiramente o IBU foi pesado, transferido para um gral e triturado com auxílio de um pistilo. Em seguida o óleo de copaíba foi, também, pesado e homogeneizado junto ao ibuprofeno. Após completa homogeneização do ibuprofeno ao óleo de copaíba, a base emulsionada foi pesada e adicionada à mistura e homogeneizada por 10 minutos. As preparações foram acondicionadas em potes plásticos e identificadas como IBOC5 (creme com IBU 5% e óleo de copaíba 5%) e IBOC10 (creme com IBU 5% e óleo de copaíba 10%). Estas amostras foram utilizadas para os estudos de estabilidade preliminar, permeação e

penetração cutânea *in vitro* e edema de orelha induzido pelo óleo de cróton em orelha de camundongo (ALLEN JR., 2002). (FIGURA 17).

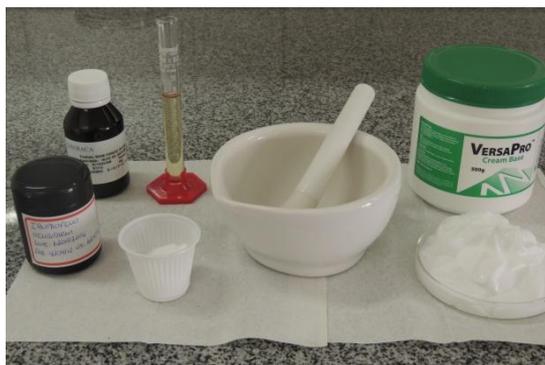


Figura 17: Materiais utilizados para a preparação das amostras de ibuprofeno 5% e óleo de copaíba nas concentrações de 5 e 10%.

3.2.4. Estudo de estabilidade preliminar das amostras preparadas

As formulações (IBOC5 e IBOC10) desenvolvidas foram submetidas a testes prévios de estabilidade descritos por Carli et al., 2009 (adaptado). Foram empregadas condições extremas de temperatura com o objetivo de acelerar possíveis reações de degradação.

As amostras, em triplicata, foram acondicionadas em pote plástico de parede simples com tampa e submetidas a ciclos alternados de resfriamento e aquecimento. Ciclos de 24 horas em estufa a $45 \pm 2^\circ\text{C}$ e ciclos de 24 horas em freezer a $-5 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 12 dias. As amostras foram avaliadas no t_0 (tempo zero = 24 horas após o preparo) e no tempo após 12 dias (t_{12}) sendo analisadas as seguintes características:

3.2.4.1. Caracteres organolépticos

Os caracteres organolépticos avaliados foram homogeneidade, cor, odor, brilho, ausência de grumos e precipitados. Estes testes foram realizados visualmente e pela percepção direta.

3.2.4.2. Determinação do pH

Foi preparada uma solução aquosa das amostras em estudo a 10% (p/v) e realizada a medida do pH em triplicata para cada amostra. Um Phmetro digital marca Gehaka e modelo

PG2000 foi previamente calibrado com soluções tampão de acetato pH 4,0 e tampão fosfato pH 7,0.

3.2.4.3. Teste de resistência física

As amostras, em triplicata, foram colocadas em tubos do tipo *ependorf* submetidas às condições de estresse mecânico, através da centrifugação em uma velocidade de 1370g, por 15 minutos. As amostras foram avaliadas visualmente quanto à presença de precipitação, coalescência e separação ou não de fases das preparações semissólidas.

3.2.4.4. Avaliação da espalhabilidade das amostras

Para a determinação da espalhabilidade das amostras preparadas, empregou-se o método de placas paralelas (**FIGURA 18**). Este teste consiste na utilização de uma placa molde circular de vidro com 20 cm de diâmetro e 0,4 cm de espessura, com orifício central de 1,2 cm de diâmetro, a qual foi colocada sobre uma placa suporte de vidro (20cm x 20cm) posicionada sobre uma folha de papel milimetrado. A amostra foi introduzida no orifício da placa molde e a superfície foi nivelada com uma espátula, esta placa foi, cuidadosamente, retirada e sobre a amostra foi colocada uma placa de vidro (placa de Petri) de peso conhecido (200g). Após um minuto, foi realizada a leitura dos diâmetros abrangidos pela amostra, em duas posições opostas, com o auxílio da escala do papel milimetrado. Posteriormente, foi calculado o diâmetro médio. Este procedimento foi repetido acrescentando sucessivamente outras 3 placas, em intervalos de um minuto perfazendo uma massa total aplicada de 800g. Os resultados foram expressos em espalhabilidade da amostra em função da massa aplicada, de acordo com a equação 5, sendo que os mesmos correspondem à média de três determinações. A determinação da espalhabilidade foi realizada de acordo com a equação previamente descrita na literatura por Knorst (1991) e citada por Borghetti e Knorst (2006).

$$E_i = d^2 \left(\frac{\pi}{4} \right)$$

Onde:

E_i = espalhabilidade da amostra para um determinado peso (mm^2)

d^2 = diâmetro médio ao quadrado (mm)

$\pi = 3,14$

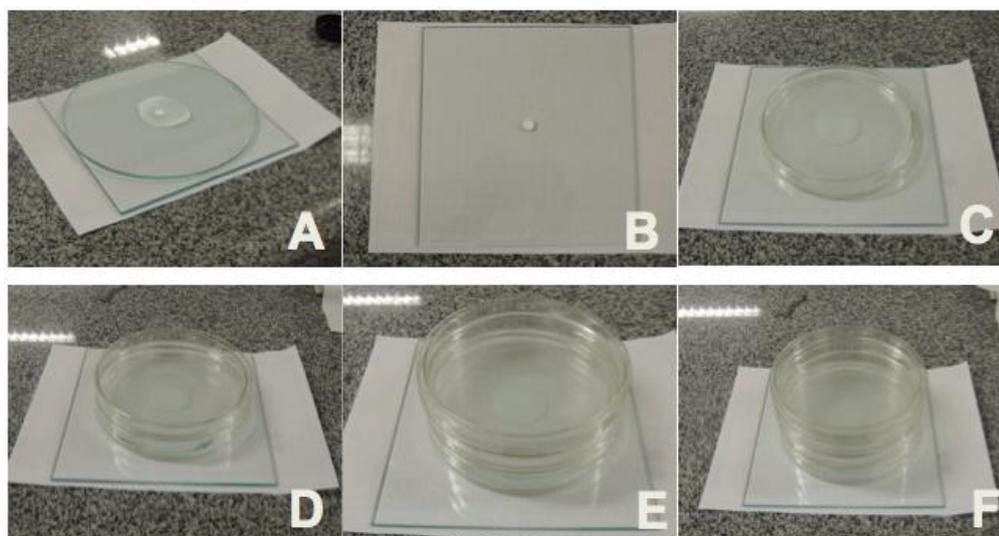


Figura 18: Teste de espalhabilidade da formulação IBOC10 no tempo zero (t_0): (A) amostra introduzida no orifício da placa molde; (B) amostra após retirada da placa circular; (C) espalhabilidade da amostra após acréscimo de 200g; (D) espalhabilidade da amostra após acréscimo de 400g; (E) espalhabilidade da amostra após acréscimo de 600g; (F) espalhabilidade da amostra após acréscimo de 800g.

3.2.4.5. Avaliação do aspecto físico e presença de cristais nas amostras por microscopia óptica

É possível utilizar um microscópio convencional para medir o tamanho de partículas na faixa de 0,2 até 100 μ m, aproximadamente (SINKO, 2008).

Para avaliar o aspecto físico das amostras (IBOC5 e IBOC10) foi utilizado um microscópio óptico convencional acoplado a uma câmera digital (Moticam 1000) para registro das imagens. As amostras no tempo zero (t_0) foram preparadas adicionando cerca de 20mg do creme sobre uma lâmina de vidro e logo em seguida foi adicionada uma gota de água destilada e homogeneizada. Sobre a amostra foi adicionada uma lamínula de vidro e a análise foi realizada através de campos aleatórios nas lentes de aumento de 40x e 100x.

A coleta dos resultados foi por fotografias registradas pelo programa Motic Live Imaging Module com adição de escala de 1 μ m. Através das imagens foi avaliada a morfologia e tamanho das micelas formadas e presença de cristais de ibuprofeno não dissolvido nas amostras.

3.2.5. Análise quantitativa do ibuprofeno na base emulsionada

3.2.5.1. Preparo da amostra

Em um béquer de 100 mL foi agitada vigorosamente uma quantidade de 1 g das amostras contendo IBU 5% (correspondente a 50mg de ibuprofeno) com 25 mL da fase móvel durante 10 minutos. Em seguida foi decantada a solução para um balão volumétrico de 50 mL e o béquer foi rinsado com duas quantidades de 10mL da fase móvel. As soluções resultantes foram transferidas para o balão volumétrico e o volume foi completado com a fase móvel para 50 mL e filtrado (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2014).

A análise quantitativa do IBU foi realizada de acordo com as condições cromatográficas descritas no item 3.2.2.1.1.

3.3. Análise *in vitro* de permeação e penetração cutânea do ibuprofeno em pele suína

3.3.1. Escolha da solução receptora

A escolha da solução receptora a ser utilizada no estudo da permeação cutânea *in vitro* foi baseada na solubilização da quantidade total do fármaco presente na tomada de amostra (200mg das formulações contendo 5% do fármaco ibuprofeno) no volume de solução receptora empregado no teste *in vitro* (7,5mL). A partir desta quantidade da amostra e devido ao fato do ibuprofeno apresentar ótima solubilidade na solução de tampão fosfato pH 7,4, esta foi capaz de manter a condição *sink* para a permeação conforme já descrito em trabalhos anteriores (SALIM et al., 2012; BAERT et al., 2011; LAKSHMI et al., 2011; STAHL et al., 2011; SHIOW-FERN et al., 2010; HERKENNE et al., 2007).

3.3.1.1. Preparo da solução tampão fosfato pH 7,4

Esta solução foi preparada segundo a Farmacopéia Americana (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2013), e confeccionada em um balão volumétrico de 200 mL adicionando 50 mL de solução de fosfato monobásico de potássio (KH_2PO_4) 0,2M à 39,1 mL de solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,2M completando o volume com água livre de dióxido de carbono. O pH foi verificado em pHmetro digital e procedido os ajustes para pH 7,4, com solução de NaOH 1N.

3.3.2. Elaboração da curva analítica

Para a construção da curva analítica, uma solução de ibuprofeno SQR foi preparada na concentração de 1000 µg/mL em solução tampão fosfato pH 7,4. Esta solução foi diluída para obter soluções de ibuprofeno SQR nas concentrações de 0,5; 1,0; 5,0; 10,0; 25,0; 50,0; 100,0 e 200µg/mL na fase móvel.

As soluções foram analisadas por CLAE conforme descrito em 3.2.2.1.1. As soluções foram injetadas em triplicata e as médias das áreas referentes a cada concentração foram plotadas em gráfico de concentração *versus* área. A equação da reta e o coeficiente de correlação foram calculados pela análise da regressão linear.

3.3.3. Obtenção e preparo da pele de orelha suína

A pele da orelha de porco, utilizada como modelo nos estudos de permeação *in vitro*, foi adquirida no frigorífico comercial Fripai localizado na cidade de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil, tendo o cuidado para que a orelha fosse retirada antes da fase de limpeza do animal que é por escaldamento, para manter a integridade da pele. Inicialmente as orelhas foram lavadas em água purificada, sendo o excesso de água retirado com papel absorvente. Após a seleção das peles íntegras (livres de lesões, arranhões ou manchas) os pêlos foram cortados com tesoura. Em seguida com auxílio de pinça anatômica e bisturi, procedeu-se a dissecação da parte externa das orelhas e foi separada a pele da cartilagem. As amostras de peles assim dissecadas foram cortadas em tamanhos padronizados e adequadas à utilização na área de permeação, e então acondicionadas em filme plástico e papel alumínio, e mantidas em congelador até o momento do uso (por no máximo 30 dias) (SANTIS, et al., 2012; KOOP, 2012).

Quando solicitadas estas peles foram retiradas do congelador e descongeladas à temperatura ambiente, sendo então cada fragmento de pele colocado numa célula de difusão (KOOP, 2012; ANTONIO, 2007).

3.3.4. Ensaio de permeação e penetração cutânea *in vitro*

Os estudos de penetração/permeação *in vitro* do IBU foram realizados em triplicata (n = 3) em células de difusão vertical com as amostras Controle positivo, produto comercial, IBOC5 e IBOC10 (SALIM et al, 2012; YUAN & CAPOMACCHIA, 2005). A pele suína total excisada foi montada sobre a célula de difusão com o estrato córneo faceando o

compartimento doador. O compartimento receptor foi preenchido com 7,5mL de tampão fosfato pH 7,4. As células foram mantidas a $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5$ por banho termostaticado. O líquido receptor foi mantido sob agitação constante (900 rpm) por meio de diminuta barra magnética acoplada a uma pequena hélice, a fim de assegurar sua homogeneidade (**FIGURA 19**) (SANTIS et al., 2012; MONTEIRO et al., 2012).



Figura 19: A) Sistema empregado nos estudos de penetração/permeação *in vitro*. B) Aplicação da amostra.

As peles permaneceram durante 15 minutos em contato com o líquido receptor, permitindo, assim, a obtenção de um equilíbrio com o ambiente. A seguir, as amostras foram aplicadas com auxílio de pipeta automática para semissólidos com o objetivo de facilitar a aplicação, o compartimento doador foi preenchido cuidadosamente para evitar a formação de bolhas de ar no contato com a pele (**FIGURA 19**). Cada área difusional do compartimento doador correspondeu a aproximadamente $1,00 \text{ cm}^2$. Os experimentos foram realizados com uma quantidade de aproximadamente 200mg de cada amostra aplicadas no compartimento doador e, por conseguinte a permeação ocorreu sob condição de quantidade infinita de fármaco, ou seja, excesso de produto (SILVA, 2009).

Após a aplicação das amostras, uma alíquota de 1 mL da solução receptora foi retirado para análise a cada intervalo de 90 minutos, havendo reposição do volume com tampão novo para manutenção da condição *sink*. As amostras foram analisadas por CLAE nas condições cromatográficas já especificadas em 3.2.2.1.1 a partir da curva analítica do ibuprofeno na solução receptora. A presença do IBU no meio receptor foi monitorada por 450 minutos (HERKENNE et al, 2007).

Para o cálculo da quantidade de IBU permeada ($Q_{t,ced}$) no tempo t , foram consideradas as diluições que ocorreram após a primeira coleta, empregando-se a equação (6) abaixo, segundo Sato (2009):

$$Q_{t,ced} = C_{\text{mensurada},t} \times V_r + \sum^{n-1} C_a \times V_a$$

Onde:

$C_{\text{mensurada},t}$ = concentração mensurada da coleta no tempo t ;

V_r = volume da solução receptora da célula de difusão;

C_a = concentração da amostra removida;

V_a = volume da amostra removida.

A partir destes resultados, uma curva de permeação do ibuprofeno, expressa em microgramas por centímetro quadrado ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) de fármaco permeado *versus* tempo (minutos), foi construída.

Os valores permeados obtidos por CLAE serviu para o cálculo dos parâmetros cinéticos (escolha do modelo cinético correspondente), tempo de latência (*Lag Time*), fluxo de permeação no estado estacionário (J) e coeficiente de permeabilidade (K_p) do ibuprofeno pela membrana (SANTIS et al., 2012; STAHL et al., 2011).

Para determinar a cinética de permeação, foram utilizados o modelo cinético de Higuchi (pseudo 1ª ordem), o de 1ª ordem e o de ordem zero. O modelo que apresentou o coeficiente de correlação linear (R^2) mais próximo de 1 correspondeu à cinética da permeação do IBU pela membrana (SATO et al, 2007).

Para o ensaio de penetração de IBU na derme e epiderme, o sistema foi desmontado, a pele foi retirada da célula com auxílio de uma pinça, a formulação foi removida com auxílio de algodão, a pele foi limpa com algodão umedecido e seca com algodão (três vezes). A epiderme foi separada da derme com auxílio de bisturi, conforme demonstrado na seqüência de fotos na **FIGURA 20**.

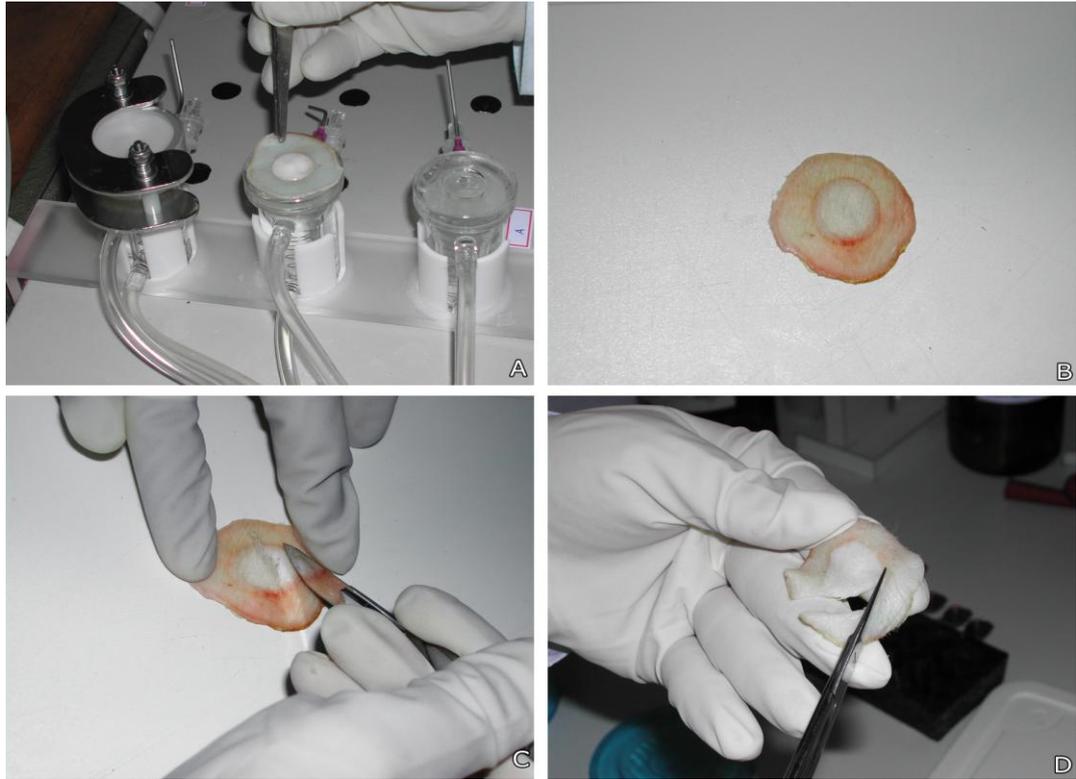


Figura 20: A) Retirada do segmento de pele; B) Pele após remoção da formulação; C) Separação dos estratos cutâneos: epiderme e derme com auxílio do bisturi; D) Derme sendo recortada para processo de extração.

A eficiência deste processo de separação foi validado por SANTIS et al., 2012 (**FIGURA 21**) pela análise histológica da orelha após a extração da epiderme. Através desta análise pode-se observar que a epiderme do lado esquerdo da figura foi completamente removida após o procedimento.

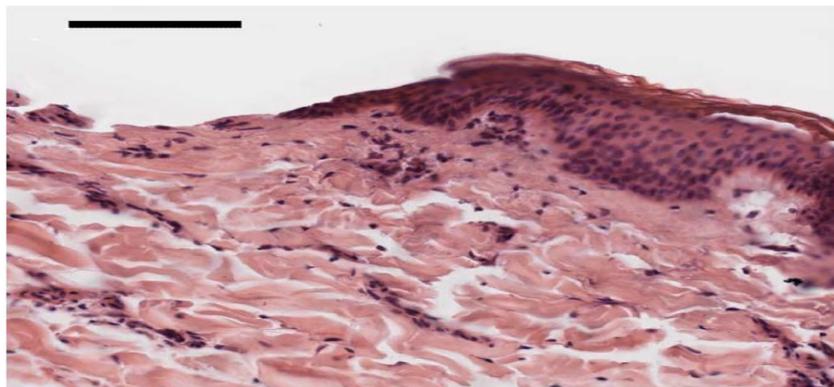


Figura 21: Imagem em microscopia de luz da amostra pele suína (separação de epiderme e derme). Corante: hematoxilina-eosina (HE); Barra = 20 μ m (SANTIS et al., 2012).

A Epiderme e derme foram submetidas ao processo de extração de IBU. Inicialmente, os segmentos de pele (epiderme e derme) foram imersos com 1mL da fase móvel. O solvente foi adicionado em cada *Eppendorf* e vortexados por 30 segundos intercalados três vezes. Após a terceira agitação no vórtex, os *Eppendorfs* foram centrifugados a 6400 rpm por 10 minutos em mini-centrífuga. Em seguida foi retirado o sobrenadante e as amostras coletadas foram analisadas por CLAE nas condições cromatográficas já especificadas em 3.2.2.1.1 a partir da curva analítica do ibuprofeno na solução receptora (BHATIA et al., 1997).

A partir destes resultados foi construído um gráfico de análise de penetração do IBU na epiderme e derme. Os resultados foram utilizados para avaliação da capacidade do óleo de copaíba em carrear o fármaco IBU através das diferentes estruturas da pele (SANTIS et al., 2012).

3.4. Teste *in vivo* da atividade anti-inflamatória

3.4.1. Animais e manutenção

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos *Swiss* (25-35 g), machos, mantidos no Laboratório de Bioquímica do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), em temperatura de 22 ± 2 °C, respeitando uma fase clara/escura de 12 horas, onde receberam água e ração comercial (Nuvital) *ad libitum*. Antes do início dos experimentos os animais foram mantidos no laboratório por um período de 1 semana para adaptação (HORINOUCI et al., 2013; OTUKI et al., 2011; RAUH et al., 2011).

Os experimentos foram conduzidos de acordo com as orientações para os cuidados com animais de laboratórios, determinados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFJF. O presente projeto foi avaliado pelo mesmo sendo aprovado sob um protocolo de número 058/2013.

3.4.2. Análise de edema de orelha induzido por óleo de cróton

Os animais foram divididos em seis grupos diferentes (n = 6), pesados e identificados. A cada grupo de seis animais foi aplicado na superfície interna da orelha direita 20µL de solução de óleo de cróton 5% (v/v) dissolvido em acetona, como agente flogístico. Logo em seguida as animais foram anestesiados com Cetamina e Xilazina. Após 15 minutos, a cada

grupo de seis animais foi aplicado na superfície interna da orelha esquerda 20mg de creme base e na superfície interna da orelha direita 20mg das preparações semissólidas: creme base (controle negativo), creme com ibuprofeno 5% (controle positivo), produto comercial, creme com óleo de copaíba 10%, creme com óleo de copaíba 5% e ibuprofeno 5% e creme com óleo de copaíba 10% e ibuprofeno 5%. Seis horas após a aplicação das amostras, os animais foram sacrificados, as orelhas seccionadas em discos circulares de 6,0 mm de diâmetro com auxílio de *punch* de biópsia e pesados em balança analítica. O edema formado foi avaliado pela diferença das massas entre a orelha tratada (direita) e a orelha com o veículo (esquerda) (PACHECO et al., 2014).

Para minimizar variações referentes à técnica, os experimentos foram realizados sempre pelo mesmo experimentador. O agente flogístico foi dissolvido em acetona e um volume de 20 µL da solução foi aplicado na orelha direita de cada camundongo (ZANUSSO-JUNIOR et al., 2011).

3.5. Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média, desvio padrão, desvio padrão relativo e erro padrão da média. Quando necessário, os dados foram avaliados pelo teste de t de Student e pela análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste de múltipla comparação de Newman Keuls. Valores de p menores do que 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados como indicativos de significância. Os cálculos foram feitos utilizando o Software estatístico GraphPad Prism versão 4, San Diego Califórnia, EUA.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Constituição química do óleo de copaíba avaliada pelo método de CG-EM.

O óleo de copaíba comercial apresentou coloração incolor à esverdeada, com odor característico da planta. O teor e constituição química do óleo são semelhantes ao descrito para este gênero na literatura (CUSTÓDIO & VEIGA JUNIOR, 2012; LEANDRO et al., 2012, LIMA et al., 2011; VEIGA JUNIOR et al., 2007, GRAMOSA & SILVEIRA, 2005).

Para fins de controle de qualidade foi necessário definir um marcador para ser monitorado e poder garantir a qualidade das análises subsequentes. O marcador que foi utilizado no monitoramento da qualidade do óleo de copaíba é o sesquiterpeno β -cariofileno ($C_{15}H_{24}$; PM 204) já que o mesmo está presente em todas as espécies de copaíba e tem disponibilidade de padrões comerciais (LIMA et al., 2011).

A comparação dos cromatogramas (padrão e amostra) juntamente com o cálculo do índice de Kováts e análise dos espectros de massas obtidos por CG-EM do óleo de copaíba com os espectros de massas reportados na literatura (ADAMS, 1995) para sesquiterpenos permitiu a identificação dos principais compostos presentes neste material.

Os cromatogramas obtidos do padrão de β -cariofileno e óleo de copaíba comercial, feitos por CG-EM, encontram-se nas **FIGURAS 22 e 23**. Foi identificada uma substância (β -cariofileno) no padrão. Já no óleo de copaíba comercial foram identificadas 16 substâncias, sendo 14 sesquiterpenos não oxigenados (97,65%) e 2 sesquiterpenos oxigenados (2,35%). Como constituintes principais (> 5%) do óleo comercial estão: β -cariofileno (**4**, 34,94%), α -humuleno (**6**, 9,91%), germacreno D (**9**, 9,32%), α -bergamoteno (**5**, 9,21%), α -copaeno (**2**, 7,65%), δ -cadineno (**13**, 5,62%) e α -muuroleno (**10**, 5,20%), conforme demonstrado na **TABELA 02**. As estruturas químicas desses metabólitos especiais estão reunidas na **FIGURA 24**.

No presente trabalho a técnica cromatográfica foi eficaz, pois possibilitou a separação dos componentes da amostra e o espectrômetro de massas forneceu o perfil de fragmentação do marcador químico β -cariofileno. Este marcador além de estar disponível comercialmente, é utilizado em diversas pesquisas de quantificação do óleo de copaíba como padrão de referência (SOUSA et al., 2011).

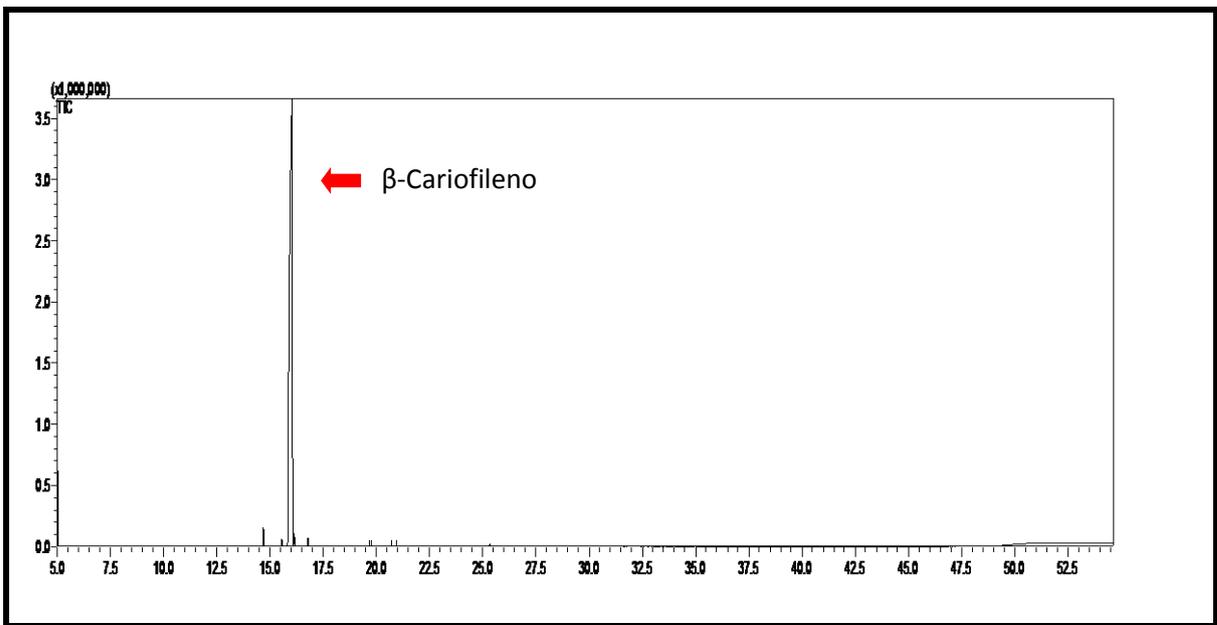


Figura 22. Cromatograma de CG-EM do padrão de β -cariofileno.

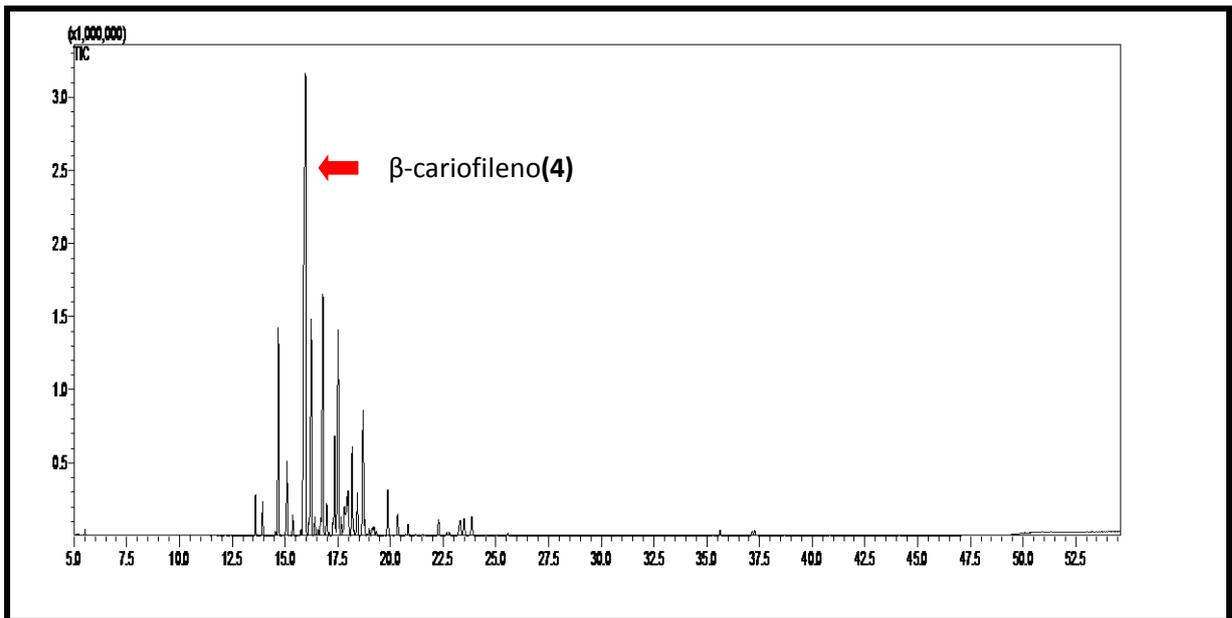


Figura 23. Cromatograma de CG-EM do óleo de copaíba.

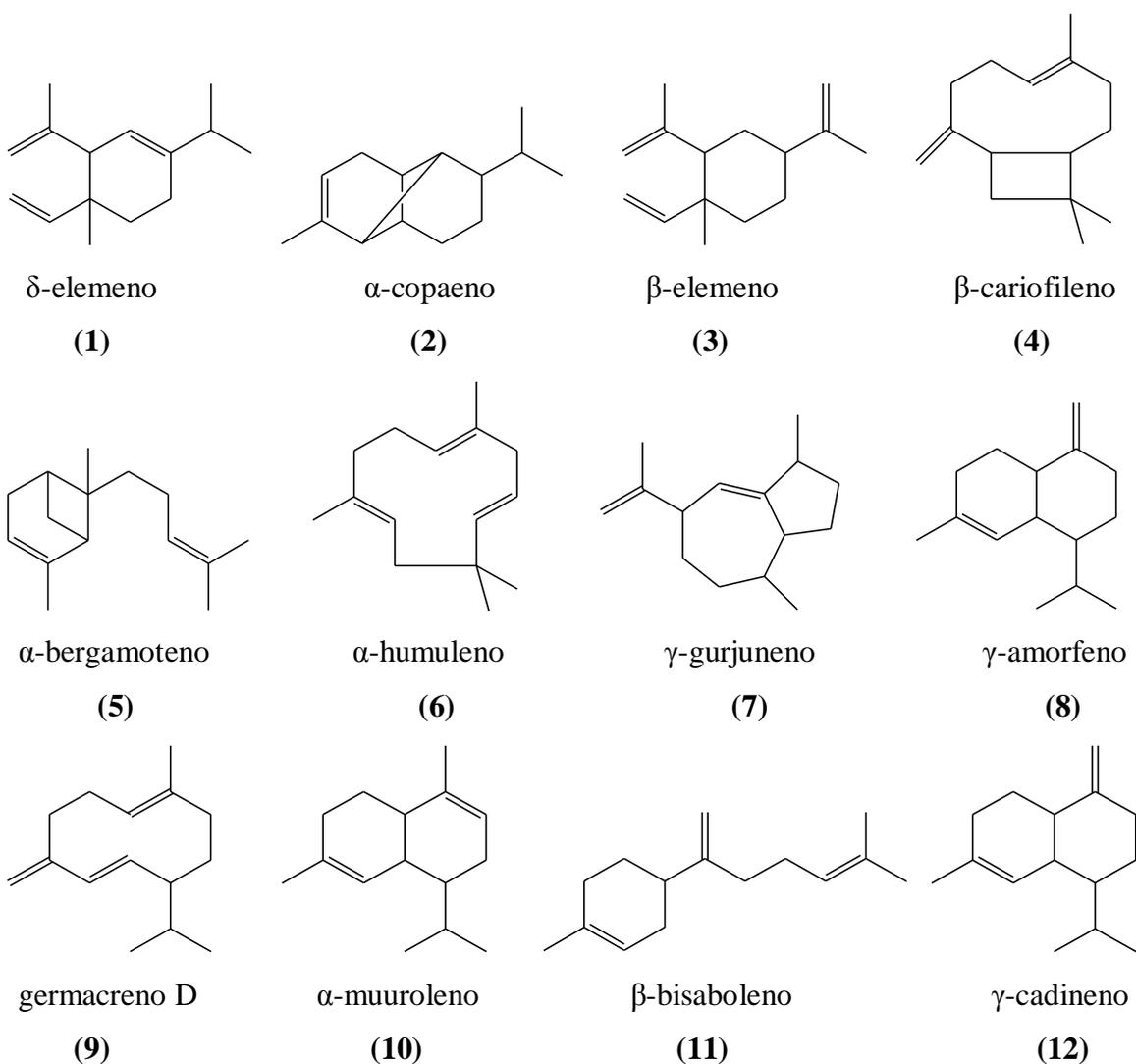
O teor calculado em relação à área do pico no cromatograma de CG-EM da substância β -cariofileno (34,94%) no óleo de copaiba está em acordo com o especificado no laudo de análise do fabricante ($\geq 32\%$) do óleo comercial. Este resultado é importante, já que o β -cariofileno é o marcador químico e o principal constituinte do óleo.

Resultado semelhante foi observado por Sousa et al. (2011) no trabalho intitulado como Validação do Método Cromatográfico a gás para quantificar sesquiterpenos em óleos de copaíba. Foram avaliados 5 óleos de copaíba de diferentes fornecedores por cromatografia

gasosa acoplada a um detector de ionização de chamas e o β -cariofileno foi o constituinte majoritário em todas as amostras pesquisadas.

Devido à diversidade de espécies do gênero *Copaifera* e os métodos de extração e purificação adotados na produção comercial do óleo, a composição química do óleo de copaíba vem sendo discutida em trabalhos recentes (LEANDRO et al., 2012; PIERI et al., 2009; VEIGA JUNIOR et al., 2007).

Normalmente, apenas as características físicas como densidade e coloração são avaliadas no óleo comercial. O óleo de copaíba avaliado apresentou composição química muito similar aos óleos de copaíba descritos em literatura e apresentando os mesmos constituintes majoritários e marcador químico. Com o intuito de comparar o perfil químico do óleo de copaíba obtido neste trabalho com os dados da literatura, os constituintes majoritários de alguns quimiotipos desta espécie foram reunidos na **TABELA 02**.



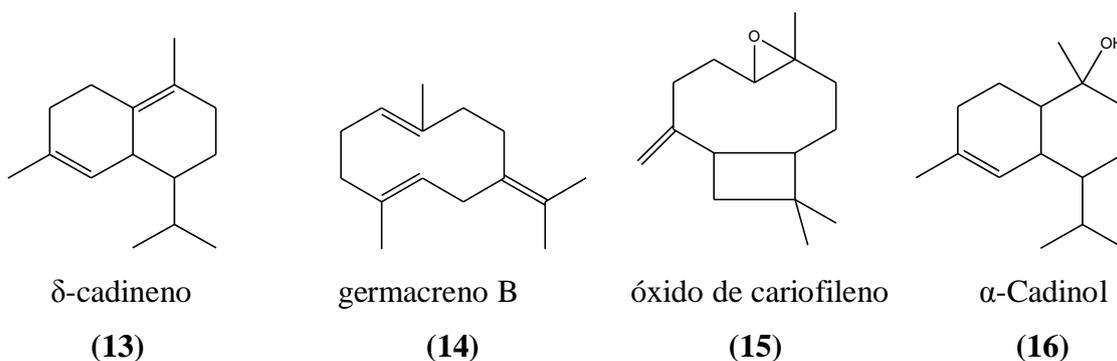


Figura 24: Estruturas químicas dos metabólitos especiais do óleo de copaíba.

Foi possível observar que a constituição química do óleo de copaíba descrito em literatura apresenta composição relativamente uniforme, havendo predominância dos sesquiterpenos não oxigenados. Entretanto, a proporção do β -cariofileno em comparação aos demais componentes é maior, apesar de haver diferenças nas suas concentrações nas diferentes literaturas.

Quantidades significativas de sesquiterpenos foram encontradas no óleo comercial avaliado, possivelmente devido ao procedimento de purificação pelo método de destilação que o óleo resina passou antes de ser acondicionado. Estes resultados, também, foram encontrados por GELMINI et al. (2013) e de acordo com DEUS et al. (2011) a destilação do óleo resina promove minimização de interferência de outras substâncias químicas presentes, além de reduzir o número de variáveis para se identificação das substâncias responsáveis pelas atividades avaliadas.

Um resultado importante quanto aos possíveis produtos de degradação formados a partir dos processos de purificação do óleo esta na baixa concentração encontrada de óxido de cariofileno (0,39%) na amostra avaliada. Este dado difere do resultado apresentado por DEUS et al. (2011) onde a concentração do óxido de cariofileno encontrado no óleo de copaíba, também destilado, foi de 10,34%. Este resultado sugere que a amostra avaliada neste trabalho apresentou boa estabilidade físico-química frente ao processo de oxidação durante seu processo de purificação e acondicionamento.

Tabela 02: Constituição química do óleo de copaíba comercial

Substância	TR (min)	IK (lit.)	IK (exp.)	Área (%)	IS (%)
δ -elemeno (1)	13,598	1335	1339	1,19	92
α -copaeno (2)	14,689	1374	1380	7,65	94
β -elemeno (3)	15,091	1389	1395	2,95	96
β -cariofileno (4)	15,976	1423	1428	34,94	97
α -bergamoteno (5)	16,240	1432	1438	9,21	95
α -humuleno (6)	16,794	1452	1459	9,91	95
γ -gurjuneno (7)	16,972	1475	1465	1,53	88
γ -amorfenno (8)	17,354	1495	1480	3,53	90
germacreno D (9)	17,513	1484	1486	9,32	92
α -muuroleno (10)	17,995	1500	1503	5,20	93
β -bisaboleno (11)	18,181	1505	1508	3,04	93
γ -cadineno (12)	18,424	1513	1516	1,67	87
δ -cadineno (13)	18,698	1522	1524	5,62	90
germacreno B (14)	19,871	1559	1558	1,89	90
óxido de cariofileno (15)	20,837	1582	1586	0,39	83
α -cadinol (16)	23,490	1652	1650	1,96	89
Sesquiterpenos não oxigenados				97,65	
Sesquiterpenos oxigenados				2,35	

TR: Tempo de retenção em minutos; IK(lit.): Índice de Kovátz da literatura (ADAMS, 1995);

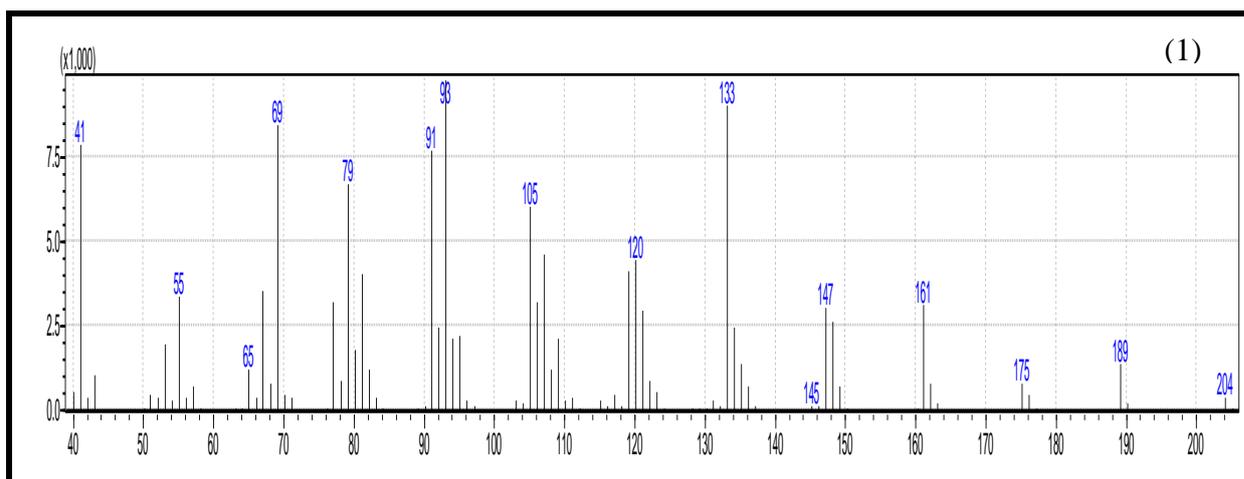
IK (exp.): Índice de Kovátz experimental; IS: Índice de similaridade.

Tabela 03: Comparação entre os constituintes majoritários (> 5%) obtidos do óleo de copaíba neste trabalho com os dados da literatura

	Resultados obtidos	Santos et al. (2012)	Deus et al. (2011)	Veiga Junior et al. (2007)	Gramosa & Silveira (2005)
β -cariofileno	34,94	37,3	57,29	40,90	53,30
α -humuleno	9,91	5,40	9,11	6,00	6,10
germacreno D	9,32	*	*	5,00	*
germacreno B	*	*	*	*	8,70
α -bergamoteno	9,21	9,00	5,31	*	*
α -copaeno	7,65	*	*	8,20	*
β -selineno	*	*	*	*	6,50
δ -cadineno	5,62	*	*	7,20	*
β -bisaboleno	*	14,50	*	*	*
α -muuroleno	5,20	*	*	*	8,30
óxido de cariofileno	*	*	10,34	*	*

* Constituinte ausente ou com área inferior a 5%.

O espectro de massas do sesquiterpeno β -cariofileno (**4**), constituinte majoritário (34,94%) do óleo de copaíba, encontra-se na **FIGURA 25**.



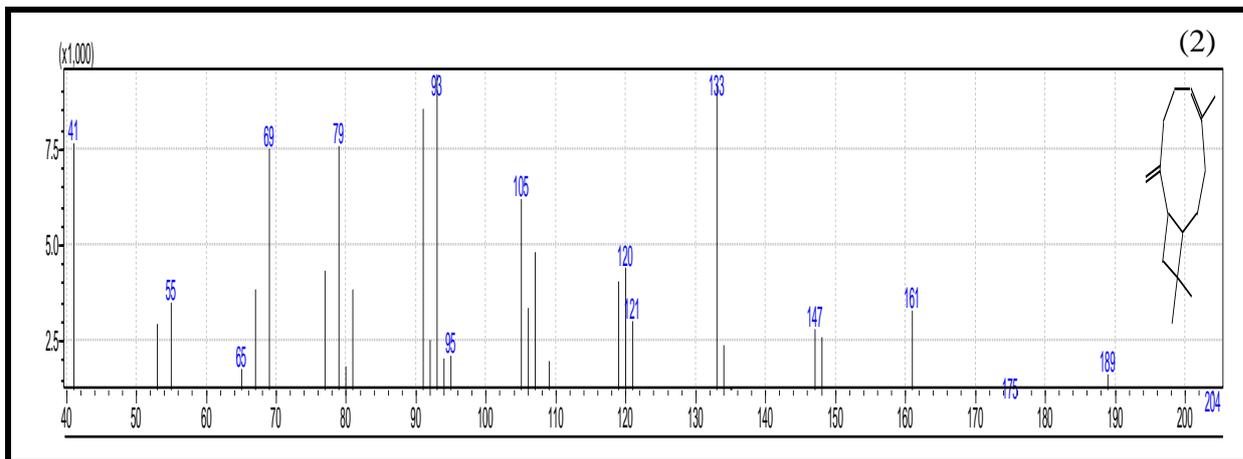


Figura 25: Espectro de Massas do β -cariofileno contido no óleo de copaíba (1) e espectro de Massas do β -cariofileno da biblioteca de massas do equipamento (2).

A comparação do espectro de massas do β -cariofileno obtido pela análise de CG-EM da amostra de óleo de copaíba com o espectro de massas reportado no banco de dados do equipamento permitiu a identificação deste composto óleo analisado.

O espectro de massas do β -cariofileno apresenta as fragmentações da cadeia lateral a partir do íon molecular 204, fornecendo os íons de m/z 133, 105, 93 e 41.

O pico base e íon molecular ($m/z = 204$) de baixa intensidade são coerentes com a estrutura proposta pelo banco de dados do equipamento e de acordo com a literatura (ADAMS, 1995). Os demais picos observados correspondem principalmente aos fragmentos formados pela perda de grupos metila e metileno.

A biossíntese do β -cariofileno (**4**), principal constituinte sesquiterpeno identificado no óleo de copaíba, encontra-se na **FIGURA 26**. A formação de sua estrutura cíclica a partir do Farnesil-Pirofosfato (FPP) é iniciada pelo ataque nucleofílico da nuvem de elétrons π ao carbono alílico ligado ao grupo pirofosfato, que resulta na formação de uma ligação σ e consequente expulsão deste grupo e formação do humulil cátion. O sesquiterpeno (**4**) é resultante de um ataque nucleofílico da nuvem π de elétrons ao carbono catiônico e posterior desprotonação (DEWICK, 2002).

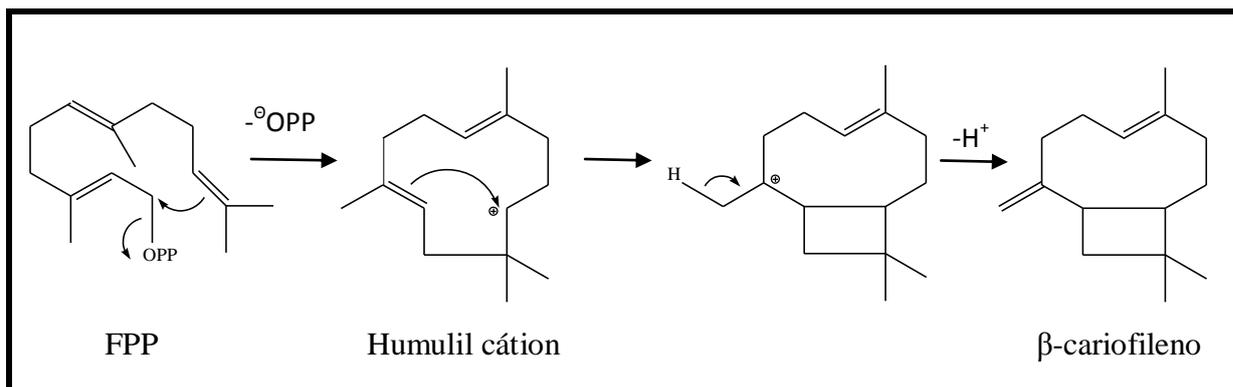


Figura 26: Biossíntese do β-cariofileno.

4.2. Identificação e quantificação do Ibuprofeno

O ibuprofeno (IBU), analisado, apresentou-se como um pó cristalino branco, insolúvel em água, muito solúvel em álcool, metanol, acetona e clorofórmio. Estes resultados estão de acordo com as especificações do laudo de análise do fabricante, USP 36 (2013) e BRITISH PHARMACOPOEIA (2014).

Para quantificação do IBU nos ensaios para a matéria prima comercial e na formulação de creme contendo IBU 5% foi usado o método analítico por CLAE descrito no item 3.2.2.1.1. A linearidade e a precisão do método foram determinados.

De acordo com a RE nº 899 de 2003, a linearidade é a capacidade da metodologia analítica demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, em intervalo especificado. Recomenda-se que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, 5 concentrações diferentes (BRASIL, 2003).

Para obtenção da curva analítica do IBU, foi preparada uma solução com ibuprofeno padrão SQR na concentração de 2000µg/mL na fase móvel. A partir desta solução foram feitas diluições nas concentrações de 500; 800; 900; 1000; 1100 e 1200µg/mL. Os valores da área obtidos foram plotados com as respectivas concentrações e foi calculada a equação da reta e o coeficiente de correlação (r) conforme demonstrados na **FIGURA 27**.

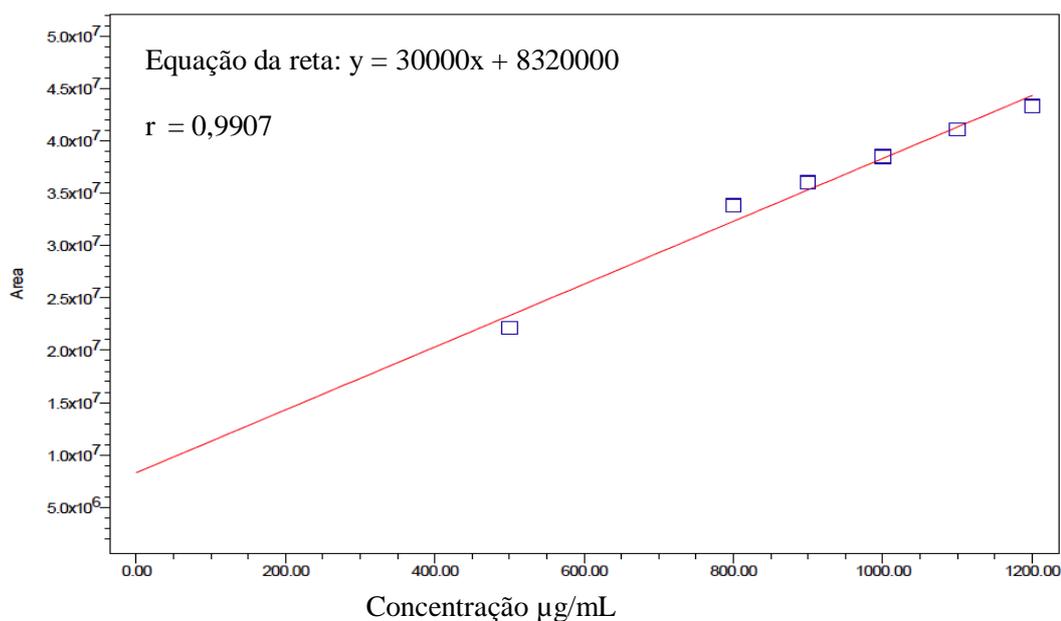


Figura 27: Curva analítica do padrão do IBU em CLAE para o teste de linearidade, utilizando como fase móvel o metanol: água (75:25 v/v) ajustado a pH 3,0 com ácido ortofosfórico.

O método apresentou boa linearidade no intervalo de 500 a 1200µg/mL com uma relação entre a concentração do analito e a área do pico expressa pela equação de regressão: $y = 30000x + 8320000$ e com coeficiente de correlação de 0,9907, atendendo as especificações da RE nº 899 que recomenda um coeficiente de correlação de no mínimo de 0,99. O tempo de retenção do IBU nas condições empregadas foi de 5,52 minutos.

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Esta é considerada em três níveis: repetibilidade (precisão intra corrida), precisão intermediária (precisão inter corridas) e reprodutibilidade (precisão inter laboratorial) (BRASIL, 2003).

A repetibilidade constitui a precisão estudada no mesmo laboratório, em pequeno intervalo de tempo. A precisão intermediária é expressa pela variação entre resultados obtidos em dias diferentes pelo mesmo laboratório. A reprodutibilidade é estudada entre diferentes laboratórios, em diversas localidades do mundo, utilizando o mesmo conjunto de amostras (BRASIL, 2003).

Sendo a repetibilidade a análise do grau de concordância entre os resultados obtidos, sob as mesmas condições de medição, o ensaio deve ser procedido mantendo inalterado o procedimento de medição, o analista, o equipamento utilizado, as condições e o local de análise, com repetições em curto espaço de tempo (BRASIL, 2003).

A partir de uma solução padrão de ibuprofeno SQR (2000µg/mL) na fase móvel foram preparadas três concentrações de 500; 800 e 1200µg/mL. As análises foram feitas em 9

réplicas, sendo cada concentração analisada em triplicata em três diferentes períodos do dia. O desvio padrão relativo das áreas dos picos foi utilizado para avaliar a repetibilidade do método.

A **TABELA 04** apresenta a média das áreas dos picos analisados e seus desvios padrão e desvios padrão relativo (DPR) quando analisado em três concentrações diferentes e em 9 réplicas (n = 9).

Tabela 04: Resultados da análise de precisão do método analítico para quantificação do IBU por CLAE

	Ibuprofeno padrão SQR (µg/mL)		
	500	800	1200
Média*	22136113,3	33816219	43329021
Desvio Padrão	13419,54	36463,82	26871,87
DPR (%)	0,061	0,108	0,062

*n=9

O DPR para as concentrações de 500; 800 e 1200µg foi de 0,061; 0,108 e 0,062% respectivamente. Logo, o método analisado apresenta precisão em nível de repetibilidade dentro da especificação publicada pela Resolução RE 899 de 2003, que é de no máximo 5%.

Para o desenvolvimento dos cremes Controle, IBOC5 e IBOC10 foi necessário a análise do teor do ibuprofeno adquirido em fornecedor comercial. Uma solução contendo 1000µg/mL de IBU padrão USP e matéria prima foram preparadas para análise de teor. A análise foi feita em triplicata utilizando o método descrito no item 3.2.2.1.1 e os resultados foram comparados aos do fabricante e à especificação da monografia para matéria prima da USP 36 (2013), método adaptado. A **TABELA 05** apresenta as respectivas áreas sob a curva, média das áreas e teor calculado em porcentagem.

Tabela 05: Resultado do teor do Ibuprofeno matéria prima e padrão USP por CLAE

IBU (1000µg/mL)		
	Matéria Prima	Padrão USP
Área 01	38810034	38945270
Área 02	38836637	39114356
Área 03	38911143	39153128
Média	38852604	39070918
Teor (%)	101,7	102,5

Utilizando a equação da reta estabelecida pela curva analítica de IBU, os resultados do teor de ibuprofeno presente nas soluções do padrão e matéria prima foram de 102,5% e 101,7%, respectivamente. Estes resultados estão de acordo com a faixa de especificação declarada no laudo análise do fabricante e estabelecido pela USP 36 (97 a 103%).

4.3. Desenvolvimento e estudo de estabilidade das formulações de IBU 5% em creme com diferentes concentrações de óleo de copaíba.

Para o desenvolvimento das formulações de creme contendo IBU 5% e óleo de copaíba 5% e 10% com IBU 5% (**FIGURA 28**) foi escolhida uma base comercial emulsionada tipo óleo em água (O/A), não iônica, hipoalergênica e que apresenta excelente estabilidade para incorporação de ativos hidrossolúveis e lipossolúveis (SARKAR et al., 2011). A esta base foi adicionado 5% (IBOC5) e 10% (IBOC10) de óleo de copaíba, como promotor de permeação cutânea juntamente com o ibuprofeno 5%. Outra preparação foi desenvolvida, adicionado 5% de ibuprofeno na base emulsionada e esta foi utilizada como controle positivo para os testes de permeação e penetração *in vitro* e edema de orelha *in vivo*. Nas preparações IBOC5 e IBOC10, ao ibuprofeno foi adicionado o óleo de copaíba como agente levigante e co-solvente, já que o ibuprofeno apresenta boa solubilidade em óleo.



Figura 28: Emulsão contendo 5% de ibuprofeno e 10% de óleo de copaíba (Foto de arquivo pessoal).

O desenvolvimento farmacotécnico das formulações apresentou-se de fácil realização sem intercorrentes durante o preparo das amostras. A base comercial foi de fácil manuseio e apresentou boa incorporação dos insumos adicionados.

4.3.1. Estudo de estabilidade preliminar

O estudo de estabilidade preliminar consiste na realização do teste na fase inicial do desenvolvimento do produto. Emprega condições extremas de temperatura com o objetivo de acelerar possíveis reações entre seus componentes e o surgimento de sinais que devem ser observados e analisados conforme as características específicas de cada tipo de produto. Devido às condições em que é conduzido, este estudo não tem a finalidade de estimar a vida útil do produto, mas sim de auxiliar na triagem das formulações (ANVISA, 2004).

As amostras (produto comercial e creme contendo 5% de IBU com 5 e 10% de óleo de copaíba), em triplicata, submetidas ao estudo de estabilidade preliminar foram avaliadas quanto à estabilidade física e química no tempo zero (t_0) e com 12 dias (t_{12}), após estresse térmico (ciclo gelo-degelo). Os parâmetros analisados foram quanto a cor, odor, homogeneidade, brilho, ausência de grumos e precipitados, análise de pH, espalhabilidade (mm^2), homogeneidade após estresse mecânico (centrifugação) e teor de ibuprofeno.

Uma preparação apresenta estabilidade física quando as propriedades físicas originais, incluindo aparência, palatabilidade, uniformidade, dissolução e suspendabilidade são mantidas. A verificação da homogeneidade, cor, odor, consistência e textura constituem o método mais simples para verificar a qualidade de um produto. Estas características organolépticas guardam uma relação com a integridade e qualidade das amostras, mas não podem ser

utilizadas com fins analíticos, sendo consideradas subjetivas (FERREIRA, 2008). Logo, modificações da cor e do odor podem dar indicação de alterações químicas e microbiológicas (PRISTA et al., 1995).

Segundo BRASIL (2008) deve-se utilizar uma amostra de referência (ou padrão) mantida em condições ambientais controladas para avaliação das características organolépticas de formulações testadas para estes parâmetros. Para os testes de estabilidade preliminar realizados, a produto comercial foi utilizado como referência para comparar os resultados das características organolépticas das amostras.

A influência do pH sobre a estabilidade física de um sistema bifásico, especialmente as emulsões, é, também, importante (BRASIL, 2010). Alterações nos valores de pH podem ocorrer em função de impurezas, hidrólise, oxidação e erro de processo (ALLEN JR., 2013). Segundo Lakshmi (2011) os valores mais elevados de pH de preparações dispersas contendo ibuprofeno aumenta a solubilidade do mesmo no veículo, logo diminui sua permeabilidade aplicado topicamente.

O teste de centrifugação faz com que a força da gravidade atue sobre os produtos, fazendo com que suas partículas se movam no seu interior. A centrifugação produz estresse na amostra, simulando um aumento na força de gravidade, aumentando a mobilidade das partículas e antecipando possíveis instabilidades. Estas poderão ser observadas na forma de precipitação, separação de fases (coalescência nas emulsões), formação de sedimento compacto, entre outras (BRASIL, 2008).

Os resultados das características organolépticas, pH, homogeneidade após estresse mecânico e teor de ibuprofeno nas amostras avaliadas estão apresentados na **TABELA 06**.

Tabela 06: Resultados do teste de estabilidade preliminar dos cremes preparados no tempo zero e tempo 12 dias após estresse térmico (ciclo gelo-degelo)

Parâmetros	Formulações*					
	IBOC5		IBOC10		Comercial	
	t ₀	t ₁₂	t ₀	t ₁₂	t ₀	t ₁₂
Cor	BR/OP	BR/OP	BR/OP	BR/OP	BR/OP	BR/OP
Odor	C	C	C	C	C	C
Homogeneidade	C	C	C	C	C	C
Brilho	C	C	C	C	C	C
Ausência de grumos e precipitados	C	C	C	C	C	C
pH	3,71±0,03	3,74±0,02	3,86±0,02	3,97±0,03	4,55±0,01	4,61±0,02
Homogeneidade após estresse mecânico	C	C	C	C	C	C
Teor de IBU (%)	100,50 ± 0,04	95,06 ± 0,02	101,20 ± 0,06	98,40 ± 0,03	100,40 ± 0,02	99,10 ± 0,04

Legenda: BR/OP: Branco opaco; C: Conforme; t: Tempo; IBOC5: Creme com ibuprofeno 5% e óleo de copaíba 5%; IBOC10: Creme com ibuprofeno 5% e óleo de copaíba 10%.* n=3.

Conforme apresentado no Quando 02, todas as formulações emulsionadas testadas, nos dois tempos de análise, apresentaram-se estáveis quanto às características organolépticas de cor, odor, homogeneidade, brilho e ausência de precipitados (C-Conforme) quando comparadas com o produto comercial referência.

Em relação ao pH, os resultados demonstraram que não houveram variações consideráveis ($p > 0,05$) entre os tempos t₀ e t₁₂ para as três amostras analisadas. Estes resultados indicam a não formação de produtos de decomposição ácidos ou alcalinos durante o teste de estabilidade preliminar. Segundo Trissel (2000), os valores de pH para melhor estabilidade de preparação dispersa contendo ibuprofeno devem estar entre 3,6 e 4,6. O produto comercial apresentou valor de pH 4,55 (t₀) e 4,61(t₁₂). Sendo a emulsão uma forma farmacêutica dispersa, os valores encontrados (Quadro 02) das amostras atendem as recomendações de pH de melhor estabilidade para o fármaco ibuprofeno na emulsão no tempo zero (t₀) e após o teste de estresse térmico (t₁₂).

Já os resultados de estabilidade frente ao estresse mecânico por centrifugação, as amostras mantiveram-se estáveis nos tempos zero (t_0) e 12 dias (t_{12}), em rotação de 1370g por 15 minutos, não apresentando precipitados, coalescência e/ou separação de fases (**FIGURA 29**). Estes resultados demonstram que as amostras apresentam estabilidade física mesmo após um aumento da força de gravidade e aumento da mobilidade das gotículas.

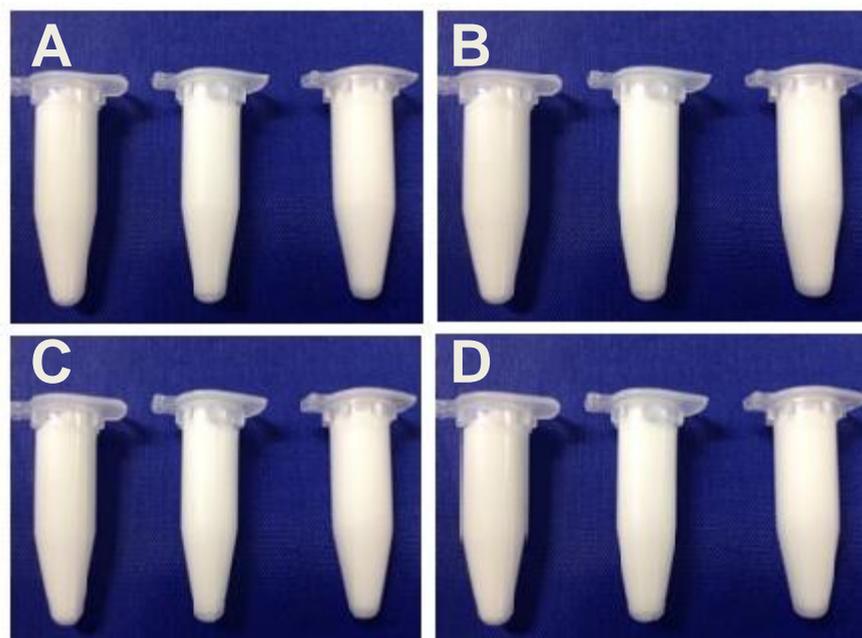


Figura 29: Amostras após estresse mecânico no tempo zero (t_0): A (IBOC5); C (IBOC10) e no tempo 12 dias(t_{12}): B (IBOC5); D (IBOC10).

A espalhabilidade, definida como a expansão de uma formulação semissólida sobre uma superfície após um determinado período de tempo, é uma das características essenciais das formas farmacêuticas destinadas à aplicação tópica, pois está intimamente relacionada com a aplicação destas formulações no local de ação (BORGHETTI & KNORST, 2006). Com o teste de espalhabilidade pode ser observado se as formulações avaliadas (IBOC5 e IBOC10) mantêm estáveis as características físicas e físico-químicas relacionadas à reologia e consequente espalhabilidade das mesmas (CARLI, 2009). Os resultados das amostras avaliadas foram comparados ao resultado do produto comercial.

Os dados encontrados de espalhabilidade no tempo zero (t_0) das amostras desenvolvidas (**FIGURA 30**), aumentaram de forma significativa ($p < 0,001$, ANOVA) com o aumento da massa aplicada sobre as mesmas no teste de placas paralelas. Não foram

observadas alterações significativas ($p > 0,05$) nos perfis de espalhabilidade das amostras IBOC5 e IBOC10 quando comparadas entre si e com o produto comercial.

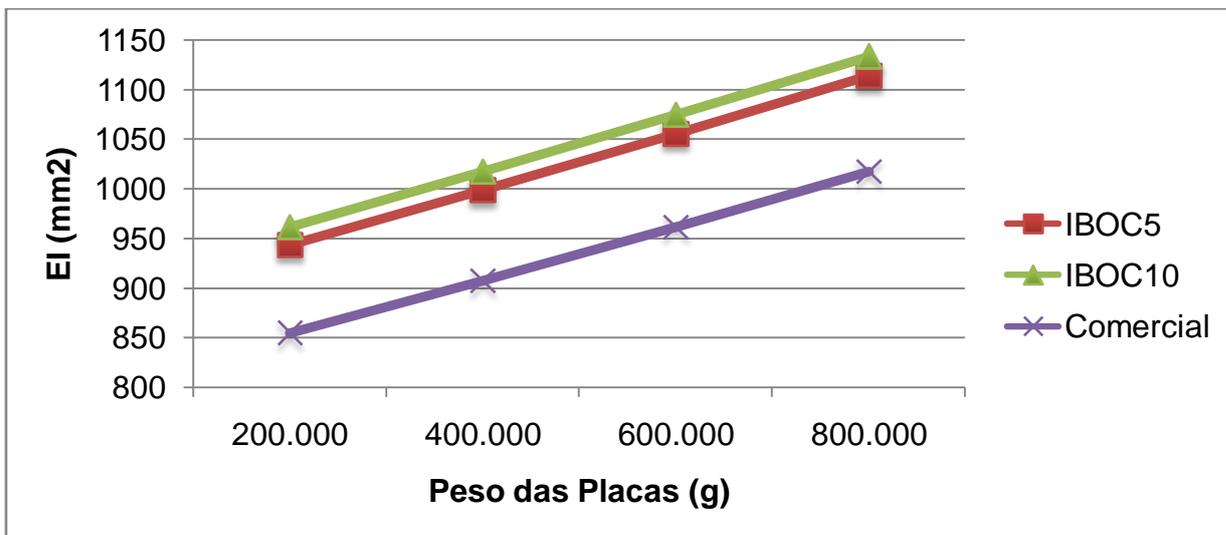


Figura 30: Valores de espalhabilidade das emulsões IBOC5, IBOC10 e Produto Comercial em relação às massas aplicadas no tempo zero (t_0). $n = 3$

De forma similar, os valores calculados de espalhabilidade após teste de estresse térmico de 12 dias (t_{12}) (**FIGURA 31**), aumentaram de forma significativa ($p < 0,001$, ANOVA) quando houve aumento das massas aplicadas. Também não foram observadas alterações significativas ($p > 0,05$) nos perfis de espalhabilidade das amostras IBOC5 e IBOC10 quando comparadas entre si e com o produto comercial.

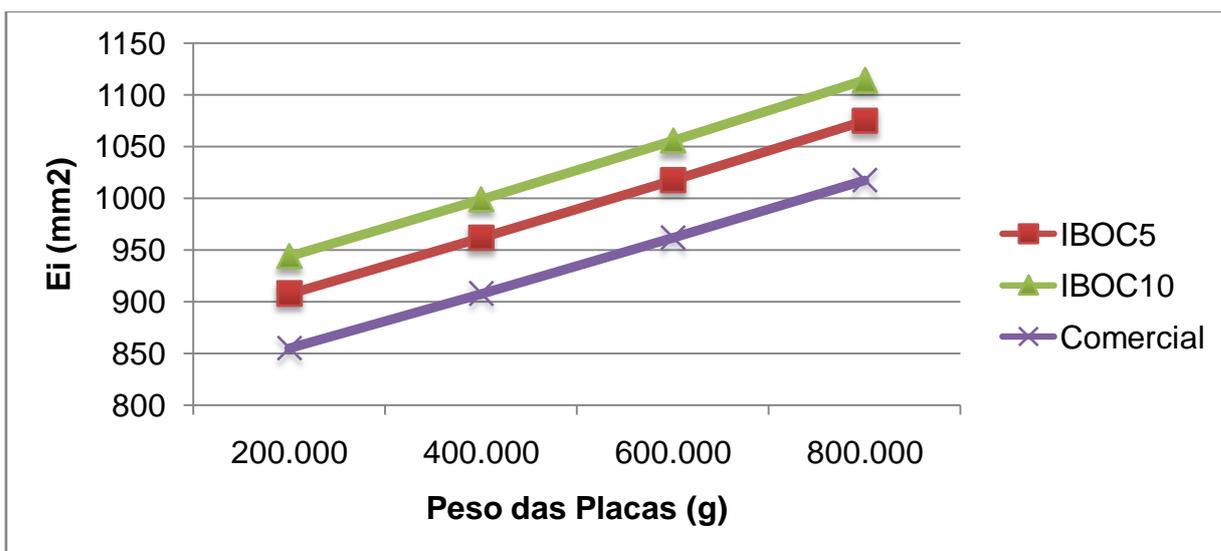


Figura 31: Valores de espalhabilidade das emulsões IBOC5, IBOC10 e Produto Comercial em relação às massas aplicadas após 12 dias de estresse térmico (t_{12}). $n = 3$

Ao comparar os resultados de espalhabilidade das mesmas amostras no tempo zero (t_0) com aqueles no tempo de 12 dias (t_{12}), não houveram diferenças significativas ($p > 0,05$). Pode-se, então, observar que mesmo após o estresse térmico das amostras não houve alteração das características reológicas das amostras. Este resultado é de fundamental importância, pois serve como auxílio no prognóstico dos efeitos das formulações e do processamento nas características do produto e na avaliação de sua qualidade e estabilidade (BORGHETTI & KNORST, 2006).

Os resultados do teor de ibuprofeno presente nas amostras IBOC5, IBOC10 e produto comercial no tempo zero (t_0) e 12 dias após estresse térmico (t_{12}) estão de acordo com a faixa de especificação estabelecida pela British pharmacopoeia, 2014 (95 a 105%). Estes dados demonstram que mesmo após o período de estresse térmico em que foram submetidas, as amostras mantiveram suas estabilidades químicas, não apresentando teor abaixo da especificação farmacopeica. O teor da amostra do controle positivo foi avaliado ($99,7 \pm 0,08$) no tempo zero (t_0) e o resultado, também, foi satisfatório.

4.3.1.1. Avaliação por microscopia óptica das amostras IBOC5 e IBOC10 no tempo zero (t_0)

Após o desenvolvimento farmacotécnico das amostras foram feitas imagens por câmera digital acoplada a microscopia óptica (**FIGURAS 32 e 33**) no tempo zero (t_0) para avaliar a morfologia das gotículas das amostras assim como seus tamanhos e se houve presença de cristais de ibuprofeno presentes nas amostras .

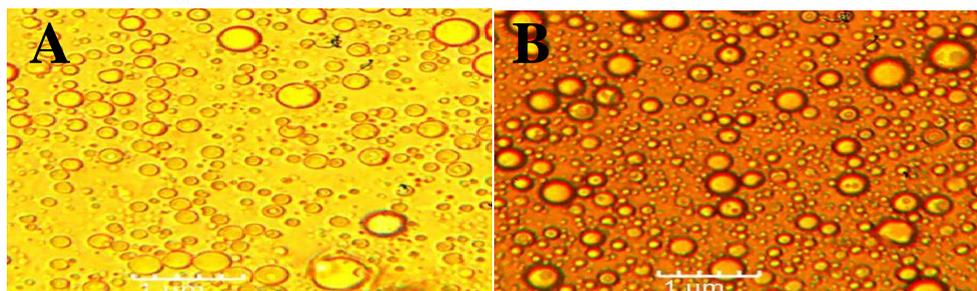


Figura 32: Imagens em microscopia óptica das amostras IBOC5 (A) e IBOC10 (B) com aumento de lente objetiva de 40x.

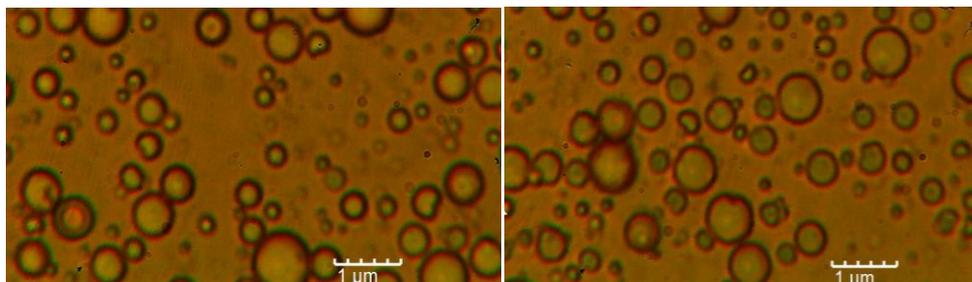


Figura 33: Imagens em microscopia óptica das amostras IBOC5 (A) e IBOC10 (B) com aumento de lente objetiva de 100x.

Pelas imagens podemos observar nas amostras IBOC5 e IBOC10 a presença de gotículas da fase interna (oleosa) dispersas de forma descontínua na fase externa (aquosa). É possível, também, observar que as duas amostras apresentam morfologias similares das gotículas formadas e com tamanhos muito semelhantes. Este dado torna-se importante, pois, demonstra que independentemente da concentração do óleo de copaíba adicionada, as gotículas da fase interna permanecem estáveis.

Tanto na objetiva de 40x como na de 100x não foram constatados a presença de cristais de ibuprofeno. Este resultado sugere que houve total solubilização do IBU nas amostras, possivelmente, facilitada pela levigação do IBU com o óleo de copaíba no momento do desenvolvimento das amostras. Resultado semelhante foi encontrado por Santis, et al., 2012 ao avaliar a solubilidade do fármaco nifedipina adicionada em sistema microemulsionado para liberação transcutânea.

4.4. Avaliação da permeação e penetração cutânea *in vitro* do IBU

4.4.1. Análise da metodologia analítica de IBU

Para quantificação do IBU nas amostras avaliadas pelo teste de permeação e penetração cutânea *in vitro* foi usado o método analítico por CLAE descrito no item 3.2.2.1.1. A linearidade e os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) do método foram determinados.

Para a determinação da curva analítica do IBU, foi preparada uma solução com ibuprofeno padrão SQR na concentração de 1000µg/mL em tampão fosfato pH = 7,4. A partir desta solução foram feitas diluições nas concentrações de 0,5; 1; 5; 10; 25, 50, 100 e 200µg/mL na fase móvel. Os valores da área obtidos foram plotados com as respectivas

concentrações e foi calculada a equação da reta e o coeficiente de correlação (r) conforme demonstrados na **FIGURA 34**.

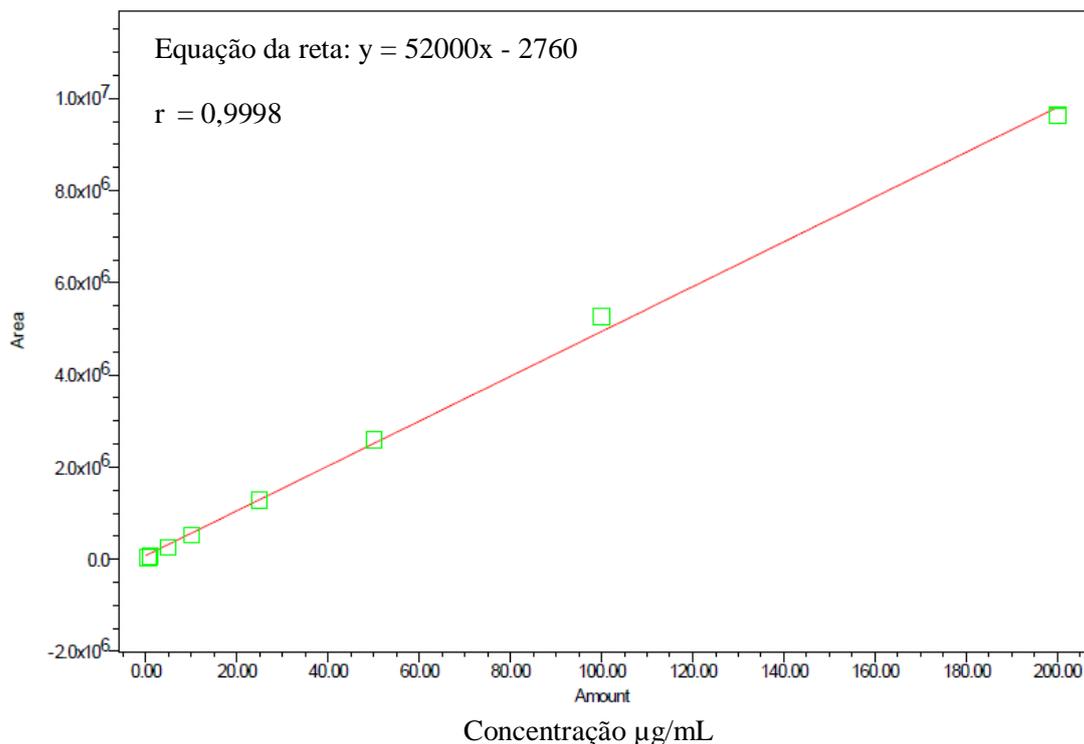


Figura 34: Curva analítica do padrão do IBU em CLAE para o teste de linearidade, utilizando como fase móvel o metanol: água (75:25 v/v) ajustado a pH 3,0 com ácido ortofosfórico.

O método apresentou linearidade no intervalo de 0,5 a 200 µg/mL com uma relação entre a concentração do analito e a área do pico expressa pela equação de regressão: $y = 52000x - 2760$ e com coeficiente de correlação de 0,9998, atendendo as especificações da RE n° 899 que recomenda um coeficiente de correlação de no mínimo de 0,99. O tempo de retenção do IBU nas condições empregadas foi de 5,301 minutos.

O LOD é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas para este método. Como, para este método analítico foi utilizado CLAE, o LOD foi determinado com base na relação de três vezes o ruído da linha de base de acordo com a recomendação da Resolução RE 899 de 2003.

Já o LOQ é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. O LOQ, também, pode ser determinado por meio do ruído da linha de base. Neste caso, foi considerado como LOQ a concentração que produziu uma relação sinal-ruído superior a 10:1.

Para a determinação do LOD e LOQ foi preparada uma solução de metanol: água (75:25 v/v) ajustado a pH 3,0 com ácido ortofosfórico (fase móvel) e injetadas 5 amostras com esta solução para análise da área do ruído.

Em seguida, a partir de uma solução de 1000 µg/mL de ibuprofeno padrão SQR na fase móvel, foram feitas diluições nas concentrações de 0,125; 0,250 e 0,500 µg/mL. As análises foram feitas em 5 réplicas (n = 5) e a média das áreas dos picos foi calculada. O LOD e LOQ foram encontrados a partir da análise comparativa destas médias com a média do ruído da solução da fase móvel conforme demonstrados na **TABELA 07**.

Tabela 07: Cálculo do Limite de Detecção e Quantificação para avaliação dos resultados do experimento de permeação e penetração *in vitro*.

n	Fase Móvel	Solução ibuprofeno padrão SQR (µg/mL)		
		0,125	0,250	0,500
1	1480	6752	13213	25301
2	1562	6216	12140	25147
3	1429	3906	12526	25212
4	1055	5551	12834	25184
5	1340	5436	12647	25224
Média	1373	5573*	12672	25213**
DPR%	14,22	19,26	3,11	0,22

* Valor da média superior a 3 vezes o valor da média do ruído (LOD); **Valor da média superior a 10 vezes o valor da média do ruído (LOQ).

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 06, o LOD de 0,125 µg/mL e o LOQ de 0,500 µg/mL (DPR = 0,22%) foram considerados satisfatórios para a finalidade do trabalho proposto e esta em acordo com a recomendação da Resolução RE 899 de 2003.

4.4.2. Análises de permeação e penetração cutânea do IBU com utilização da pele de orelha suína

O monitoramento da permeação do fármaco IBU pela pele suína foi realizado através do cálculo da quantidade de IBU na solução receptora nos 5 tempos (90; 180; 270; 360 e 450 min.) de coleta das amostras controle positivo (CP), comercial, IBOC5 e IBOC10.

As análises das quantidades de IBU foram feitas por CLAE utilizando a equação da curva analítica construída para o teste de linearidade. Em todos os pontos de coleta, as amostras estavam dentro do intervalo linear proposto pelo método (0,5; 1; 5; 10; 25, 50, 100 e 200 μ g/mL).

Nas **FIGURAS 35 a 38** é possível observar a evolução dos picos cromatográficos das amostras analisadas nos 5 tempos de coleta.

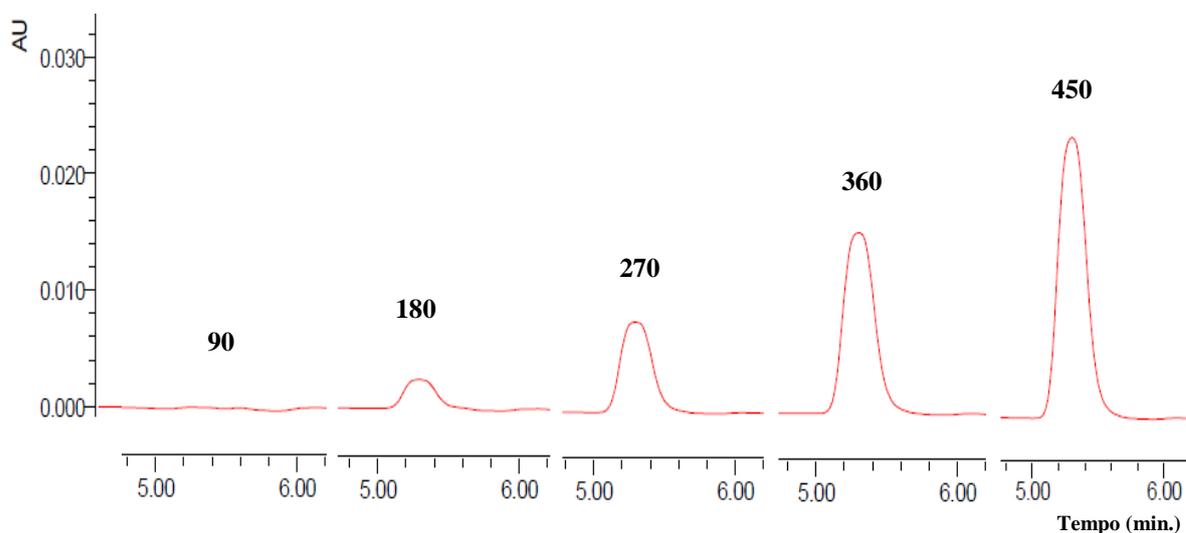


Figura 35: Evolução dos picos cromatográficos em CLAE de IBU da amostra do controle positivo (CP) entre a primeira (90min.) e a quinta coleta (450min.) em uma célula de difusão vertical de Franz. Tempo de retenção IBU: 5,301min.

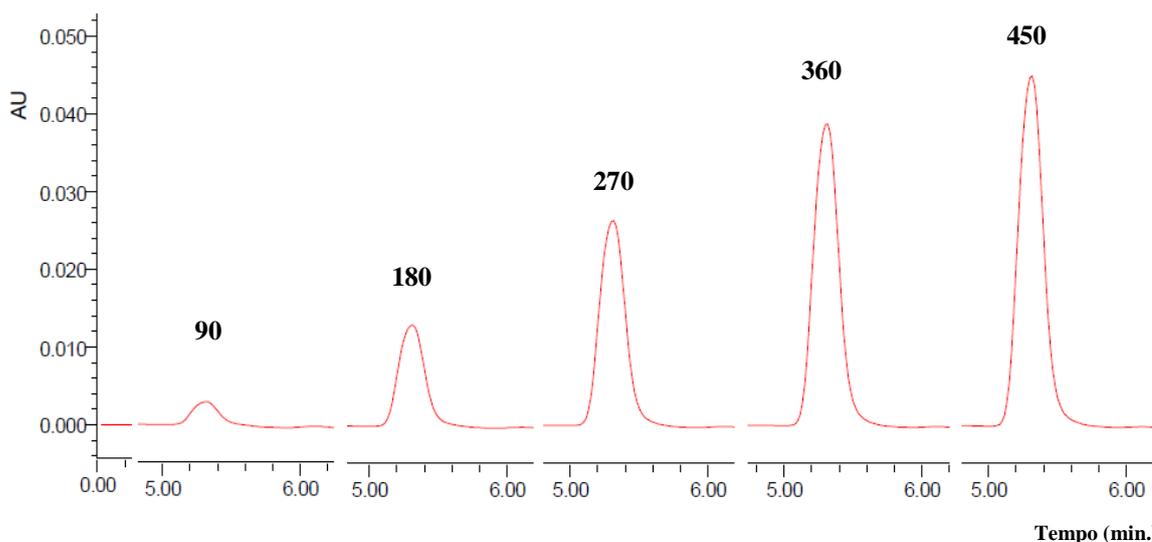


Figura 36: Evolução dos picos cromatográficos em CLAE de IBU da amostra do produto comercial entre a primeira (90min.) e a quinta coleta (450min.) em uma célula de difusão vertical de Franz. Tempo de retenção IBU: 5,301min.

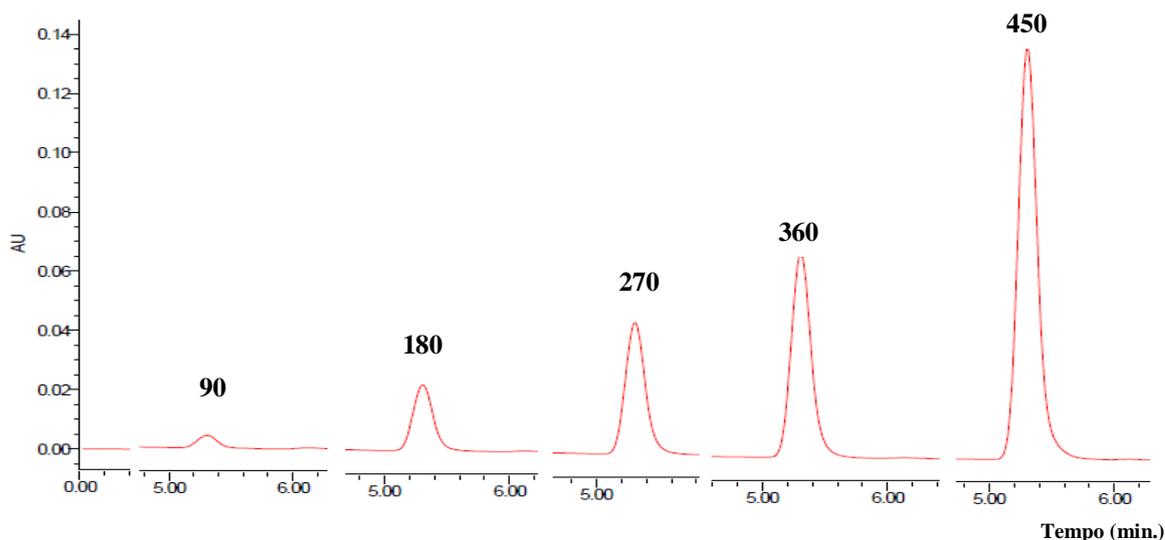


Figura 37: Evolução dos picos cromatográficos em CLAE de IBU da amostra IBOC5 entre a primeira (90min.) e a quinta coleta (450min.) em uma célula de difusão vertical de Franz. Tempo de retenção IBU: 5,301min.

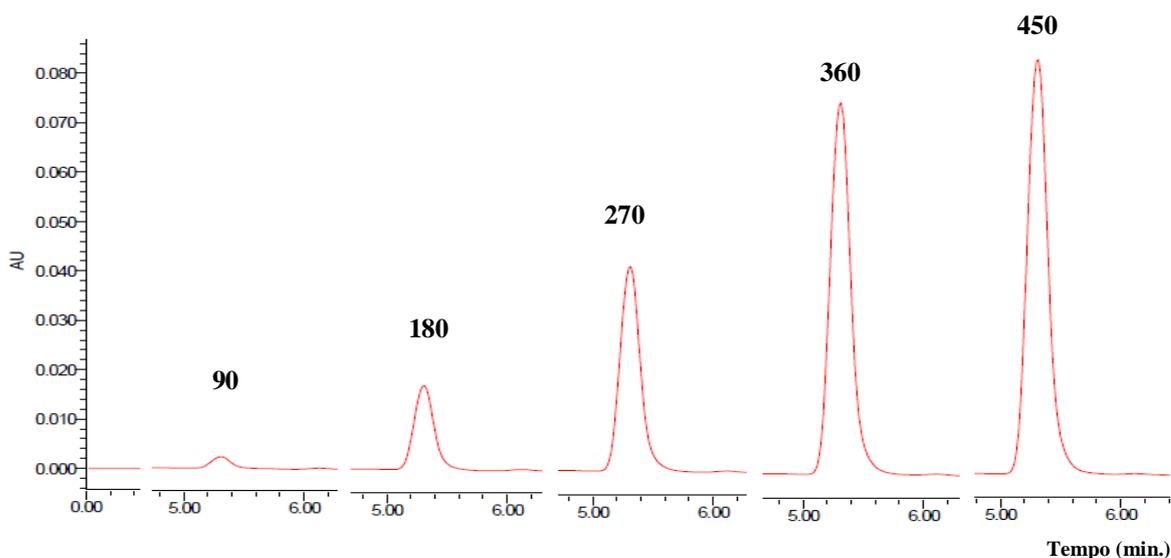


Figura 38: Evolução dos picos cromatográficos em CLAE de IBU da amostra IBOC10 entre a primeira (90min.) e a quinta coleta (450min.) em uma célula de difusão vertical de Franz. Tempo de retenção IBU: 5,301min.

Na evolução dos picos cromatográficos demonstrados nas Figuras 35 a 38 é possível observar que houve permeação do fármaco ibuprofeno pela pele suína entre o compartimento doador e o receptor durante o experimento na célula de difusão vertical de Franz. Este comportamento foi observado em todas as amostras testadas.

Herkenne et al., 2007 também evidenciaram um aumento da permeação do fármaco ibuprofeno pela pele suína ao avaliar quatro formulações comerciais contendo ibuprofeno 5% em gel pelo teste de permeação em célula de difusão de vertical no período de 8 horas.

As amostras IBOC5 e IBOC10 diferem das outras por possuírem o óleo de copaíba em suas composições. Pode ser observado nos cromatogramas, que os maiores picos de IBU alcançados após 450 minutos do experimento pertencem às amostras contendo o óleo de copaíba. Este resultado sugere a capacidade deste óleo na promoção de permeação cutânea do IBU pela pele suína.

Os resultados demonstrados na **FIGURA 39** representam a média das quantidades totais cedidas de IBU pela área de difusão da pele suína durante as 5 coletas realizadas para cada célula.

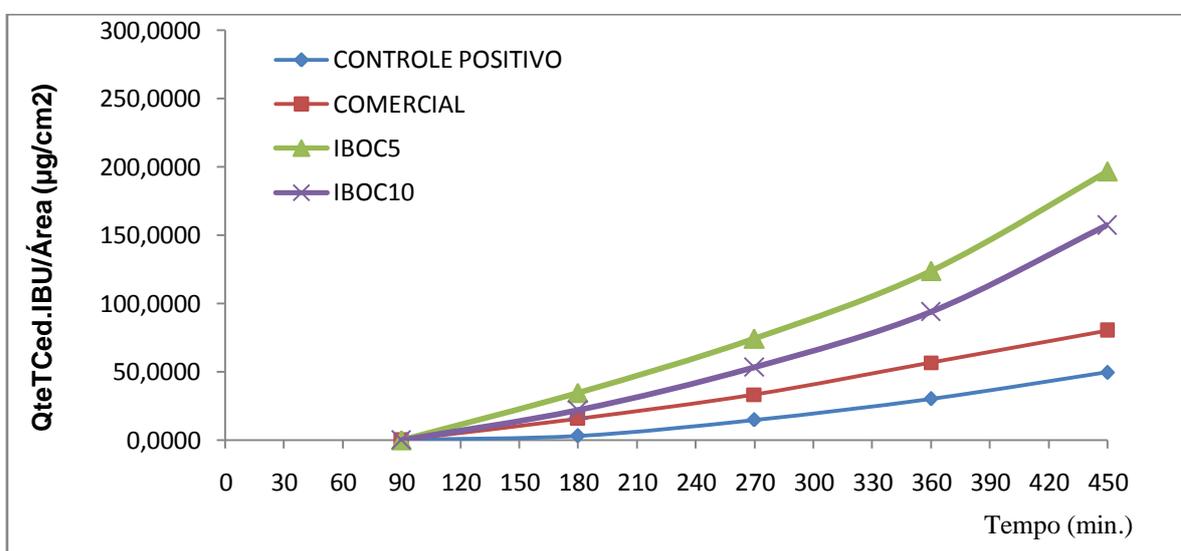


Figura 39: Gráfico comparativo da permeação das amostras CP (Controle positivo), produto comercial, IBOC5 e IBOC10 expressos pela quantidade total cedida de IBU em função da área da pele suína versus o tempo em minutos.

Na avaliação da permeação cutânea do IBU pela pele suína é possível verificar que as amostras IBOC5 e IBOC10 apresentaram melhor permeação cutânea ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) quando comparadas ao produto comercial e controle positivo no estado estacionário. As diferenças da permeação no tempo de 450 minutos foram avaliadas (ANOVA) e estão apresentadas na **FIGURA 40**. O controle positivo não apresentou diferença ($p > 0,05$) quando comparado ao produto comercial. Já a amostra IBOC5 apresentou diferença significativa ($p < 0,01$) quando comparada ao controle positivo (CP) e produto comercial. A amostra IBOC10, também, mostrou ser diferente ($p < 0,05$) em relação ao controle positivo e produto comercial. Entretanto, quando os resultados de permeação das amostras IBOC5 e IBOC10 são

comparados entre si, foi possível confirmar que as mesmas não apresentaram diferença ($p > 0,05$) após o tempo total da análise. Este dado torna-se importante, pois apesar do óleo de copaíba demonstrar que apresenta atividade promotora de permeação do IBU em comparação com o controle positivo, ele não mostrou ser mais eficiente ao aumentar sua concentração nas amostras para o teste realizado.

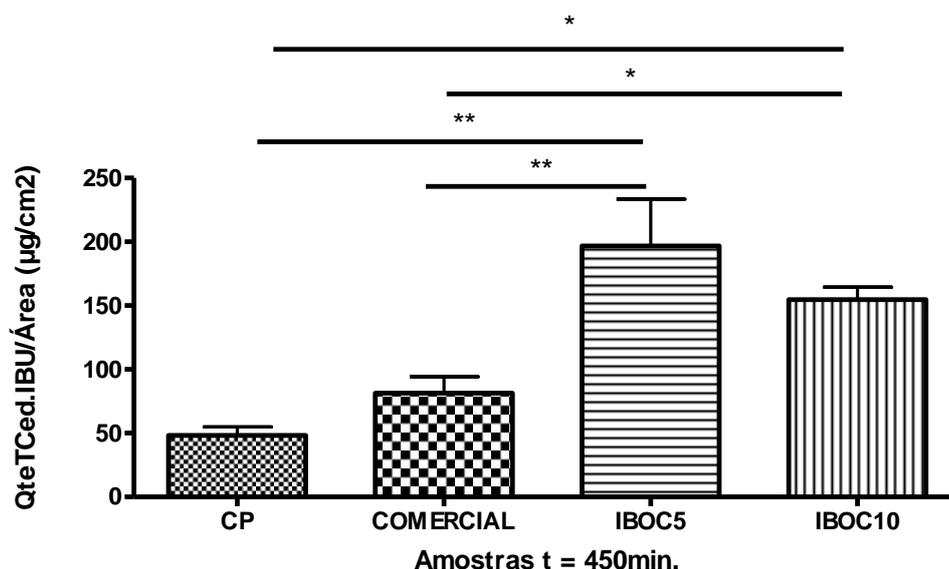


Figura 40: Comparação da eficiência de permeação das amostras do CP (controle positivo), produto comercial, IBOC5 e IBOC10 no tempo de 450 minutos após o início do experimento de permeação utilizando células de difusão de Franz com pele suína. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

A **TABELA 08** apresenta os resultados do fluxo (J) e *lag time* (T_L) calculados pela média das três células utilizadas para cada amostra no teste de difusão vertical de Franz utilizando pele suína como modelo de membrana.

Tabela 08: Resultado das médias dos fluxos, coeficiente de permeabilidade e *lag time* (min.) das amostras.

Amostras	J ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)*	K_p (cm/h)*	T_L (min.)*
CP	$10,32 \pm 1,52$	1,03	120
Comercial	$14,44 \pm 2,39$	1,44	90
IBOC5	$35,72 \pm 6,35$	3,57	90
IBOC10	$29,78 \pm 2,41$	2,98	90

J: Fluxo; K_p : Coeficiente de permeabilidade; T_L : *lag time*.

*Média das três células analisadas ($n = 3$). \pm EPM: Erro padrão da média. $n = 3$

Os resultados encontrados para o fluxo (J) de permeação do IBU pela pele suína reforçam aqueles encontrados para a permeação das amostras no tempo de 450 minutos, ou seja, estatisticamente (ANOVA) o controle positivo não apresenta diferença ($p > 0,05$) para o produto comercial. As amostras IBOC5 ($p < 0,01$) e IBOC10 ($p < 0,05$) apresentaram diferenças quando comparados aos valores de fluxo tanto com o controle positivo quanto ao produto comercial. Na comparação entre as amostras IBOC5 e IBOC10, estas não apresentaram diferenças ($p > 0,05$) para os resultados de fluxo.

Resultado semelhante foi encontrado por Oliveira et al., 2010 quando comparou a eficiência na permeação cutânea do óleo de copaíba para o fármaco ácido kójico utilizando pele de cobra como modelo de membrana em célula de difusão vertical de Franz. Duas concentrações de óleo de copaíba (25 e 50%) foram avaliadas e apesar da porcentagem de permeação do ácido kójico ter sido mais rápida na concentração de 50%, as duas concentrações não apresentaram diferenças quando comparadas entre si ao analisar o fluxo de permeação. Este trabalho concluiu que tanto a concentração de 25% como 50% podem ser utilizadas como promotores de permeação cutânea para fármacos hidrofílicos.

Salim et al., 2012 avaliou a permeação cutânea do ibuprofeno em células de difusão de Franz com pele abdominal de ratos como membrana natural de duas nanoemulsões contendo óleo de palma e hidrocolóide como promotor de permeação. Os fluxos (J) de permeação encontrados nas amostras da nanoemulsão simples e nanoemulsão adicionada de hidrocolóide foram de $25,25 \pm 5,87$ e $49,32 \pm 4,88$, respectivamente. Considerando que as formas de nanoemulsões envolvem processos de produção complexos quando comparados às emulsões simples e que a pele abdominal de rato não apresenta tantas semelhanças com a pele humana quando comparada à pele de orelha suína, as amostras IBOC5 e IBOC10 demonstram ser mais promissoras ao analisar os fluxos de permeação do Ibuprofeno (TABELA 07).

Na análise do *lag time* ou tempo de latência, que é o tempo que o fármaco leva para iniciar sua permeação, é possível observar que o controle positivo apresentou um valor maior (120min.) que as demais amostras (90min.). Este dado pode ser justificado pela ausência de promotor de permeação cutânea nesta preparação, já que o óleo de copaíba foi utilizado nas amostras IBOC5 e IBOC10 e o produto comercial possui nerolidol, terpeno, também, considerado como promotor de permeação de fármacos (WILLIAMS & BARRY, 2012).

Decorrido o tempo de latência, foi possível definir a cinética de permeação por três modelos matemáticos (Higuchi, primeira ordem ou ordem zero) visando à determinação da ordem do processo. O coeficiente de correlação linear (R^2) para cada modelo pesquisado encontra-se na **TABELA 09**.

Tabela 09: Comportamentos cinéticos de permeação cutânea do fármaco IBU e seus respectivos coeficientes de correlação linear das amostras analisadas.

Modelos matemáticos	Coeficiente de correlação linear (R^2) das amostras			
	CP	Comercial	IBOC5	IBOC10
Higuchi	0,8773	0,9592	0,9322	0,9054
Primeira ordem	0,9412	0,9913	0,9749	0,9585
Ordem zero	0,9415	0,9915	0,9759	0,9594

n = 3

De acordo com os resultados todas as amostras apresentam um perfil cinético de permeação que segue o modelo de ordem zero em decorrência do maior valor encontrado para R^2 . Este modelo indica que o fluxo (J) de permeação é constante, no intervalo de tempo calculado (após o lag time), e independe da concentração do fármaco aplicado. Este modelo cinético é característico de formulações com doses infinitas (SATO et al., 2007; AGNES & ORTEGA, 2003).

Silva et al., 2009 encontrou resultados semelhantes de cinética de permeação cutânea ao avaliar a absorção transcutânea *in vitro* do fármaco diclofenaco de dietilamônio veiculado em uma microemulsão. Foi utilizada para este estudo a pele de orelha suína como membrana natural de permeação.

Ao finalizar os experimentos de permeação, a quantidade de IBU nos estratos cutâneos foi determinada após a separação dos mesmos, conforme descrito no item 3.3.4. A **FIGURA 41** mostra a quantidade de IBU detectado na epiderme e derme, 450 minutos após a aplicação das formulações na pele suína. A quantidade de IBU aumentou com a profundidade, ou seja, na derme foi detectado valor maior para o fármaco após aplicação das formulações CP (controle positivo), produto comercial, IBOC5 e IBOC10 quando comparados com os resultados da epiderme.

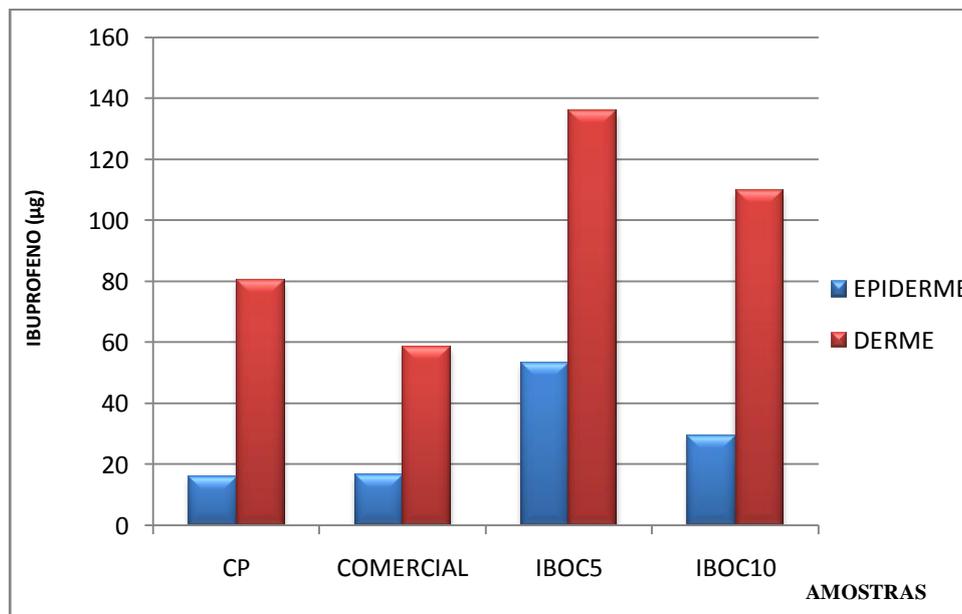


Figura 41: Gráfico comparativo das quantidades de IBU presentes nos diferentes extratos da pele suína (Epiderme e Derme) após 450 minutos da aplicação das amostras (n = 3).

Na **TABELA 10** é possível obter as quantidades em µg de IBU que penetraram na epiderme e derme após o estudo de permeação.

Tabela 10: Quantidade de IBU na epiderme e derme após 450 minutos da aplicação das amostras para o teste de permeação cutânea em aparelho de difusão vertical de Franz utilizando pele de orelha suína.

n	Quantidade de IBU Epiderme (µg)				Quantidade de IBU Derme (µg)			
	CP	COM	IBOC5	IBOC10	CP	COM	IBOC5	IBOC10
1	15,38	21,67	75,44	23,72	67,27	60,73	159,56	89,6
2	20,27	11,88	42,42	30,05	86,94	45,79	123,57	122,12
3	12,67	16,11	42,44	34,89	80,57	69,40	124,46	117,59
Média	16,10	16,55	53,43	29,55	80,57	58,64	135,86	109,77
DP	3,85	4,91	19,05	5,60	11,52	11,94	20,52	17,61

Foram analisadas as diferenças de penetração do IBU na a epiderme e derme e, para cada grupo, observou-se pelo teste t de Student, que há diferenças significativas nas amostras do controle positivo ($p < 0,01$), produto comercial ($p < 0,05$), IBOC5 ($p < 0,01$) e IBOC10 ($p < 0,05$). Este resultado reforça a hipótese do aumento da capacidade de penetração cutânea do IBU após a adição do óleo de copaíba como promotor de permeação cutânea.

4.5. Avaliação da atividade anti-inflamatória pelo teste de edema de orelha induzida pelo óleo de cróton.

Uma vez avaliada a capacidade de permeação e penetração cutânea do IBU pela adição do óleo de copaíba 5 e 10% em base emulsionada no teste *in vitro* com pele de orelha de porco, tornou-se interessante investigar a ação anti-inflamatória tópica destas preparações em modelos *in vivo* com o modelo do teste de edema de orelha induzida pela aplicação do agente flogístico óleo de cróton em camundongos.

Os resultados da avaliação da atividade anti-inflamatória das amostras pesquisadas IBOC5 e IBOC10 estão demonstrados nas **FIGURAS 42 E 43**, respectivamente.

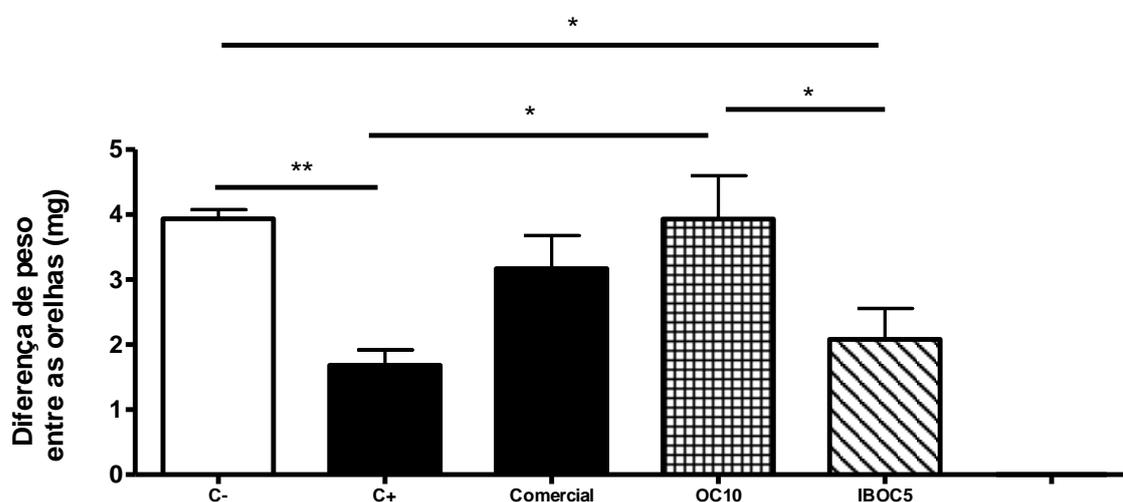


Figura 42: Efeito do creme de ibuprofeno 5% e óleo de copaíba 5% (IBOC5), creme de ibuprofeno 5% (C+), creme com óleo de copaíba 10% (OC10) e produto comercial (Comercial) sobre o edema de orelha em camundongo induzido pelo óleo de cróton. Análise estatística: ANOVA de uma via, seguida do teste de Newman Keuls (n = 6). * p < 0,05, ** p < 0,01 para análise comparativa entre as amostras.

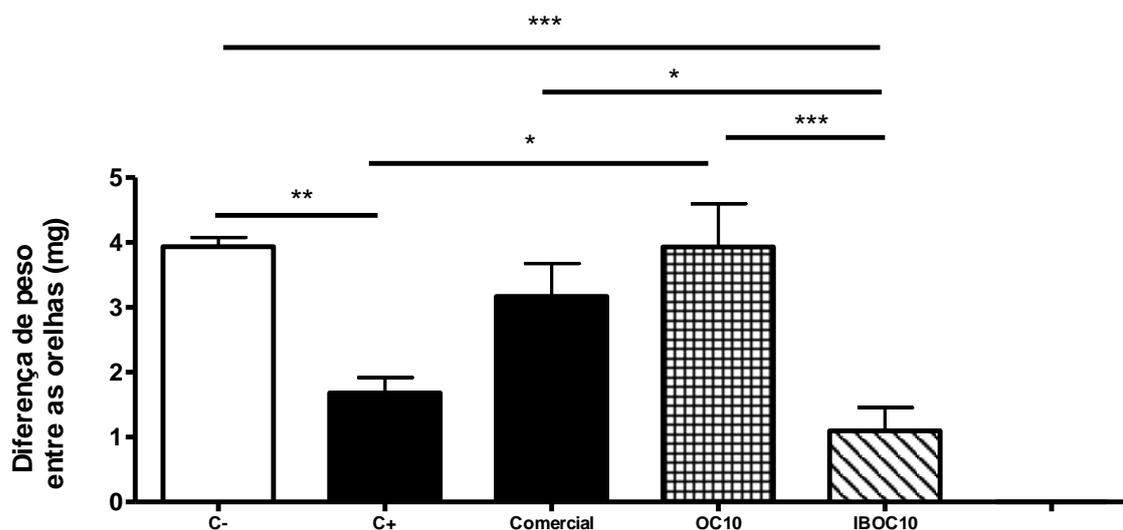


Figura 43: Efeito do creme de ibuprofeno 5% e óleo de copaíba 10% (IBOC10), creme de ibuprofeno 5% (C+), creme com óleo de copaíba 10% (OC10) e produto comercial (Comercial) sobre o edema de orelha em camundongo induzido pelo óleo de cróton. Análise estatística: ANOVA de uma via, seguida do teste de Newman Keuls (n = 6). * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001 para análise comparativa entre as amostras.

Conforme demonstrado nas **FIGURA 42 e 43** a aplicação tópica da solução de óleo de cróton 5% (v/v) na orelha dos camundongos promoveu um aumento da massa da orelha após a sexta hora do desafio com este agente flogístico. Este aumento é representado pela diferença das massas da orelha direita (teste) e orelha esquerda (branco). Quanto maior for esta diferença, maior é o edema formado após a aplicação do óleo de cróton.

Este efeito foi revertido de forma significativa pelo controle positivo (p < 0,01) e pelas amostra IBOC5 (p < 0,05) e IBOC10 (p < 0,001) quando comparados com o controle negativo (creme sem adição de ibuprofeno e óleo de copaíba). Este resultado demonstra que houve redução do processo inflamatório após aplicação do agente flogístico tanto no controle positivo (57,29%) quanto nas amostra IBOC5 (52,88%) e IBOC10 (72,03%).

Esta redução não foi confirmada ao avaliar o resultado do produto comercial e a amostra OC10 quando comparado, também, ao controle negativo (p > 0,05).

O resultado observado na amostra OC10 indica que esta não apresentou atividade para este teste. Como, a composição desta amostra contem apenas base emulsionada e óleo de copaíba 10%, podemos constatar que o óleo de copaíba, nesta concentração, não apresentou atividade anti-inflamatória para o teste de edema de orelha induzido pelo óleo de cróton. Este dado torna-se importante, pois, contraria a maioria das literaturas pesquisadas onde a

atividade anti-inflamatória do óleo de copaíba foi observada GELMINI et al., 2013; CUSTÓDIO & VEIGA-JUNIOR, 2012; SANTOS et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2010).

Não houve, também, diferença significativa ($p > 0,05$) ao comparar a atividade anti-inflamatória da amostra IBOC5, com o grupo controle positivo e produto comercial. Este dado demonstra que, para o teste de indução do processo inflamatório em orelha de camundongo, a associação do óleo de copaíba 5% com ibuprofeno 5% em creme não apresenta atividade anti-inflamatória sinérgica entre estes dois insumos, fato já comprovado anteriormente com a amostra OC10, em que o óleo de copaíba, na concentração de 10%, não apresentou atividade anti-inflamatória para este teste. Este resultado conflita ao encontrado no teste de penetração cutânea *in vitro* onde o IBU associado ao óleo de copaíba nesta mesma concentração apresentou penetração em maior quantidade na derme em relação à epiderme. Pelo fato do processo inflamatório tópico levar a formação de edema, esperava-se que o anti-inflamatório IBU ao chegar em maior quantidade na derme pudesse reduzir o edema de forma mais eficaz.

Tabela 11: Porcentagem de inibição da atividade inflamatória das amostras avaliadas pelo método de edema de orelha utilizando óleo de cróton como agente flogístico.

AMOSTRA	INIBIÇÃO (%)	DPR (%)
C-	0,0	8,90
C+	57,29	39,42
Comercial	19,49	39,42
OC10	0,0	41,39
IBOC5	52,88	51,03
IBOC10	72,03	79,46

Legenda: C-: Controle Negativo; C+: Controle Positivo; Comercial: Produto Comercial; OC10: Creme com óleo de copaíba 10%; IBOC5: Creme com ibuprofeno 5% e óleo de copaíba 5%; IBOC10: Creme com ibuprofeno 5% e óleo de copaíba 10%. DPR: Devio Padrão Relativo.

Na **FIGURA 43** fica evidente as diferenças ($p < 0,001$) entre a amostra IBOC10 com o controle negativo e OC10. Esta amostra, também, apresentou diferença ($p < 0,05$) quando comparada ao produto comercial. Entretanto, mesmo com a inibição (72,03%) da atividade inflamatória da IBOC10 quando comparada ao controle negativo, esta não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$) em relação ao controle positivo (57,29%). Este resultado, também, demonstra a falta de atividade anti-inflamatória sinérgica da associação do óleo de copaíba 10% com ibuprofeno 5% assim como o óleo de copaíba, nesta concentração, não influenciou a penetração cutânea do fármaco ibuprofeno para este testes.

5. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados encontrados neste presente estudo, foi possível concluir:

O método analítico de identificação e quantificação dos constituintes do óleo de copaíba por análise em CG-EM demonstrou ser satisfatório tendo o β -cariofileno como constituinte majoritário da amostra analisada.

O método utilizado para análise do teor de ibuprofeno matéria prima e teor de ibuprofeno nas amostras desenvolvidas em CLAE demonstrou linearidade e precisão adequadas.

As formulações propostas foram possíveis de serem desenvolvidas e apresentaram estabilidade física e química para os testes de estabilidade preliminar para as análises de caracteres organolépticas, pH, centrifugação, espalhabilidade, microscopia óptica e teor de ibuprofeno.

O método analítico para avaliar o teor de ibuprofeno nas amostras provenientes do teste de permeação e penetração cutânea mostrou ser linear e os limites de detecção e quantificação foram satisfatórios para as análises realizadas.

O estudo de permeação cutânea em células de difusão vertical utilizando pele de orelha suína demonstrou que o óleo de copaíba nas concentrações de 5 e 10% incorporados na base emulsionada testada, melhorou significativamente a permeação cutânea do fármaco ibuprofeno quando comparados ao controle positivo e produto comercial disponível.

O ensaio de penetração cutânea realizado com a pele suína após o teste de permeação mostrou uma maior penetração do ibuprofeno na derme das amostras contendo o óleo de copaíba a 5 e 10%. Este resultado demonstrou que o óleo de copaíba aumentou a profundidade da penetração do IBU nos estratos cutâneos.

Os resultados do teste de edema de orelha em camundongos induzido pela aplicação do óleo de cróton demonstrou que as amostras do controle positivo e dos cremes contendo 5 e 10% de óleo de copaíba e ibuprofeno 5% reduziram o processo inflamatório em comparação com o controle negativo. Este mesmo teste mostrou que a aplicação do óleo de copaíba 10% em creme e o creme comercial não reduziram o processo inflamatório em comparação com o controle negativo. Não houve diferença significativa na redução do processo inflamatório após a aplicação tópica das amostras de ibuprofeno contendo 5 e 10% de óleo de copaíba quando comparadas ao controle positivo. Sugere-se o teste *in vivo* não tenha sido o mais adequado para avaliação da penetração cutânea das amostras analisadas tendo em vista os resultados do teste *in vitro* que demonstrou aumento da permeação e penetração cutânea do ibuprofeno após adição do óleo de copaíba nas amostras.

6. REFERÊNCIAS

ADAMS, R.P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/ion trap mass spectrometry**. Carol Stream: Allured Pub, 1995.

AGNES, E.J.; ORTEGA, G.G. **Modelos matemáticos e físico-química da difusão**. Caderno de Farmácia, Porto Alegre, v. 19, n.1, p.1-9, 2003.

ALLEN JR., L.V. **The art, science and technology of pharmaceutical compounding**. 2. ed. Washington: American Pharmaceutical Association, 2002.

ALLEN JR., L. V.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. **Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos**. 9. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

ALVES, M. P. **Formas farmacêuticas plásticas contendo nanocápsulas, nanosferas e nanoemulsões de nimesulida: desenvolvimento, caracterização e avaliação da permeação cutânea *in vitro***. In Press. Tese de Doutorado da Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN JR., L. V. **Farmacotécnica: Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos**. 6. ed. São Paulo: Editorial Premier, 2000.

ANTONIO, M.E.C.O. **Permeação cutânea *in vitro* como ferramenta auxiliar para o estudo de formulações semi-sólidas de cetoconazol para aplicações tópicas**. In Press. Dissertação de mestrado da Faculdade de Farmácia, setor de Ciência da Saúde da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

ARNOLD, J. J.; ASBILL, S. **The release and transdermal penetration of baclofen formulated in a polaxamer lecithin organogel**. International Journal of Pharmaceutical Compounding. v.13, n.6, nov/dec., 2009.

AULTON, M.E. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

BABY, A.R.; HAROUTIOUNIAN-FILHO, C.A.; SARRUF, F.D.; TAVANTE-JÚNIOR, C.R.; PINTO, C.A.S.O.; ZAGUE, V.; ARÊAS, E.P.G.; KANEKO, T.M.; VELASCO, M.V.R. **Estabilidade e estudo de penetração cutânea in vitro da rutina veiculada em uma emulsão cosmética através de um modelo de biomembrana alternativo.** Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, v.44, n.2, abr/jun., 2008.

BAERT, B.; VANSTEELANDTB, S.; DE SPIEGELEERA, B. **Ion mobility spectrometry as a high-throughput technique for in vitro transdermal Franz diffusion cell experiments of ibuprofen.** Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v. 55, p. 472–478, 2011.

BAJAJ, S.; WHITEMAN, A.; BRANDNER, B. **Transdermal drug delivery in pain management** .Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain. Published by Oxford University Press on behalf of The Board of Directors of the British Journal of Anaesthesia.UK, 2011.

BARBERO, A.M.; FRASCH, H.F. **Pig and guinea pig skin as surrogates for human *in vitro* penetration studies: a quantitative review.** Toxicology in vitro, v.23, p.1–13, 2009.

BARRY, B.W.; BENNETT, S.L. **Effect of penetration enhancers on the permeation of mannitol, hydrocortisone and progesterone through human skin.** The Journal of Pharmacy and Pharmacology, v.39, n.7, p.535-546, 1987.

BEJARANO, P.F. **Ibuprofeno y analgesia.** EMB (ed. esp.) v.5, p.39-42, jan/fev., 2006.

BERTOLINI, W.L.H.M. **A influência do D-limoneno como promotor de absorção do ácido 5-aminolevulínico para terapia fotodinâmica do câncer de pele: avaliação *in vitro* e *in vivo* da permeação e retenção cutâneas.** Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

BATHIA, K.S.; GAO, S.; SINGH, J. **Effect of penetration enhancers and iontophoresis in the FT-IR spectroscopy and LHRH permeability through porcine skin.** J. Controlled Release, Amsterdam, v.47, p.81-89, 1997.

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

BORGHETTI, G.S.; KNORST, M.T. **Desenvolvimento e avaliação da estabilidade física de loções O/A contendo filtros solares.** Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v.42, n.4, 2006.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 899 de 29 de maio de 2003. **Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos.** Disponível em <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=15132&word=> Acesso em 18 de agosto de 2010.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para avaliação de segurança de produtos cosméticos.** 2 ed., Brasília: Editora ANVISA, 2012.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de estabilidade de produtos cosméticos.** 1 ed., Brasília: Editora ANVISA, 2004.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de controle de qualidade de produtos cosméticos.** 2 ed., Brasília: Editora ANVISA, 2008.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopéia Brasileira.** 5 ed., Brasília: Editora ANVISA, 2010.

BRITISH PHARMACOPOEIA. 3.v. London: The stationery office, 2014.

CARLI, R.B.G.; SIQUEIRA, P.R.A.; KAISER; M.L.; FREITAS, R.A.; DE SOUZA, M.; CECHINEL-FILHO, V.; LUCINDA-SILVA, R.M. **Topical anti-inflammatory effect of creams containing kaurenoic acid isolated from Wedelia paludosa in mice.** Latin American Journal of Pharmacy, v. 28, n.4, p. 594-598, 2009.

CARMIGNAN, F. **Desenvolvimento de microsferas de ibuprofeno a partir dos biopolímero spoli-hidroxicanoatos. Estudo da influência das características físico-químicas das microsferas sobre o perfil de liberação do fármaco e degradação das**

partículas. Dissertação de Mestrado do Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

CARMO, F.A. **Preparo e avaliação de formulações transdérmicas de doxazosina para o tratamento da hiperplasia prostática benigna.** Tese de Doutorado da Faculdade de Farmácia. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2011.

CLEARY, G.W. **Transdermal Concepts and Perspectives.** Miami: Key Pharmaceuticals, 1982.

COLIPA Guidelines – Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-Food Products. Annex 10 – **Guidelines for in vitro methods to assess percutaneous absorption of cosmetic ingredients.** In: Notes of Guidance for Testing of Cosmetic Ingredients for their Safety Evaluation, Monograph SCCNFP/1321, Comunidade Européia. Bruxelas, 2000, p.77-85.

COSTA, E.M.M. **Permeação de Emulsões Comerciais de Diclofenaco.** Dissertação de Mestrado do Departamento de Química, Universidade de Aveiro, Portugal, 2010.

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

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

DEWICK, P.M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach.** 2 ed., England, John Wiley & Sons Ltd, 2002.

FERREIRA, A.O. **Guia Prático da Farmácia Magistral.** 3 ed., v. 2, São Paulo: Pharmabooks, 2008.

FLORENCE, A.T.; ATTWOOD, D. **Princípios físico-químicos em farmácia.** 3. ed. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2003.

GARCIA, B.G.B.C.; STAHLKE, E.V.R.S.; VIEIRA, I.R.; CALLEGARI, I.C.; CALDAS, L.S.C.; MENDES, P.H.O.; TAVARES, R.F.C.; XAVIER, Z.I.N. **Cosmiatria: Manual Dermatológico Farmacêutico**. Guarapuava: Imprensa Grafel, 2006.

GELMINI, F.; BERETTA, G.; ANSEMI, C.; CENTINI, M.; MAGNI, P.; RUSCICA, M.; CAVALCHINI, A.; FACINO, R.M. **CG-MS profiling of the phytochemical constituents of the oleoresin from *Copaifera langsdorffii* Desf. And preliminary *in vivo* evaluation of its antipsoriatic effect**. International Journal of Pharmaceutics, v.440, p.170-178, 2013.

GENARO, A.R. **Remington: A ciência e a prática da farmácia**. 20 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

GHOSH, B.; PREETHI, G.B.; MISHRA, R.; PARCHA, V. **Transdermal delivery of ibuprofen and its pro-drugs by passive diffusion and iontophoresis**. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, v.2, Suppl. 1, 2010.

GILMAN, A. G. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 9 ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill, 1996.

GRAMOSA, N.V.; SILVEIRA, E.R. **Volatile constituents of *Copaifera langsdorffii* from the Brazilian northeast**. Journal of Essential Oil Research, v.17, n.2, p.130-132, 2005.

HANSON, R. **A Primer on Release-Rate Testing of Semisolids**. Chatsworth, CA, 2010. Dissolution Technologies. Disponível em: < www.hansonresearch.com >. Acesso em: 06/09/2013.

HARRIS, M.I.N.C. **Pele: estrutura, propriedades e envelhecimento**. 3 ed. São Paulo: Editora Senac. São Paulo, 2011.

HECK, M.C.; VIANA, L.A.; VICENTINI, V.E.P. **Importância do óleo de *Copaifera sp.* (Copaíba)**. SaBios: Revista de Saúde e Biologia, v.7, n.1, p.82-90, jan/abr., 2012.

HERKENNE, C.; NAIK, A.; KALIA Y, N.; HADGRAFT, J.; GUY, R. H. **Ibuprofen Transport into and through Skin from Topical Formulations: *In Vitro* –*In Vivo* Comparison**. Journal of Investigative Dermatology, v. 127, p. 135-142, 2007.

HORINOUCI, C. D. S.; MENDES, D. A. G. B.; SOLEY, B. S.; PIETROVSKI, E. F.; FACUNDO, V. A.; SANTOS, A. R. S.; CABRINI, D. A.; OTUKI, M.F. ***Combretum leprosum Mart.(Combretaceae): Potencial as an antiproliferative and anti-inflammatory agent.*** Journal of Ethnopharmacology, n.145, p.311-319, 2013.

HUSSAIN, A.; KHAN, G. M.; SHAH, S. U.; SHAH, K. U.; RAHIM, N.; WAHAB, A.; REHMAN, A. U. **Development of a novel ketoprofen transdermal patch: Effect of almond oil as penetration enhancers on *in vitro* and *ex vivo* penetration of ketoprofen through rabbit skin.** Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences, v.25, n.1, p.227-232, jan., 2012.

KANG, L.; YAP, C.W.; LIM, P.F.C; CHEN, Y.Z.; HO, P.C.; CHAN, Y.W.; WONG, G.P.; CHAN, S.Y. **Formulation development of transdermal dosage forms: quantitative structure-activity relationship model for predicting activities of terpenes that enhance drug penetration through human skin.** Journal of Controlled Release, v.120, p.211-219, 2007.

KIELHORN, J.; MELCHING-KOLIMUB, S.; MANGELSDORF I. **Dermal Absorption - International programme on chemical safety environment health criteria.** Hanover, Fraunhofer Institute Toxicology and Experimental Medicine, 2005.

KIELHORN, J.; MELCHING-KOLLMUB, S.; MANGELSDORF, I. **Dermal Absorption - Environmental Health Criteria 235.** Switzerland, World Health Organization Press, 2006.

KOOP, H,S. **Hidrogéis binários de xantana e galactomananas com incorporação de curcumina visando uso tópico.** Tese de Doutorado, Setor de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

LAKSHMI, P.K., KUMAR, M.K., SRIDHARAN, A., BHASKARAN, S. **Formulation and evaluation of ibuprofen topical gel: A novel approach for penetration enhancement.** International Journal of Applied Pharmaceutics.v.3, p. 25-30, 2011.

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

LENNERNÄS, H, DRESSMAN, J.B. **Oral drug absorption**. Nova Iorque: Marcel Dekker, p. 51–72, 2000.

LEONARDI, G.R. **Cosmetologia Aplicada**. 2. ed. São Paulo: Editora Santa Isabel, 2008.

LÉPORI, L. R. **A pele**. Miniatlas. São Paulo: Editora Soriak, 2002.

LIMA, C.S.; MEDEIROS, B.J.L.; FAVACHO.; SANTOS, K.C.; OLIVEIRA, B.R.; TAGLIALEGNA, J.C.; DA COSTA, E.V.M.; CAMPOS, K.J.; CARVALHO, J.C.T. **Pre-clinical validation of vaginal cream containing copaíba oil (reproductive toxicology study)**. *Phytomedicine*, n. 18, p. 1013-1023, 2011.

MARCOLONGO R. **Dissolução de medicamentos: fundamentos, aplicações, aspectos regulatórios e perspectivas na área farmacêutica**. In press. Dissertação de Mestrado da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

MARGETTS, L.; SAWYER, R. **Transdermal drug delivery: principles and opioid therapy**. *British Journal of Anaesthesia*, v. 7, n. 5, 2007.

MARTINS, M.R.F.M.; VEIGA, F. **Promotores de permeação para a liberação transdérmica de fármacos: uma nova aplicação para as ciclodextrinas**. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 38, n. 1, p. 33-54, 2002.

MEYER, W.; KACZA, J.; ZSCHEMISCH, N.H.; GODYNICKI, S.; SEEGER, J. **Observations on the actual structural conditions in the stratum superficiale dermidis of porcine ear skin, with special reference to its use as model for human skin**. *Annals of Anatomy*. v.189, n.2, p.143-156, 2007.

MOGHIMI, H.R.; WILLIAMS, A.C.; BARRY, B.W. **A lamellar matrix model for stratum corneum intercellular lipids. II. Effect of geometry of the stratum corneum on**

permeation of model drugs 5-fluorouracil and oestradiol. International Journal of Pharmaceutics, v.131, p.117-129, 1996.

MONTEIRO, M.S.S.B.; OZZETTI, R.A.; VERGNANINI, A.L.; BRITO-GITIRAN, L.; VOLPATO, N.M.; FREITAS, Z.M.F.; RICCI-JUNIOR, E.; SANTOS, E.P. **Evaluation of octyl p-methoxycinnamate included in liposomes and cyclodextrins in anti-solar preparations: preparations, characterizations and in vitro penetration studies.** International Journal of Nanomedicine, v.7, p.3045–3058, 2012.

NARISHETTY, S. T.K.; PANCHAGNULA, R. **Effect of l-menthol and 1,8-cineole on phase behavior and molecular organization of SC lipids and skin permeation of zidovudine.** Journal of Controlled Release, v. 102, p. 59–70, 2005.

NICOLI, S.; PADULA, C.; AVERSA, V.; VIETTI, B.; WERTZ, P.W.; MILLET, A.; FALSON, F.; GOVONI, P.; SANTI, P. **Characterization of rabbit ear skin as a skin model for in vitro transdermal permeation experiments: histology, lipid composition and permeability.** Skin Pharmacology and Physiology, v.21, p.218– 226, 2008.

NOKHODCHI, A.; SHARABIANI, K.; RASHIDI, M.R.; GHAFOURIAN, T. **The effect of terpene concentrations on the skin penetration of diclofenac sodium.** International Journal of Pharmaceutics, v.335, p.97-105, 2007.

OBATA, Y.; ASHITAKA, Y.; KIKUCHI, S.; ISOWA, K.; TAKAYAMA, K. **A statistical approach to the development of a transdermal delivery system for ondansetron.** International Journal of Pharmaceutics, v. 399, p. 87–93, 2010.

OLIVEIRA, R.V.M.; OHARA, M.T.; VILA, M.M.D.C.; GONÇALVES, M.M. **In vitro evaluation of copaiba oil as a kojic acid skin enhancer.** Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, v.46, n.2, abr/jun., 2010.

OTUKI, M.F.; BERNARDI, C.A.; PRUDENTE, A.S.; LASKOSKI, K.; COMIG, F.; HORINOUCI, C.D.S.; GUIMARÃES, C.L.; FERREIRA, J.; DELLE-MONACHE, F.; CECHINEL-FILHO, V.; CABRINI, D.A. **Garcinia gardneriana (Planchon&Triana) Zappi. (Clusiaceae) as a Topical Anti-inflammatory Alternative for Cutaneous Inflammation.** Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology, n.109, p. 56-62, 2011.

PACHECO, N.R.; PINTO, N.C.C.; SILVA, J.M.; MENDES, R.F.; COSTA, J.C.; ARAGÃO, D.M.O.; CASTAÑON, M.C.M.N.; SHIO, E. ***Cecropia pachystachya: A Species with Expressive In Vivo Topical Anti-Inflammatory and In Vitro Antioxidant Effects.*** BioMed Research International. v.2014, 10p., 2014.

PADULA, C.; NICOLI, S.; SANTI, P. ***In Vitro Evaluation of Bioadhesive Films Containing Ibuprofen.*** Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry, v.10, p. 240-245, 2011.

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

PRAÇA, F.S.G. **Liberação e permeação *in vitro* de produtos transdérmicos: um estudo metodológico de aparatos e de condições experimentais.** In press. Tese de Doutorado da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

PRASANTHI, D.; LAKSHMI, P.K. **Terpenes: Effect of lipophilicity in enhancing transdermal delivery of alfuzosin hydrochloride.** Journal of advanced pharmaceutical technology & research, v. 3, n. 4, p. 216-223, oct/dec., 2012.

PRISTA, L.N.; BAHIA, M.F.G.; VILAR, E. **Dermofarmácia e cosmética.** v.1, Porto: Associação Nacional das Farmácias, 1995.

RANG, H. P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M; FLOWER, R.J. **Farmacologia.** 6^a Edição. São Paulo: Elsevier Editora. p. 226-247, 2008.

RAUH, L. K.; HORINOUCI, C.D.S.; LODDI, A.M.V.; PIETROVSKI, E.F.; NERIS, R.; GUIMARÃES, F.S.F.; BUCHI, D.F.; BIAVATTI, M.W.; OTUKI, M.F.; CABRINI, D.A. **Effectiveness of Vernonia scorpioides ethanolic extract against skin inflammatory processes.** Journal of Ethnopharmacology, n. 138, p. 390-397, 2011.

RIBEIRO, C. **Cosmetologia Aplicada a Dermoestética.** 2. ed. São Paulo. Editora Pharmabooks, 2010.

SALGADO, A.C.G.B. **Desenvolvimento galênico de um gel para o tratamento de dermatites no couro cabeludo.** Dissertação de Mestrado da Faculdade de Farmácia. Universidade de Lisboa. Lisboa, 2008.

SALIM, N.; BASRI, M.; RAHMAN, M.B.A.; ABDULLAH, D.K.; BASRI, H. **Modification of palm kernel oil esters nanoemulsions with hydrocolloid gum for enhanced topical delivery of ibuprofen.** International Journal of Nanomedicine, v.7, p. 4739–4747, 2012.

SANTIS, A.K.; FREITAS, Z.M.F.; RICCI-JUNIOR, E.; BRITO-GITIRANA, L.; FONSECA, L.B.; SANTOS, E.P. **Nifedipine in semi-solid formulations for topical use in peripheral vascular disease: preparation, characterization, and permeation assay.** Drug Development and Industrial Pharmacy, p. 1-9, 2012.

SANTOS, A.G.; SANTOS, D.S.; SANTOS, I.R.; LIMA, R.R.; PEREIRA, A.; MOURA, L.S.; JUNIOR, R.N.C.; LAMEIRA, O.; LEAL, W.G. **Copaiba Oil-Resin Treatment Is Neuroprotective and Reduces Neutrophil Recruitment and Microglia Activation after Motor Cortex Excitotoxic Injury.** Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, v.2012, 2012.

SAPRA, B.; JAIN, S.; TIWARY, A.K. **Percutaneous Permeation Enhancement by Terpenes: Mechanistic View.**The American Association of Pharmaceutical Science Scientists (AAPS) Journal, v. 10, n. 1, mar., 2008.

SARKAR, A.B.; DUDLEY, R.; MELETHIL, S.; SPEIDEL, J.; MARKANDAKUMAR, B. **Chemical Stability of Hydrocortisone in Topical Preparation in Proprietary VersaPro™ Cream Base.** Innovations in pharmacy. v.2, n.3, 2011.

SATO, M.E.O.; GOMARA F.; PONTAROLO R.; ANDREAZZA I.F.; ZARONI, M. **Permeação cutânea *in vitro* do ácido kójico.** Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, v.43, n.2, abr/jun., 2007.

SHEN, Q.; LI, W.; LI, W. **The effect of clove oil on the transdermal delivery of ibuprofen in the rabbit by *in vitro* and *in vivo* methods.** Drug development and industrial pharmacy, v.33, p.1369–1374, 2007.

SHIOW-FERN, N.G.; ROUSE, J.; SANDERSON, D.; ECCLESTON, G. **A Comparative Study of Transmembrane Diffusion and Permeation of Ibuprofen across Synthetic Membranes Using Franz Diffusion Cells.** *Pharmaceutics*, v. 2, p. 209–223, 2010.

SILVA, J.A.; APOLINÁRIO, A.C.; SOUZA, M.S.R., DAMASCENO, B.P.G.L., MEDEIROS, A.C.D. **Administração cutânea de fármacos: desafios e estratégias para o desenvolvimento de formulações transdérmicas.** *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*.v.31, n.3, p.125-131, 2010.

SILVA, J.A.; SANTANA, D.P.; BEDOR, D.G.C.; BORBA, V.F.C.; LIRA, A. M.M.; EGITO, E. S.T. **Estudo de liberação e permeação *in vitro* do diclofenaco de dietilamônio em microemulsão gel-like.** *Química Nova*, v. 32, n. 6, 1389-1393, 2009.

SINKO, P.J. **Martin: Físico-farmácia e ciências farmacêuticas.** 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.

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

STAHL, J.; WOHLERT, M.; KIETZMANN, M. **The effect of formulation vehicles on the *in vitro* percutaneous permeation of ibuprofen.** *BMC Pharmacology*, v.11, n.12, 2011.

THOMPSON, J.E. **A prática farmacêutica na manipulação de medicamentos.** São Paulo: Artmed, 2006.

THONG, H.Y.; ZHAI, H.; MAIBACH, H.L. **Percutaneous penetration enhancers: an overview.** *Skin Pharmacology and Physiology*, v.20, n.6, p.272-282, 2007.

TISO, R.L; TONG-NGORK, S.; FREDLUND, K.L. **Oral versus topical ibuprofen for chronic knee pain: a prospective randomized pilot study.** *Pain Physician*, v.13, p.457-467, 2010.

USP: UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION. **The United States Pharmacopeia**. 36 ed. Rockville: U.S. Pharmacopeial, 2013.

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

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 copaíba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne – A comparativ estudy.** Journal of Ethnopharmacology, n. 112, p. 248-254, 2007.

YUAN, X.; CAPOMACCHIA, A.C. **The Binary Eutectic of NSAIDs and Two-Phase Liquid System for Enhanced Membrane Permeation.** Pharmaceutical Development and Technology, v.1, p.:1-10, 2005

ZANUSSO-JUNIOR, G.; MELO, J.O.; ROMERO, A.L.; DANTAS, J.A.; CAPARROZ-ASSEF, S.M.; BERSANI-AMADO, C.A.; CUMAN, R.K.R. **Avaliação da atividade anti-inflamatória do coentro (*Coriandrum sativum* L.) em roedores.** Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, v.13, n.1, p.17-23, 2011.

WALTERS, K.A. **Transdermal drug delivery: development issues and researches initiatives,** Nova Iorque: Marcel and Dekker Inc, p.197-246, 1989.

WESTPHAL, F.L.; CANZIAN, M.; PIERI, F.A.; REICHL, A.C.; PÊGO-FERNANDES, P.M.; LIMA, L.C.; VEIGA-JUNIOR, V. **Pleurodesis Induction in Rats by Copaiba (*Copaifera multijuga* Hayne) Oil.** BioMed Research International. v.2014, 8p., 2014.

WILLIAMS, A.C.; BARRY, B.W. **Essential oils as novel human skin penetration enhancers.** International Journal of Pharmaceutics, v.57, 1989.

WILLIAMS A.C.; BARRY, B.W. **Terpenes and the lipid protein partitioning theory of skin penetration enhancement.** Pharmaceutical Research, v.8, n.1, p.17–24, 1991.

WILLIAMS A.C.; BARRY, B.W. **Penetration enhancers.** Advanced Drug Delivery Reviews, v. 64, p. 128-137, 2012.