

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Faculdade de farmácia

Programa de pós-graduação em ciências farmacêuticas

Thaís Magalhães Acácio

**ESTUDO FITOQUÍMICO, CONTROLE DE QUALIDADE E DESENVOLVIMENTO
DE FORMULAÇÃO FITOTERÁPICA DO ÓLEO RESINA DE *Copaifera officinalis*
(COPAÍBA) PARA TERAPIA ADJUVANTE DE PACIENTES ONCOLÓGICOS**

Belo Horizonte

2023

Thaís Magalhães Acácio

**ESTUDO FITOQUÍMICO, CONTROLE DE QUALIDADE E DESENVOLVIMENTO
DE FORMULAÇÃO FITOTERÁPICA DO ÓLEO RESINA DE *Copaifera officinalis*
(COPAÍBA) PARA TERAPIA ADJUVANTE DE PACIENTES ONCOLÓGICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), como requisito parcial para obtenção do grau de Mestra em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof. Dra. Rachel Oliveira Castilho, UFMG.

Coorientadora: Prof. Dra. Gisele Assis Castro Goulart, UFMG.

Belo Horizonte

2023

A168e Acácio, Thaís Magalhães.
Estudo fitoquímico, controle de qualidade e desenvolvimento de formulação fitoterápica do óleo resina de *Copaifera officinalis* (copaíba) para terapia adjuvante de pacientes oncológicos [recurso eletrônico] / Thaís Magalhães Acácio. – 2023.
1 recurso eletrônico (154 f. : il.) : pdf

Orientadora: Rachel Oliveira Castilho.
Coorientadora: Gisele Assis Castro Goulart.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências de Farmacêuticas.

Exigências do sistema: Adobe Acrobat Reader.

1. Óleos vegetais – Teses. 2. Espuma – Teses. 3. Fitoterápicos – Teses. 4. Controle de qualidade – Teses. 5. Copaíba. I. Castilho, Rachel Oliveira. II. Goulart, Gisele Assis Castro. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD: 665.3



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

FOLHA DE APROVAÇÃO

"ESTUDO FITOQUÍMICO, CONTROLE DE QUALIDADE E DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÃO FITOTERÁPICA DO ÓLEO RESINA DE Copaifera officinalis (COPAÍBA) PARA TERAPIA ADJUVANTE DE PACIENTES ONCOLÓGICOS."

THAIS MAGALHÃES ACÁCIO

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, como requisito para obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de concentração CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS.

Dra. Betânia Barros Cota
Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisa René Rachou

Prof. Dr. Lucas Antônio Miranda Ferreira
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Profa. Dra. Rachel Oliveira Castilho - Orientadora
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Profa. Dra. Gisele Assis Castro Goulart - Coorientadora
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Belo Horizonte, 14 de julho de 2023.



Documento assinado eletronicamente por **Gisele Assis Castro Goulart, Professora do Magistério Superior**, em 14/07/2023, às 12:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Lucas Antonio Miranda Ferreira, Professor do Magistério Superior**, em 14/07/2023, às 13:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rachel Oliveira Castilho, Professora do Magistério Superior**, em 14/07/2023, às 15:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Betania Barros Cota, Usuário Externo**, em 21/07/2023, às 09:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2385434** e o código CRC **76A71EC9**.

À aqueles que me apoiam incondicionalmente.
Em especial, a eles:
Rosimar Magalhães e Edimauro Acácio.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sua graça e bondade; por ter dado força e aberto portas quando eu já não via mais soluções; por ser onipresente em todos os momentos.

Aos amores da minha vida, Rosimar Magalhães e Edimauro Acácio por sonharem junto comigo, entenderem minhas ausências, acompanharem de pertinho cada parte desse caminho e serem socorro sempre presente em todas as horas.

As minhas orientadoras Rachel Castilho e Gisele Goulart; por todos os ensinamentos transmitidos, pela paciência e confiança em mim depositada. Prof. Rachel por acreditar em mim mais do que eu mesma, por sua alegria e leveza contagiantes, por tornar tudo simples e fácil de lidar; pela amizade contruída e força nos momentos mais difíceis. À Gisele, por me ensinar que “pra tudo na vida tem um jeito” com seu jeito de ser doce e leve, de coração enorme e generoso sempre disposta. A orientação de vocês nos ensina mais do que desenvolver um projeto de pesquisa, nos ensina a sermos mais humanos.

A minha aluna de iniciação científica, Micaelle Sousa, pela dedicação e esforço para ajudar sempre! Pelo apoio e amizade presente durante todo o desenvolvimento desse trabalho e para além dele.

Aos meus amigos que acompanharam de camarote essa fase da minha vida; Gabriel Viegas por sempre incentivar e se encantar e entusiasmar com cada avanço da pesquisa. A Morgana Melo por todo companheirismo e apoio sempre presente com seu jeito meigo acalmando minhas tempestades. Ao Olavo Mateus e Ísis Vilas Boas meus presentes do laboratório, pelos momentos de apoio, desabafos, choros e alegrias sempre compartilhados.

As minhas amigas, parceiras de labuta diária Daniela Nabak e Mariana Costa por todos os momentos vividos e compartilhados, por estarem sempre presentes, principalmente nos momentos mais difíceis, que não foram poucos! Pelos sonhos e planos compartilhados, pela amizade verdadeira construída no dia-a-dia.

Ao laboratório de Química de Produtos Naturais Bioativos – QPNB do Instituto René Rachou, Fiocruz Minas, por terem me acolhido em todos os momentos de vida (literalmente) e por ter aberto as portas e propiciar a parceria necessária para realização desse projeto. Em especial ao Ezequias Siqueira por toda dedicação e paciência para me ensinar tudo possível sobre cromatografia gasosa acoplada ao espectro de massa (CG-EM). A líder do grupo de pesquisa pela oportunidade de trabalho, aprendizado e aceite de parceria.

Aos colaboradores desse projeto, que foram imprescindíveis para torná-lo realidade; em especial, a professora do controle de qualidade Cristina Vianna por todos os ensinamentos e conhecimentos transmitidos, trocas e incentivo durante o desenvolvimento deste trabalho e para além dele. A mestranda Letícia Moura pela disponibilidade, paciência e gentileza para me transmitir e ensinar os procedimentos da farmacotécnica. A doutoranda Caroline Dohanick, pela disposição e expertise em me ensinar tanto e me ajudar de todas as maneiras possíveis com carinho, atenção e alegria em muitas fases de execução deste trabalho. A técnica Sumáia do laboratório de análises toxicológicas, pela disposição em ajudar, por todo auxílio, compreensão na reta final do projeto e afeto presente num momento difícil, faltam palavras para expressar a gratidão pelo que você fez! A Juliana Amorim por toda ajuda na fase analítica, assim como, no tratamento de dados e análise estatística. Ao Rafael Christian, amigo de bancada de laboratório e de vida, não sei o que seria sem sua ajuda aos 45 do segundo tempo, além de toda ajuda analítica; obrigada!

Aos meus colegas do laboratório GnosiaH, pelo cotidiano compartilhado; em especial Daniela Quadros, Letícia Barbosa, Raquel Aroeira e Rafa; por dividirem essa jornada; pelos eventos compartilhados, perrengues, alegrias, conhecimentos e aprendizados científicos. Gratidão por tudo que partilhamos juntos; com certeza com a companhia de vocês tornou a caminhada mais fácil e alegre.

Ao PPGCF, à Faculdade de Farmácia da UFMG, CNPq, CAPES e FAPEMIG.

À todos(as) gratidão por tudo e tanto!

“ A ciência é mais que um corpo de conhecimento, é uma forma de pensar,
uma forma cética de interrogar o universo,
com pleno conhecimento da falibilidade humana.”

Carl Sagan

RESUMO

As Copaíbas são espécies arbóreas pertencentes à família Fabaceae e ao gênero *Copaifera*, nativas de regiões tropicais. Do tronco das copaibeiras é exsudado um óleo, constituído por uma fração resinosa rica em ácidos diterpênicos diluída em uma fração volátil, rica em sesquiterpenos. Este óleo é utilizado na medicina tradicional por suas propriedades cicatrizante, anti-inflamatória e antimicrobiana, já comprovadas em estudos *in vitro* e *in vivo*. O objetivo do estudo foi realizar a avaliação fitoquímica para caracterização e controle de qualidade físico-químico do óleo resina de *Copaifera officinalis* L. e desenvolver formulação inovadora. No estudo fitoquímico qualitativo identificaram-se no óleo resina 64 substâncias por cromatografia gasosa acoplada ao espectro de massas (CG-EM), sendo as majoritárias os sesquiterpenos copaeno, β -cariofileno, humuleno e os diterpenos kolanelool e ácido hardwickiico. Para análise qualitativa/quantitativa, foi desenvolvido e validado método analítico por CG-EM para quantificação do marcador químico selecionado, β -cariofileno. O método foi validado e demonstrou-se adequado apresentando seletividade, linearidade ($r^2 \geq 0,98$), exatidão (110-125%), precisão (DPR $\leq 5\%$), sendo reprodutível e robusto à pequenas variações das condições analíticas. Em adição, foi desenvolvido método qualitativo de análise do óleo resina de *C. officinalis* por cromatografia em camada delgada. Para o controle de qualidade do óleo realizou-se análises dos parâmetros físico químicos de densidade (1,0170 g/mL) e viscosidade (25,6498cp). A espuma farmacêutica de óleo de copaíba desenvolvida é bifásica e apresentou-se estável, com capacidade de espuma de 1,53; espumabilidade de 53%; boa espalhabilidade sem toque (19 cm²), com pH adequado para aplicação tópica (5,2). O estudo demonstra a autenticidade e pureza do óleo resina de copaíba; traz propostas de métodos de análise qualitativo e quantitativo e parâmetros de qualidade para o desenvolvimento de monografia farmacopeica para a espécie *C. officinalis* e abre perspectiva para comprovação pré-clínica e clínica das atividades farmacológicas do óleo resina de copaíba e da formulação desenvolvida.

Palavras-chave: *Copaifera officinalis*; óleo; β -cariofileno; Método CG-EM; espuma farmacêutica; fitoterápico; flora brasileira.

ABSTRACT

Copaibas are tree species belonging to the Fabaceae family and the genus *Copaifera*, native to tropical regions. An oil exudes from the trunk of copaib trees, consisting of a resinous fraction rich in diterpenic acids diluted in a volatile fraction, rich in sesquiterpenes. This oil is used in traditional medicine for its healing, anti-inflammatory and antimicrobial properties, already proven in in vitro and in vivo studies. The objective of the study was to carry out a phytochemical evaluation for the characterization and physical-chemical quality control of the resin oil of *Copaifera officinalis* L. and to develop an innovative formulation. In the qualitative phytochemical study, 64 substances were identified in the resin oil by gas chromatography coupled to the mass spectrum (GC-MS), the majority being the sesquiterpenes copaene, β -caryophyllene, humulene and the diterpenes kolanelool and hardwickiic acid. For qualitative/quantitative analysis, an analytical method by GC-MS was developed and validated to quantify the selected chemical marker, β -caryophyllene. The method was validated and proved adequate, showing selectivity, linearity ($r^2 \geq 0.98$), accuracy (110-125%), precision (DPR $\leq 5\%$), being reproducible and robust to small variations in analytical conditions. In addition, a qualitative method of analysis of *C. officinalis* resin oil by thin layer chromatography was developed. For the quality control of the oil, analyzes of the physical chemical parameters of density (1.0170 g/mL) and viscosity (25.6498cp) were carried out. The developed pharmaceutical foam of copaiba oil is biphasic and stable, with a foaming capacity of 1.53; 53% foamability; good spreadability without touch (19 cm²), with pH suitable for topical application (5.2). The study demonstrates the authenticity and purity of copaiba resin oil; proposes qualitative and quantitative analysis methods and quality parameters for the development of a pharmacopoeial monograph for the species *C. officinalis* and opens up perspectives for preclinical and clinical confirmation of the pharmacological activities of copaiba resin oil and the developed formulation.

Keywords: *Copaifera officinalis*; oil, β -caryophyllene; GC-MS Method; pharmaceutical foam, herbal medicine; Brazilian flora.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Regiões onde encontra-se espécies do gênero <i>Copaifera</i> sp.....	24
Figura 2 - Extração do óleo resina de <i>Copaifera</i> spp.....	25
Figura 3 - Árvore <i>Copaifera</i> spp.....	26
Figura 4 - Características botânicas das espécies de <i>Copaifera</i> spp.	27
Figura 5 - <i>Copaifera officinalis</i> L.....	28
Figura 6 - Coloração e turbidez do óleo resina de <i>Copaifera</i> sp.....	29
Figura 7 - Cromatograma do óleo de <i>Copaifera</i> sp. por cromatografia gasosa de alta resolução (CGAR).....	32
Figura 8 - Estrutura da espuma medicamentosa	41
Figura 9 - Viscosímetro de Ostwald.....	54
Figura 10 - Esquema dos resultados do teste de identificação do óleo resina de <i>C. officinalis</i> L.....	57
Figura 11 - Fluxograma do processo de produção da espuma de óleo resina de copaíba.....	80
Figura 12 - Determinação do tempo de expansão da espuma.....	83
Figura 13 - Demonstração do método de espalhabilidade.....	84
Figura 14 - Cromatograma do óleo resina de <i>C. officinalis</i> L. e SQR padrão β -cariofileno obtido por CCD de gel de sílica método item 4.5.1.....	93
Figura 15 – Cromatogramas do óleo resina de <i>C. officinalis</i> e SQR β -cariofileno obtido por CCD de gel de sílica.	94
Figura 16 - Cromatograma do óleo resina de <i>C. officinalis</i> L. obtido por CG-EM, condições cromatográficas item 4.5.2.....	95
Figura 17 - Ampliação do cromatograma do óleo resina de <i>C. officinalis</i> , obtido por CG-EM, com os constituintes majoritários. Método cromatográfico item 4.5.2.....	100
Figura 18 - Cromatograma do óleo essencial de copaíba obtido por CG-EM; condições cromatográficas conforme 4.5.2.....	101
Figura 19 - Cromatograma obtido do óleo resina de <i>C. officinalis</i> L por CG-EM conforme condições cromatográficas A (4.6.2).....	104
Figura 20 - Cromatograma do óleo resina de <i>C. officinalis</i> L. obtido por CG-EM conforme condições cromatográficas B (4.6.2).....	105
Figura 21 - Cromatograma do óleo resina de <i>C. officinalis</i> L. obtido por CG-EM conforme condições cromatográficas C (4.6.2).....	106

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 22 - Cromatograma do óleo resina de <i>C. officinalis</i> L. obtido por CG-EM na condição cromatográfica C, definida como método.....	107
Figura 23 - Cromatograma do β -cariofileno obtido por CG-EM na condição cromatográfica C, definida como método.....	107
Figura 24 - Espectro de massa do β -cariofileno, comparação amostra e banco de dados da biblioteca NIST.....	108
Figura 25 – Curva de calibração da solução padrão SQR β -cariofileno para método de análise do óleo resina de <i>Copaifera officinalis</i>	112
Figura 26 – Gráfico de resíduos obtidos na avaliação da linearidade dae SQR β -cariofileno no para o óleo resina de <i>Copaifera officinalis</i>	112
Figura 27 - Cromatograma do solvente hexano utilizado para solubilização das amostras, obtido por CG-EM, conforme condições cromatográficas do método desenvolvido (item 4.6).....	114
Figura 28 - Cromatogramas das soluções amostra, do óleo resina de <i>C. officinalis</i> L., SQR de β -cariofileno obtido por CG-EM, conforme condições cromatográficas item 4.6.2.....	114
Figura 29 - Curvas analíticas para avaliação do efeito matriz no método analítico desenvolvido para quantificação de β -cariofileno no óleo resina de <i>Copaifera officinalis</i>	115
Figura 30 - Cromatograma do óleo resina de <i>C. officinalis</i> L. por CG-EM, conforme condições cromatográficas do método desenvolvido, item 4.6	116
Figura 31 - Dados experimentais de viscosidade das espumas medicamentosas desenvolvidas.....	132
Figura 32 - Aspecto macroscópico da formulação espuma de óleo de copaíba ao longo de 30 minutos.....	135
Figura 33 - Espuma sem propelente.....	135
Figura 34 - Imagens microscópicas da formulação espuma de óleo de copaíba....	137
Figura 35 - Imagens microscópicas da formulação espuma líquida.....	138
Figura 36 - Cromatograma do óleo resina de <i>C. officinalis</i> L. extraído da espuma medicamentosa.....	139

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Diterpenos detectados no óleo resina das espécies de <i>Copaifera</i> sp.....	31
Tabela 2 – Sesquiterpenos detectados no óleo resina das espécies de <i>Copaifera</i> sp.....	33
Tabela 3 – Atividades farmacológicas do óleo resina das espécies de <i>Copaifera</i> sp. que possuem estudos científicos.....	38
Tabela 4 – Formulações contendo óleo resina de copaíba descritas na literatura.....	39
Tabela 5 – Exemplos de constituintes de espumas	42
Tabela 6 – Espumas medicamentosas disponíveis no mercado, seus princípios ativos, concentração e indicação	47
Tabela 7 – Diluições testadas para desenvolvimento de método qualitativo por CCD.....	55
Tabela 8 – Fases móveis avaliadas para desenvolvimento de método qualitativo por cromatografia em camada delgada (CCD) para o óleo resina de <i>C. officinalis</i> e da SQR β -cariofileno.....	56
Tabela 9 – Condições cromatográficas de método preliminar por CG-EM para análise qualitativa do óleo resina de amostras de <i>Copaifera</i> sp.....	58
Tabela 10 – Condições cromatográficas A, B, C e D do método analítico por CG-EM desenvolvido para quantificação do β -cariofileno no óleo resina de <i>Copaifera officinalis</i>	61
Tabela 11 – Faixa e concentração de trabalho estabelecida para o método analítico de quantificação de β -cariofileno no óleo resina de <i>Copaifera officinalis</i>	65
Tabela 12 – Preparo das soluções de SQR β -cariofileno conforme faixa de concentração de trabalho de <i>Copaifera officinalis</i>	67
Tabela 13 – Preparo da solução amostra de óleo resina de <i>C. officinalis</i> fortificada com SQR conforme intervalo de linearidade, 60-140%.....	68
Tabela 14 - Variações do método cromatográfico por CG-EM realizadas para estudo da robustez no método analítico de solução do óleo resina de <i>Copaifera officinalis</i>	74
Tabela 15 – Especificações e codificação dos excipientes selecionados para avaliação da solubilidade do óleo resina de <i>Copaifera officinalis</i> L.....	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 16 – Especificação e codificação dos excipientes selecionados para composição da formulação espuma de óleo resina de <i>Copaifera officinalis</i>	77
Tabela 17 – Composição (%p/p) das formulações de espuma (F1 a F15) com óleo resina de <i>Copaifera officinalis</i> L.....	79
Tabela 18 – Densidade relativa do óleo resina de <i>C. officinalis</i> L. dados obtidos pelo método do picnômetro.....	89
Tabela 19 – Viscosidade do óleo resina de <i>C. officinalis</i> L. obtidos experimentalmente por viscosímetro de Oswald.....	91
Tabela 20 – Substâncias identificadas no óleo resina de <i>C. officinalis</i> L por CG-EM, conforme método item 4.5.2.....	97
Tabela 21 – Média e desvio padrão relativo do β -cariofileno, componente majoritário do óleo resina de <i>C. officinalis</i> L. e padrão β -cariofileno obtidos por análise em CG-EM pelo método da condição cromatográfica C.....	107
Tabela 22 – Parâmetros de adequabilidade do sistema cromatográfico na validação de método analítico para o óleo resina de <i>Copaifera officinalis</i> do marcador químico β -cariofileno por CG-EM.....	110
Tabela 23 – Intervalo definido para quantificação de β -cariofileno em óleo resina de <i>C. officinalis</i> L.....	111
Tabela 24 – Dados da curva de calibração da quantificação de β -cariofileno em óleo resina de <i>Copaifera officinalis</i>	112
Tabela 25 – Análise da homocedasticidade dos dados da curva analítica para avaliação da linearidade do método analítico desenvolvido para quantificação do β -cariofileno no óleo resina de <i>Copaifera officinalis</i>	113
Tabela 26 – Avaliação do efeito matriz, demonstrando a inclinação e os coeficientes da curva analítica do marcador químico SQR β -cariofileno e OR de <i>C. officinalis</i> + β -cariofileno.....	116
Tabela 27 - Estimativa dos limites de detecção e quantificação de método analítico para quantificação de β -cariofileno em óleo resina de <i>C. officinalis</i> L.....	117
Tabela 28 – Resultados obtidos no teste de exatidão para quantificação de β -cariofileno em óleo resina de <i>Copaifera officinalis</i>	118

LISTA DE TABELAS

Tabela 29 - Resultados obtidos no teste de repetibilidade (n=6) e precisão intermediária (n=12) para quantificação de β -cariofileno em óleo resina de <i>C. officinalis</i>	119
Tabela 30 - Avaliação da capacidade de formação de espuma e estabilidade utilizando o método do cilindro.....	127
Tabela 31 – Expansão da espuma (EE) das formulações.....	129
Tabela 32 – Estabilidade do líquido da espuma (ELE) das formulações desenvolvidas.....	130
Tabela 33 – Estabilidade do volume da espuma (EVE) das formulações desenvolvidas.....	131
Tabela 34 - Tempo de expansão da espuma.....	131
Tabela 35 – Valores de pH das triplicatas da formulação desenvolvida.....	133

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

CCD - Cromatografia em camada delgada

CG-EM - Cromatografia gasosa acoplada ao espectro de massas

NIST - National Institute of Standards and Technology

RENISUS - Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS

TR - Tempo de retenção

R_f - fatores de retenção

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1** – Critérios dos parâmetros de validação analítica do método de CG-EM para quantificação do marcador químico β -cariofileno no óleo resina de *C. officinalis*.....**63**
- Quadro 2** – Dados obtidos nas análises da solução da SQR β -cariofileno condição inicial^a vs condições alteradas^b.....**120**
- Quadro 3** – Dados obtidos nas análises da amostra de *C. officinalis* condição inicial^a vs condições alteradas^b.....**121**

LISTA DE ESTRUTURAS QUÍMICAS

1	Caurano.....	30
2	Clerodano.....	30
3	Labdano.....	30
4	Ácido caurenóico	31
5	Ácido poliáltico.....	31
6	Ácido copálico.....	31
7	Ácido colavênico.....	31
8	Copaeno.....	96
9	β -cariofileno.....	96
10	humuleno.....	96
11	Colavenol.....	99
12	Ácido hardwíckiico.....	99

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
2	REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1	Câncer e tratamento.....	22
2.2	O gênero <i>Copaifera</i> sp. (copaíba).....	23
2.3	A espécie <i>Copaifera officinalis</i> L.	27
2.4	O óleo resina de Copaíba.....	29
2.5	Uso popular e atividades farmacológicas do óleo resina das espécies de <i>Copaifera</i> sp. (copaíba)	33
2.6	Formulações contendo óleo resina de copaíba.....	38
2.7	Espumas medicamentosas	39
3	OBJETIVOS.....	49
3.1	Objetivo geral	49
3.2	Objetivos específicos	49
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	50
4.1	Equipamentos e instrumentos.....	50
4.2	Materiais de consumo	50
4.3	Material Vegetal	52
4.4	Controle de qualidade: análises físico-químicas do óleo resina de <i>Copaifera officinalis</i> L.	52
4.5	Perfil químico e desenvolvimento de método para caracterização química da espécie <i>Copaifera officinalis</i> L.	54
4.6	Desenvolvimento de método analítico para quantificação de marcador químico no óleo resina de <i>Copaifera officinalis</i> L.....	59

4.7	Validação do método analítico para quantificação de β -Cariofileno no óleo resina de <i>Copaifera officinalis</i>	62
4.8	Desenvolvimento de formulação farmacêutica de óleo resina de <i>Copaifera officinalis</i>	75
4.9	Caracterização das propriedades da espuma de óleo resina de <i>Copaifera officinalis</i>	81
4.10	Identificação do óleo resina de <i>Copaifera officinalis</i> veiculado na espuma medicamentosa.....	86
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	88
5.1	Controle de Qualidade: características organolépticas	88
5.2	Caracterização físico-químicas do óleo resina de <i>Copaifera officinalis</i> L.....	88
5.3	Perfil químico e caracterização do óleo resina de <i>Copaifera officinalis</i>	92
5.4	Desenvolvimento de método analítico por CG-EM para quantificação de marcador químico no óleo resina de <i>Copaifera officinalis</i> L.	102
5.5	Validação do método analítico por CG-EM para quantificação do marcador químico β -cariofileno no óleo resina de <i>Copaifera officinalis</i> L.....	109
5.6	Quantificação do marcador químico β -cariofileno no óleo resina de <i>Copaifera officinalis</i> L. por CG-EM.....	122
5.7	Desenvolvimento de formulação farmacêutica de óleo resina de <i>Copaifera officinalis</i>	123
5.8	Caracterização da espuma medicamentosa de óleo resina de <i>Copaifera officinalis</i> desenvolvida.....	126
5.9	Identificação do óleo resina de <i>Copaifera officinalis</i> veiculado na espuma farmacêutica	138
6	RESUMO DOS RESULTADOS.....	140
7	CONCLUSÕES	143
	REFERÊNCIAS	144

1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais para obtenção de efeitos farmacológicos é realizado por parte da população e diversos grupos étnicos desde a antiguidade. A utilização e observação da eficácia das plantas na medicina tradicional contribui de forma expressiva para o conhecimento das atividades terapêuticas das espécies vegetais. Além de, contribuir para o conhecimento sobre as espécies vegetais, evidencia a ação farmacológica, guia e estimula a realização de estudos científicos sobre o uso e comprovação da eficácia, bem como amplia o conhecimento sobre os mecanismos celulares e moleculares de sua ação, e portanto do nosso próprio corpo e metabolismo. Sendo, portanto, uma fonte promissora de princípios ativos, que podem ser utilizados na prevenção e/ou tratamento de diversas doenças e estados (Brandão et al., 2006; Brandão et al., 2010; Acácio, 2020).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) reconhece o potencial das plantas medicinais; e recomenda o uso como medicamentos tradicionais, desde que haja validação científica, que comprove o efeito farmacológico com ausência de toxicidade. A validação é realizada por meio dos estudos botânicos, químicos, farmacológicos e toxicológicos (Brandão, 2010; WHO, 2017).

O Brasil é um dos países com maior biodiversidade do mundo, possui uma flora rica e diversa em espécies vegetais; no entanto o número de plantas cuja a ação terapêutica é cientificamente comprovada é baixo. Assim, estudos com espécies brasileiras constituem uma perspectiva importante para a descoberta de produtos naturais potencialmente farmacológicos, além de contribuir para racionalização do uso popular das plantas medicinais no Brasil (Maciel et al., 2002; Castilho e Braga, 2011; Mukherjef et al. 2017).

Dentre a vasta biodiversidade brasileira, as espécies de *Copaifera* sp., que são nativas, se destacam por produzir um óleo resina exsudado de seu tronco que é utilizado desde a antiguidade pelos indígenas, devido seus efeitos cicatrizante, anti-inflamatório e antimicrobiano; que também são relatados na literatura. O gênero faz parte da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS) e

estava descrito na 1ª edição do Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira, na forma farmacêutica de pomada contendo 10% do óleo resina de espécies de *Copaifera* spp., indicado como anti-inflamatório, antisséptico e cicatrizante (Correa, 1931; Veiga Junior et al., 2002; Brasil, 2011; ANVISA, 2021; Brasil, 2022).

As copaibeiras produzem quantidade variável do óleo-resina, que é constituído quimicamente por uma fração resinosa composta por ácidos diterpênicos diluída na fração essencial constituída dos componentes voláteis, sesquiterpenos. Estes componentes do óleo são responsáveis pelos efeitos farmacológicos e são variáveis inter e intra espécies. Diante disso, é de suma importância a caracterização química e o desenvolvimento e validação de métodos qualitativos e quantitativos, assim como, o controle de qualidade deste óleo resina; para utilização como matéria prima de fitoterápico. Além disso, as propriedades farmacológicas evidenciadas na tradicionalidade e em bioensaios *in vitro* e *in vivo*; o óleo resina de copaíba apresenta-se como um fonte promissora para o desenvolvimento de formulações farmacêuticas para o tratamento de diversas afecções (Veiga Junior et al., 2002; Rigamonte et al., 2004; Pieri et al., 2009; Acácio, 2020).

O óleo resina de copaíba é muito utilizado na medicina tradicional desde o século XVI e há estudos pré-clínicos comprovando cientificamente suas propriedades farmacológicas como: cicatrizante, anti-inflamatório, analgésico, antimicrobiano, antisséptico, anticarcinogênico, expectorante e diurético. Sendo, portanto, utilizado para diversos tipos de infecções, desde infecções no trato respiratório, como inflamações de garganta, doenças respiratórias a infecções nas vias urinárias e pele (Veiga jr., et al., 2001; Trindade, et al., 2018; Arruda, et al., 2019).

Atualmente, o câncer é um dos principais problemas de saúde pública no mundo, com alta incidência e mortalidade. O Instituto Nacional do Câncer (INCA) estima que a incidência do câncer no Brasil, para o triênio 2023-2025 é de 704 mil novos casos da doença. Os três principais tratamentos indicados, como terapia primária da doença; são a quimioterapia, radioterapia ou procedimentos cirúrgicos; que são muito agressivas e podem provocar diversas reações adversas. Assim, faz-se necessário

terapias adjuvantes para proporcionar melhor qualidade de vida ao paciente (INCA, 2018; ESTIMATIVA, 2023).

Dentre as reações adversas decorrentes do tratamento indicado para o câncer estão as reações na pele, provocadas pela radioterapia; na qual a pele irradiada torna-se seca, escamosa e pode apresentar feridas leves a severas. Além disso, 5 a 10% dos pacientes oncológicos são acometidos por feridas tumorais, em algum momento de evolução da doença; essas lesões podem ser em decorrência do tumor primário ou metástase (INCA,2009; De Azevedo, et al., 2014; INCA, 2018; INCA,2022).

Diante do exposto, o óleo resina de copaíba, assim como, o desenvolvimento de formulações a base deste óleo; devido suas propriedades terapêuticas, como cicatrizante, anti-inflamatório e antimicrobiano; pode ser um potente aliado na cicatrização de feridas e no tratamento adjuvante de pacientes oncológicos, proporcionando o alívio das reações adversas, como as lesões na pele. Entretanto, atualmente não há no mercado nenhuma formulação contendo somente o óleo resina de copaíba, que é comercializado esmente em sua forma bruta ou misturas com outros óleos. Assim, a caracterização, o controle de qualidade, desenvolvimento de métodos de caracterização e analíticos para análises qualitativas e quantitativas do óleo resina de copaíba garante sua autenticidade e utilização para produção de fitoterápico seguro e eficaz. Além disso, o desenvolvimento de formulações inovadoras, como as espumas medicamentosas, favorece o tratamento das lesões de pele que podem acometer pacientes com pele mais sensível, dentre eles os oncológicos. Por apresentarem fácil aplicação, sem necessidade de toque ou dispositivos auxiliares; propiciando contato mais suave com a pele lesionada.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Câncer e tratamento

O câncer, também conhecido como neoplasia é o nome genérico dado há um grupo de mais de 100 doenças; caracterizadas pelo crescimento e proliferação celular desordenada; que tendem adentrar tecidos e órgãos vizinhos acometendo outras células normais (INCA, 2012.; INCA, 2022). Atualmente, é o principal problema de saúde pública no mundo, sendo uma das principais causas de morte. O INCA estima a ocorrência de 704 mil novos casos da doença no Brasil no triênio 2023 – 2025; sendo o mais incidente o tumor maligno de pele não melanoma (31,3% dos casos), seguido por; mama feminina (10,5%), próstata (10,2%), cólon e reto (6,5%), pulmão (4,6%) e estômago (3,1%) (ESTIMATIVA, 2023).

O tratamento do câncer depende do tipo e estágio do tumor, localização e estado de saúde geral do paciente. A detecção precoce, assim como, o diagnóstico rápido e preciso aumentam a possibilidade de cura e reduzem a morbidade resultante da doença, tratamento e possíveis complicações. O tratamento do câncer visa a cura, prolongar a vida útil do paciente acometido e propiciar melhor qualidade de vida. Os três principais tratamentos são: a quimioterapia, radioterapia e cirurgia; que podem ser aplicadas em conjunto, a depender da resposta obtida pelo tratamento aplicado e à suscetibilidade do tumor (INCA, 2012; Instituto Oncoguia, 2018; INCA, 2022).

Assim como diversas farmacoterapias, o tratamento pode ocasionar efeitos colaterais. A quimioterapia pode provocar reações adversas que incluem queda de cabelo; prisão de ventre; diarreia; feridas na mucosa bucal, estomacal e intestinal; enjoos e vômitos; hiperpigmentação; anemia, leucopenia e trombocitopenia. A radioterapia também pode ocasionar efeitos colaterais, que podem ocorrer de acordo com o local a ser irradiado. No entanto, independentemente deste fator esse tratamento provoca reações na pele, que pode ficar ressecada, escurecida e/ou avermelhada, e/ou com feridas (INCA, 2009; INCA, 2022).

Adicionalmente, 5 a 10% dos pacientes portadores de câncer podem ser acometidos por lesões oncológicas em algum momento da evolução da doença; as lesões podem ser decorrentes do tumor primário (câncer de pele) ou metástase. As feridas tumorais ocorrem a partir da infiltração das células malignas do tumor no tecido epitelial, o que provoca ruptura da integridade tegumentar, ocasionando a formação de ferida evolutivamente exofítica; decorrente da proliferação celular desordenada, provocada pelo processo de oncogênese. O processo de crescimento anormal e desordenado, ocasiona a formação de agregados de massa tumoral necrótica, que podem se contaminar por micro-organismos que geram metabólitos como ácidos graxos voláteis e substâncias gasosas como a putrescina e cadaverina gerando odor fétido às feridas tumorais. Essas feridas podem ser classificadas de acordo com o aspecto e extensão da estrutura acometida, geralmente são de difícil cicatrização, apresentando um mal prognóstico. Diante disso, torna-se relevante a utilização de terapias adjuvantes, paliativas visando alívio dos sintomas, redução das complicações e melhor qualidade de vida ao paciente (INCA,2009; Azevedo, et al., 2014).

Segundo a OMS, "cuidados paliativos consistem na assistência promovida por uma equipe multidisciplinar, que objetiva a melhoria da qualidade de vida do paciente e seus familiares, diante de uma doença que ameace a vida, por meio da prevenção e alívio do sofrimento, da identificação precoce, avaliação impecável e tratamento de dor e demais sintomas físicos, sociais, psicológicos e espirituais". Assim, os cuidados de saúde ao paciente oncológico devem ser ativos, integrais, dinâmicos; sendo associados os cuidados paliativos à terapia primária para auxílio do manejo dos sintomas de difícil controle e melhora das condições clínicas. Nesse contexto, as terapias complementares e alternativas, como a fitoterapia torna-se uma opção eficaz como tratamento complementar para alívio de sinais e sintomas no tratamento das reações adversas decorrentes do tratamento primário do câncer (BRASIL, 2015; WHO, 2018; INCA, 2022).

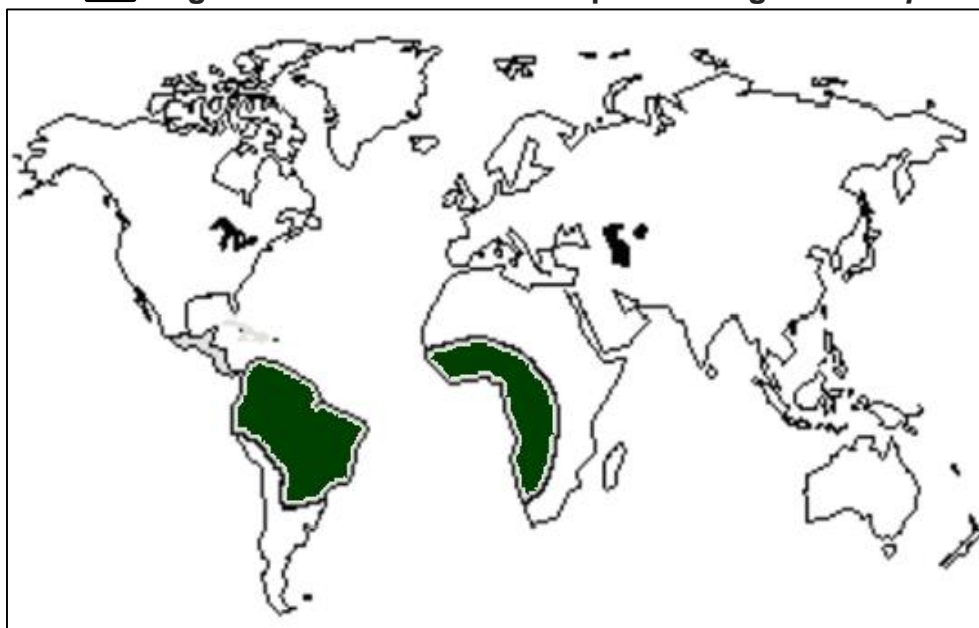
2.2 O gênero *Copaifera*

As copaibeiras são espécies arbóreas pertencentes ao gênero ao gênero *Copaifera* L., família Fabaceae e subfamília Caesalpinoideae. Segundo a base de dados *The plant list* existem 106 espécies registradas como copaiba, sendo essas classificadas

como “nome aceito”, “sinônimo”, “nome mal resolvido” e “nomes mal aplicados”; de acordo com essa classificação há 49 nomes aceitos, 49 são sinônimos, dois mal aplicados e seis não resolvidos (DA TRINDADE et al, 2018; ARRUDA, Caroline et al, 2019; LIST, Plant., 2023).

As copaíbas são espécies nativas da região tropical da América Latina e da África Ocidental; sendo o Brasil o maior representante da biodiversidade do gênero *Copaifera*, com cerca de 25 espécies distribuídas nos diversos domínios fitogeográficos que incluem a Amazônia, Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica, e geograficamente do Norte ao Sul do país (VEIGA JUNIOR et al., 2002; PIERI et al., 2009; DA TRINDADE et al, 2018; COSTA, J.A.S., 2020).

Figura 1 - ■ Regiões onde encontra-se espécies do gênero *Copaifera* sp.



Fonte : Junior, V. F. V.; Pinto, A. C. (2002).

São espécies de grande porte que podem se apresentar como árvores ou arbustos, raramente subarbusto; podendo atingir até 40 metros de altura e 4 metros de diâmetro. O nome copaíba é de origem tupi, dialeto da etnia indígena guarani, que significa “árvore de depósito”, fazendo alusão ao óleo resina presente no interior dessas árvores; fazendo com que essas sejam popularmente conhecidas como ‘pau d’óleo’. As diversas espécies de *Copaifera* produzem este óleo-resina, também conhecido como bálsamo de copaíba, em quantidades variáveis, além disso, suas características

físico-químicas e coloração podem se diversificar entre espécies. O óleo resina de copaíba é exsudado do tronco das árvores – Figura 2; devido à presença de canais secretores verticais interconectados possibilitando a drenagem deste óleo, que é constituído de uma fração resinosa composta por diterpenos diluída em uma fração volátil composta de sesquiterpenos (Veiga junior et al., 2002; Martins-da-silva et al., 2008; Pieri et al., 2009; Da Trindade et al, 2018; Acácio, T.M. 2020).

Figura 2 – Extração do óleo resina de *Copaifera* spp.

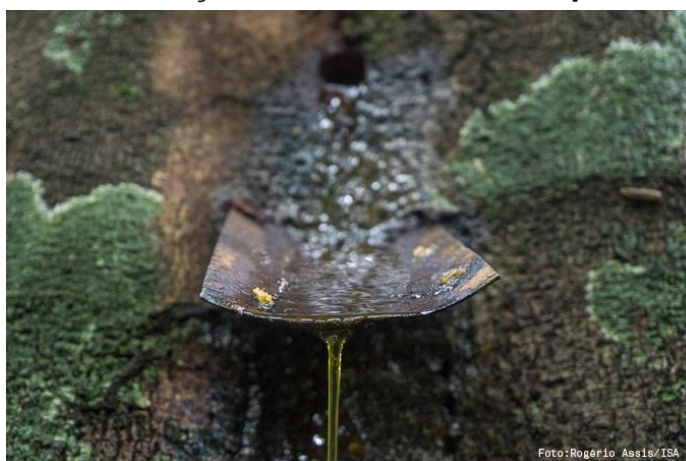


Foto: Rogério Assis/ISA

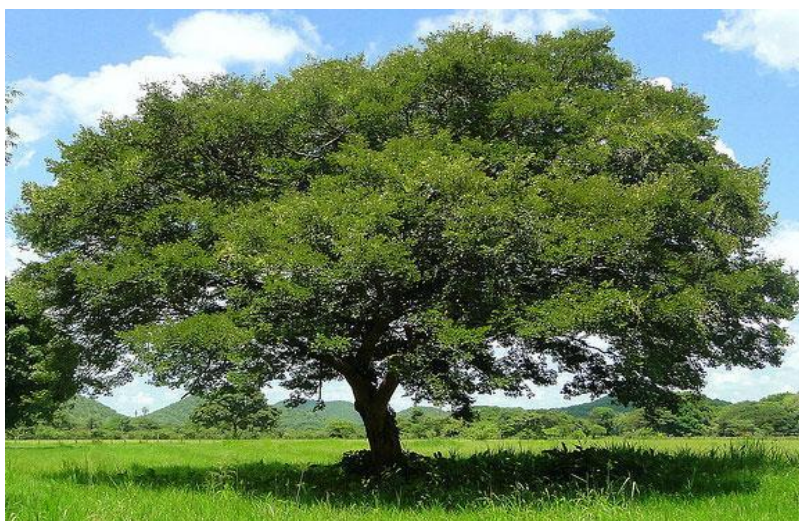
O óleo-resina das copaibeiras é utilizado na medicina tradicional desde a antiguidade pelos indígenas e seu uso foi difundido desde a chegada dos colonizadores no país. Sendo as espécies de *Copaifera* uma das primeiras a serem descritas pelos cronistas portugueses; suas propriedades medicinais são relatadas desde o século XVI; sendo mais comumente utilizado como cicatrizante; anti-inflamatório e analgésico (Correa, 1931; Veiga Junior et al., 2002).

Atualmente, o gênero *Copaifera* faz parte da lista RENISUS, que apresenta cerca de 71 espécies com potencial terapêutico de interesse para o SUS e foi retirada da atual edição do Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira, sendo descrita na 1ª edição na forma farmacêutica de pomada contendo 10% do óleo resina de espécies de *Copaifera* spp., cuja indicação é como agente anti-inflamatório, antisséptico e cicatrizante (Brasil, 2022; ANVISA, 2021; Brasil, 2011).

2.2.1 Características botânicas das espécies de *Copaifera*

As espécies de *Copaifera* são árvores de crescimento lento e podem ter até 40 metros de altura. São de grande porte, apresentam tronco cilíndrico, tortuoso com até 4 metros de diâmetro; recoberto por uma casca escura rugosa (Veiga Junior et al., 2002; Rosa, et al. 2009; ARRUDA, Caroline et al., 2019).

Figura 3 – Árvore *Copaifera* spp.



Fonte: Blog Celeiro (2010). Disponível em: http://lojaorganicuspn.blogspot.com/2010/05/copaiba-copaifera-officinalis-l_05.html. Acesso em 20 de Junho de 2023.

As copaibeiras possuem copa composta por uma folhagem densa de folhas grossas, pecioladas, mutuamente alternadas. Flores brancas, pequenas, dispostas em penículos. Os frutos são avermelhados, em forma de vagem e pode ter até 25mm de comprimento e se ligam às árvores por meio de hastes de sustentação. A floração e frutificação ocorrem somente a partir dos 5 anos de idade das árvores. A Figura 4 apresenta suas características botânicas. (Veiga Junior et al., 2002; Pieri et al., 2009; Rosa et al., 2009; Leite et al., 2020).

Figura 4 - Características botânicas das espécies de *Copaifera* spp. a) tronco cilíndrico, com casca escura rugosa; b) folhas alternadas, pecioladas, coriáceas; c) flores brancas, dispostas em penículos axiliares; d) fruto da *Copaifera* sp.



Fonte : a, b e c : Leite, P. M., Castilho, R. O. d) Foto: M. Kuhlmann disponível em: <http://amazoniaversusnaturais.blogspot.com/>.

2.3 A espécie *Copaifera officinalis* L.

A espécie *Copaifera officinalis* foi a primeira copaibeira descrita em 1762; como espécie do gênero *Copaifera*. A *C. officinalis* é nativa do norte da América do Sul; tendo preferência por habitats de florestas tropicais, mas também, se desenvolve em florestas úmidas e secas; sendo abundante nas regiões norte do Amazonas, Roraima; e em países como Colômbia, Venezuela e El Salvador (Dwyer, 1951 ; VEIGA JUNIOR, Valdir F. et al.,2007; Pieri et al., 2009 ; Joyce et al., 2012 ; ILDIS, 2014).

É uma das espécies que possui maior valor financeiro devido produzir maiores

quantidades do óleo resina e rico em β -cariofileno; podendo apresentar até 87% desse constituinte. Além disso, é uma das espécie que produz maior quantidade de óleo resina (Da Trindade, Da Silva, Setzer, 2018; Da Trindade; Da Silva; Setzer, 2020).

Figura 5 - *Copaifera officinalis* L.



Fonte: Sana terapêuticos (2020).

Disponível em: <https://www.instagram.com/p/CCjTcX8Jkmq/> Acesso em 20 de Junho de 2023.

A fração resinosa do óleo da espécie *C. officinalis* é constituída dos diterpenos: Ácido caurenóico, ácido eperúico, ácido catívico, ácido copálico, ácido 3 β -hidroxi-copálico, ácido *ent*-agático, ácido hardwickiico, ácido (13E)-*ent*-Labda-713-dien-15-óico, ácido pinifólico. A fração essencial, possui os sesquiterpenos: óxido de cariofileno, cedrol, cadaleno, β -bisabolol, α -bubebeno, α -copaeno, β -cubebeno, β - cariofileno, α -bergamoteno, aromadendreno, α -humuleno, germacreno D, germacreno B, β -bisaboleno, δ -cadineno , α -cadieno, α -seleno, alloaromandredeno, zingibereno, α -muuroleno, β -seleno, β -elemeno, γ -muuroleno, γ -cadieno, β -farneceno, α -bisaboleno, α -guaiano, α -muurolol, δ -elemeno, cipereno, β -guaiano, α -himachaleno, α -ylanglano, β -copaeno, calameneno, δ -guaiano (Da Trindade, Da Silva, Setzer, 2018; Arruda, Caroline et al., 2019; Acácio, T.M. 2020;).

A literatura apresenta bioensaios com o óleo resina proveniente do *C. Officinalis* com resultados positivos para as seguintes atividades farmacológicas: anti-inflamatório, antileishmania; contra *L. amazonensis* promastigotas, antibacteriano, contra *Staphylococcus aureus*, *S. aureus Resistente à Meticilina* (MRSA), *Bacillus subtilis*, *S. epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mutans* (Dos Santos, A.O., et al., 2008; Da Trindade, Da Silva, Setzer, 2018; Lima, et al., 2021).

2.4 Óleo resina de *Copaifera* sp. (copaíba)

O óleo resina das copaibeiras, como indicado por sua própria terminologia é constituído por uma fração resinosa composta por ácidos diterpênicos; diluída na fração essencial, composta por sesquiterpenos voláteis. Este óleo é produzido pelas espécies em quantidades variáveis; e se dispõe nas árvores em canais secretores presentes na região cortical dos caules. Estes canais são dispersos por todo o tronco e não se comunicam. O óleo é obtido por meio de perfurações no tronco das árvores até o centro, para atingir o caule (Correa, 1931; Acácio, 2020).

O óleo resina pode ser qualificado quanto as suas propriedades físico-químicas: viscosidade, densidade relativa, índice de refração e por suas características organolépticas, como coloração e turbidez; que variam inter e intra espécies. Apresentando-se líquido, variando de transparente a opaco; de baixa a alta viscosidade, apresentando geralmente média viscosidade; além disso, há relação deste parâmetro com a turbidez do óleo; no qual os óleos de baixa viscosidade tendem a serem mais límpidos (translúcidos), enquanto aqueles que são opacos possuem alta viscosidade. Quanto à coloração apresentam cor variável do amarelo-pálido ao castanho-claro dourado. A densidade relativa varia entre 0,84 e 1,18g/mL, sendo encontrados na literatura os valores de 0,94g/mL, 0,98g/mL e 0,99g/mL. E apresenta índice de refração de cerca de $1,50 n^{20}_D$ que é maior que o índice da água, $1,33n^{20}_D$, indicando que este propicia maior desvio da velocidade da luz (Rigamonte et al., 2004; Pieri et al., 2009; Silva et al., 2012; Acácio, T.M., 2020). A Figura 6 demonstra algumas dessas características do óleo resina de copaiba, assim como, a variabilidade das mesmas.

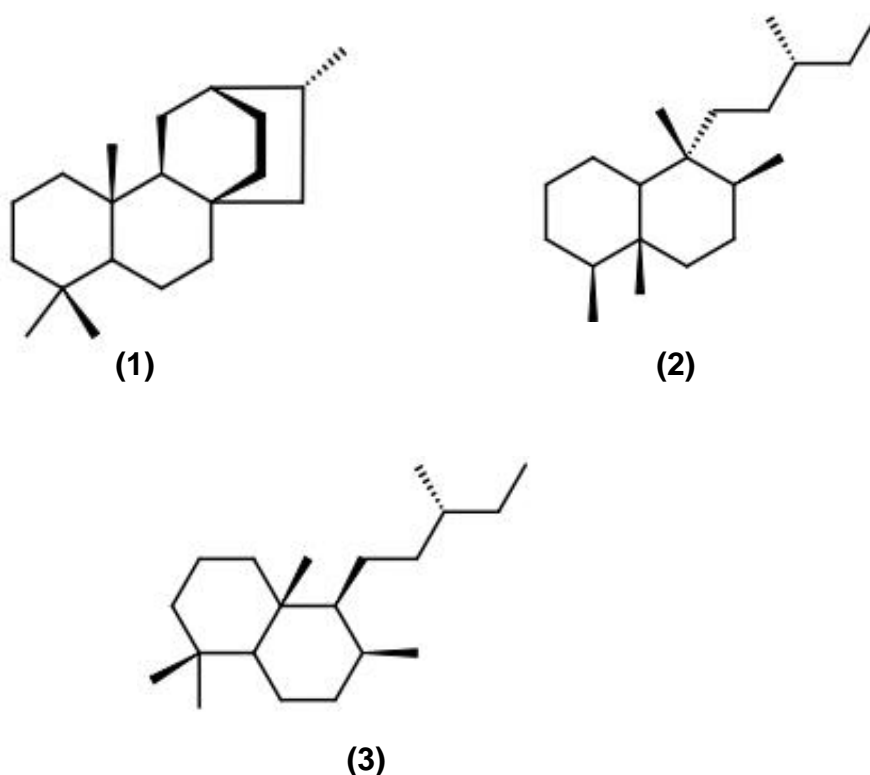
Figura 6 – Coloração e turbidez do óleo resina de *Copaifera* sp.



Fonte: Rigamonte et al., (2004).

2.4.1 Composição química do óleo resina de *Copaifera* sp. (copaíba)

A fração resinosa do óleo apresenta-se como um sólido vítreo, insolúvel em água, untoso, inodora, não volátil constituída por ácidos diterpênicos. Estes diterpenos possuem esqueletos estruturais característicos, podendo ser caurano **(1)**, clerodano **(2)** ou labdano **(3)**; são demonstradas a seguir suas estruturas básicas (Veiga Junior et al., 2002; Rigamonte et al., 2004; Pieri et al., 2009).



Os principais diterpenos detectados no óleo resina de copaíba são o ácido caurenico **(4)**, ácido poliáltico **(5)** e ácido copálico **(6)**. Alguns estudos também inferem como diterpenos principais os ácidos colavênico**(7)**, colavenol **(11)** e hardwíckiico **(12)**. Sendo o ácido copálico considerado biomarcador das espécies de *Copaifera* spp., pois este foi detectado em todos os óleos resinas analisados em estudos variados, independentemente da espécie botânica. A Tabela 1 apresenta todos os ácidos diterpênicos detectados em óleo resina de copaíba (Veiga Junior et al., 2002; Rigamonte et al., 2004; Pieri et al., 2009; Albuquerque et al., 2017; Da Trindade, et al., 2018; Lima, et al., 2020; Lima et al., 2021).

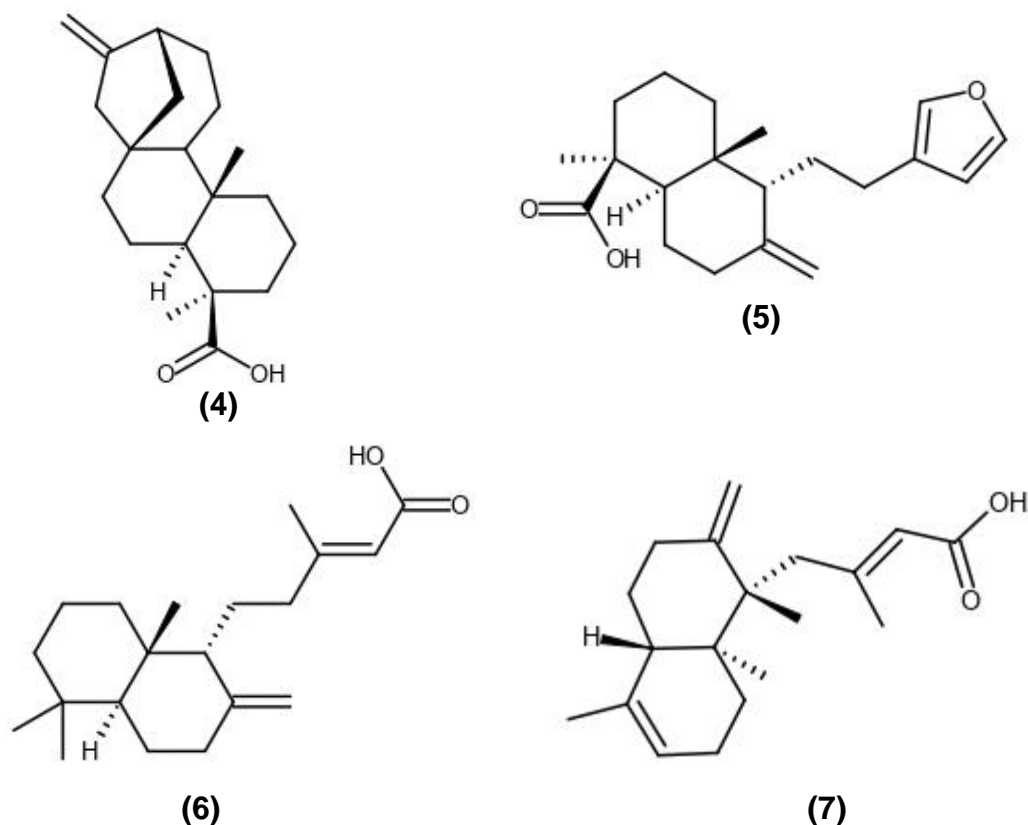


Tabela 1 – Diterpenos detectados no óleo resina das espécies de *Copaifera* sp.

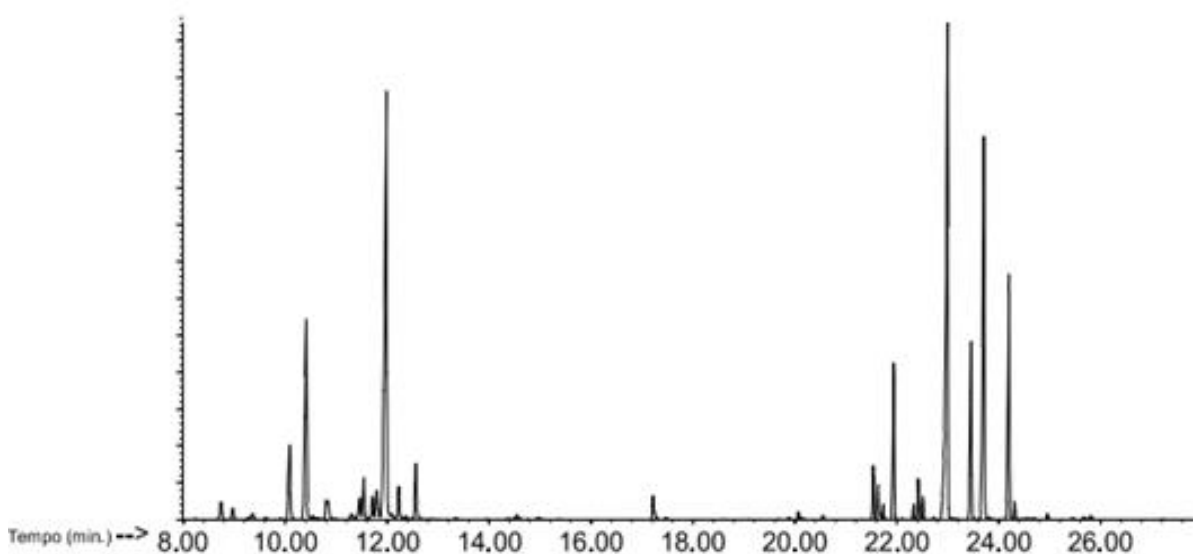
DITERPENO	DITERPENO	DITERPENO
Kaureno	Ácido ent-agático	Ácido labd-7-en-15-óico
Kaurenol	Ácido kolavênico (3,13-Clerodadien-15-oic)	Ácido Labd-8(20)-eno-15,18-dióico
Ácido caurenóico	Ácido Crolequínico (ent-15,16-EpoXi-13(16),14-clerodadien-18-oic)	labdano
Ácido poliáltico	Ácido Hardwickiico	Manool
Kaur-16-ene	Ácido patagônico	Ácido pimárico
Ácido eperúico	8-Hidroxilabdanóico	Metil colavenato
Ácido catívico (13S)-7Labden-15-óico	Ácido 3-cleroden-15,18-dióico	Eperuato de Metila
Ácido copálico	Ácido (13E)-ent-Labda-713-dien-15-oic	Ácido (-)-3β-AcetoXylabdan-8(17)-13-dien-15-oic
Ácido 3β-acetoxicopálico	Ácido 3-metil-5-(2,2,6-trimetil-6-hidroxi-1-ciclohexil)-pentanóico	Copalato de Metila
Ácido 3β-hidroxi-copálico	3-HidroXy-14,15-dinorlabd-8(17)-en-13-ona	Kolavenol
Ácido ent-8(17) Labden 15,18-dióico		

Fonte: desenvolvida pela autora, por meio de levantamento de dados da literatura. (Trindade, 2018; Arruda, 2019; Ácacio, 2020; Lima, 2021).

A fração volátil de óleo essencial é constituída por sesquiterpenos, e é o que caracteriza o aroma marcante do óleo; portanto de interesse na indústria de cosméticos. Estes sesquiterpenos podem ser divididos em sesquiterpenos oxigenados (álcoois) e hidrocarbonetos sesquiterpênicos. Dentre os presentes no óleo resina de copaíba destacam-se: β -carofileno (majoritário), α -humuleno, α -copaeno, β -elemeno, β -bisaboleno. A Tabela 2 apresenta o levantamento dos sesquiterpenos identificados como constituintes do óleo resina de copaíba (Cascon et al., 2000; Pieri et al., 2009; Albuquerque et al., 2017; Da Trindade, et al., 2018; Arruda, Caroline et al., 2019; Lima, et al., 2021).

Os estudos de fitoquímica do óleo-resina de *Copaifera* sp. são realizados em sua maioria por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-MS); visto que o material vegetal se trata de um óleo constituído em sua grande parte por compostos voláteis. No entanto, por também possuir fração não volátil, há na literatura o cromatograma descrito característico esperado das espécies de copaíba. É possível observar cromatograma com duas regiões de concentração de picos eluídos - Figura 7; sendo os sesquiterpenos, constituintes da fração volátil, eluídos entre 8 e 13 minutos e os diterpenos componentes da fração resinosa eluídos entre 20 e 26 minutos (Junior, V. F. V.; Pinto, A. C., 2002).

Figura 7- Cromatograma do óleo de *Copaifera* sp. por cromatografia gasosa de alta resolução (CGAR).



Fonte: Junior, V. F. V.; Pinto, A. C., 2002.

Tabela 2 – Sesquiterpenos detectados no óleo resina de *Copaifera* sp.

SESQUITERPENOS	SESQUITERPENOS
Alo-Aromadendreno	α -Farneseno
Ar-Curcumeno	<i>trans</i> - β -Farneseno
α -Bergamoteno	γ -Elemeno
β -Bergamoteno	β -Farneseno
Biciclogermacreno	<i>trans</i> - β -Farneseno
β -Bisaboleno	Fonenol
β -Bisabolol	Germacreno B
α -Bourbouneno	Germacreno D
Cadaleno	α -Guaieno
Cadineno	β -Guaieno
α -Cadineno	γ -Guaieno
6-Cadineno	Guaiol
γ -Cadineno	α -Gurjuneno
α -Cadinol	Himacheleno
Calameneno	Humuleno
Calareno	α -Humuleno
β -Cariofileno	β -Humuleno
α -Cariofileno	γ -Humuleno
α -Cariofilenol	Ledol
Cedrol	Longiciclono
α -Cedreno	Longifoleno
Cipereno	Longipineno
Copaeno	α -Multijugenol
α -Copaeno	t-Muurolol
β -Copaeno	α -Muuroleno
Cubebeno	γ -Muuroleno
α -Cubebeno	Óxido de cariofileno
β -Cubebeno	α -Selineno
1,5-Dimetil-8-isopropilciclodeca- 1,4-dien-8-ol	β -Selineno
α -Elemeno	β -Sesquifelandreno
β -Elemeno	Veridiflorol
6-Elemeno	β -Vetiveneno
γ -Elemeno	α -Ylangene

Fonte: desenvolvida pela autora, através de levantamento de dados da literatura (Trindade, 2018; Arruda, 2019; Ácacio, 2020; Lima, 2021).

2.5 Uso popular e atividades farmacológicas das espécies de *Copaifera* sp. (copaíba)

As espécies de copaíba possuem uma gama de indicações etnofarmacológicas, conhecidas e utilizadas no Brasil desde século XVI; quando os indígenas começaram a utilizar as espécies ao observarem que animais esfregavam suas feridas nas árvores de copaíba. Assim, perceberam as propriedades cicatrizantes e anti-inflamatórias das

copaibeiras, difundindo o uso do óleo resina das copaíbas (Veiga jr, et al., 2001; Arruda, et al., 2019).

O óleo resina de copaíba é muito utilizado na medicina tradicional pela população de diversos estados brasileiros devido suas propriedades medicinais como cicatrizante, anti-inflamatório, analgésico, antimicrobiano, antisséptico, anticarcinogênico, expectorante e diurético. Além disso, a literatura relata o uso do mesmo para tratamento de: cistite, incontinência urinária, gonorreia e sífilis; doenças respiratórias, como bronquite, pneumonia e sinusite; infecções na pele e mucosas, como dermatites, psoríase, feridas, picadas de animais peçonhentos; úlceras e lesões do útero; leishmaniose e massagens na cabeça para dores e convulsões; e há ainda, o uso como afrodisíaco e estimulante. (Veiga jr, et al., 2001; Shanley, P. et al, 2005; Rios, M.N.D.S., Pastore Junior, F., 2011; De Albuquerque, K.C.O. et al, 2017; Trindade, et al., 2018; Arruda, et al., 2019).

Devido as propriedades terapêuticas e odor agradável proveniente de sua fração essencial volátil o óleo resina de copaíba tem sido utilizado atualmente na indústria cosmética na produção de sabonetes, loções, cremes e hidratantes, espumas de banho, xampus e condicionadores de cabelo como fixador de perfume, agente emoliente, bactericida e anti-inflamatório. E há também um interesse em utilizar este óleo resina como combustível ecologicamente limpo, por este possuir altas quantidades de hidrocarbonetos presentes em sua constituição, tornando-o uma fonte renovável para este mercado (Pieri et al., 2009; Trindade, et al., 2018; Arruda, et al., 2019).

As atividades farmacológicas do óleo resina de copaíba são atribuídas aos seus constituintes sesquiterpenos e diterpenos sendo descritos em alguns estudos a associação da constituição química com o efeito farmacológico; no entanto, vale ressaltar que é algo difícil de se afirmar mesmo diante de resultados significativos, devido à complexidade da amostra na qual muitas vezes a atividade farmacológica pode ocorrer por efeito sinérgico ou aditivo entre os diversos constituintes da amostra (Arruda, et al., 2019).

O uso de plantas medicinais para fins terapêuticos advindo da tradicionalidade evidência as atividades farmacológicas das plantas; estimulando e potencializando a

realização de estudos científicos para comprovação de eficácia e segurança. Diante disso, visto o amplo e diverso uso do óleo resina de copaíba na medicina tradicional; há estudos visando comprovar cientificamente seus efeitos farmacológicos (Brandão et al., 2006; Brandão, 2010; Acácio, 2020).

O efeito cicatrizante foi avaliado em estudo *in vivo* por Paiva e colaboradores (2002) no qual o óleo resina de *C. langsdorffii* em soluções de 2% e 4% aplicados topicamente em ratos; observou-se aceleração significativa do processo de cicatrização e redução do tamanho da ferida. O potencial efeito farmacológico como cicatrizante também foi confirmado em pesquisa que avaliou o óleo resina bruto e creme à 10% do óleo resina de copaíba em feridas de coelhos, ambos propiciaram cicatrização significativa das feridas (Masson-meyers, et al., 2013). Além disso, foi observado atividade angiogênica e efeito na aceleração da recuperação da pele após dano epitelial (Estevão et al., 2013). Essa ação cicatrizante do óleo resina de copaíba também foi observada em um estudo etnobotânico com idosos, os quais realizam a aplicação direta do óleo resina bruto no local afetado (Rodrigues et al., 2014).

Quanto à atividade anti-inflamatória; os óleo resinas de *C. cearensis*, *C. reticulata* e *C. multijuga* foram avaliados em modelos de pleurisia em camundongos por Veiga et al. (2007) sendo os resultados positivos quanto à produção de óxido nítrico e acúmulo total de leucócitos e neutrófilos. Gelmini e colaboradores (2013) também demonstraram a atividade anti-inflamatória *in vivo* do óleo resina de *C. langsdorffii*; propondo um mecanismo de ação que envolve a inibição da translocação do NF-KB para o núcleo e, conseqüentemente a produção de citocinas (Gelmini et al., 2013). De forma complementar, foi observado que a administração oral em ratos do óleo resina de copaíba protegeu a pele contra necrose através de discreta ação anti-lipoperoxidação, resultante de sua atividade antioxidante e anti-inflamatória (Lima-silva et al., 2009).

A atividade anti-inflamatória ocorre devido à presença de alguns compostos no óleo; sendo apontado como principais responsáveis por essa ação os compostos hidrocarbonetos sesquiterpênicos, especialmente o β -cariofileno e β -bisaboleno. Segundo a literatura, a fração que contém hidrocarbonetos tem maior atividade anti-inflamatória do que as frações de álcoois sesquiterpênicos e ácidos diterpênicos

(Veiga Junior et al., 2002; Oliveira, et al. 2005; Veiga Junior et al., 2005; Ramos, 2006; Pieri et al., 2009).

Em estudo que analisa concomitantemente o efeito anti-inflamatório e analgésico do óleo resina de *Copaifera* sp., há a comparação do óleo bruto com alguns de seus componentes isolados: ácido copálico, éster metílico do ácido solidago e bisabolol. Os resultados demonstraram que o óleo resina de *Copaifera* sp. bruto apresentou maior atividade anti-inflamatória e analgésica do que os seus componentes isolados. E em estudos *in vivo* em camundongos, o óleo resina de *Copaifera* sp. demonstrou-se capaz de inibir significativamente a migração de eosinófilos, confirmando o efeito anti-inflamatório (Veiga Junior et al., 2002; Pieri et al., 2009).

A propriedade antimicrobiana do óleo resina é descrita na literatura para diversas espécies de *Copaifera*. Moraes et al. (2020) avaliou a atividade antimicrobiana do óleo resina de *Copaifera pubiflora* e de alguns de seus componentes isolados contra bactérias orais; e foi observado que ambos afetaram de forma irreversível a integridade da membrana bacteriana (Moraes et al., 2020). Pieri et al. (2012) demonstrou o perfil antimicrobiano de soluções a 10% de óleo resina de *Copaifera officinalis* e *Copaifera langsdorffii*; o estudo identificou que as soluções a base do óleo resina de copaíba inibem o crescimento das cepas bacterianas; *Escherichia coli*, *Pseudomonas Aeruginosa*, *Shigella flexneri* e *Staphylococcus aureus* (Pieri, F. A. et al., 2012). A atividade antibacteriana do óleo resina de copaíba tem sido alvo de estudos e estes apresentam resultados positivos, na qual o óleo tem este efeito farmacológico contra diversos patógenos, incluindo gram-negativos, como *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e gram-positivos; *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. (Tobouti, et al., 2017).

O óleo resina de copaíba também apresentou atividade antifúngica *in vitro* frente a fungos dermatófitos, nos quais provocou lesões estruturais e alterações morfológicas, demonstrando-se, portanto, potente para o tratamento de dermatofitoses (Zimmermam et al., 2013). Tobouti e colaboradores (2017) demonstraram que o óleo resina de *Copaifera langsdorffii* inibi o crescimento de diversos fungos como, *Candida albicans*, *T. mentagrophytes*, *T. rubrum*, *A. flavus*, *A. tamarii*, entre outros (Tobouti, et al., 2017).

A literatura científica apresenta ainda resultados significativos do uso do óleo resina de copaíba para tratar diversos tipos de infecções, desde garganta até infecções urinárias; visto as evidências da ação do óleo resina contra variados tipos de microorganismos, bactérias gram-positivas e negativas à diversas espécies de fungos (Tobouti, Priscila Lie et al., 2017; Rodrigues et al., 2014; Masson, 2011; Pieri et al., 2012). Há ainda estudos que apresentam as atividades farmacológicas do óleo resina de copaíba bruto e por seus constituintes isolados. Um exemplo, é o ácido copálico, diterpeno presente no óleo resina de copaíba, constituinte da fração não volátil; que foi eficaz em tratar infecções causadas por microrganismos multirresistentes a antibióticos (Abrão et al., 2015; Trindade, et al., 2018; Arruda, et al., 2019).

Atividade antiparasitária do óleo resina de espécies de *Copaifera* sp. também tem sido estudada; há resultados significativos de ação anti-helmíntica (*Anacanthorus penilabiatus* e *Mymarothecium viatorum*); antileishmania (*Leishmania amazonensis*) e anti *Trypanosoma*. Experimentos *in vitro* e *in vivo* contra *Trypanosoma* com óleo resina de *C. duckei* demonstraram diminuição da sobrevivência do parasita; e testes *in vivo* ainda demonstraram efeito tripanocida causado pelo óleo resina dose-dependente (Dos Santos, et al., 2011; Arruda, et al., 2019).

A atividade anti-tumoral apresentada pelo óleo resina de copaiba tem sido estudada em bioensaios *in vivo* e *in vitro*; os resultados destes tem sido positivos e indicam o efeito anticancerígeno. A pesquisa de Gomes et al. (2008) avaliou atividade antitumoral do óleo resina de *C. multijuga* por administração oral em camundongos ou ratos; demonstrou efeito antineoplásico contra tumor sólido e ascítico de Ehrlich após 10 dias consecutivos de tratamento. Bioensaios em camundongos também demonstraram resultados significativos contra carcinoma; observando-se a ocorrência da inibição do crescimento tumoral. Em experimentos *in vitro* observa-se a redução significativa da viabilidade celular das células de melanoma. Contra células de mastocitoma murinho o óleo resina de copaíba demonstrou potente atividade antitumoral, sendo o efeito dose dependente (Veiga Junior et al., 2002; Matos Gomes, et al., 2008; Pieri et al., 2009; Arruda, et al., 2019).

A atividade gastroprotetora apresentada pelo óleo resina de copaíba avaliada em modelos de lesão gástrica, demonstrou nos resultados que a administração oral do óleo resina de *C. Langsdorffii* ocasionou proteção contra danos gástricos,

apresentando efeito dose-dependente; e redução das lesões quando existentes. No entanto, outras pesquisas relatam que a ação no trato gastrointestinal apresenta relação dose - ocorrência de efeitos adversos. Pois, em estudos *in vivo* observou-se a ocorrência de diarreia, perda de peso e ação irritante no comportamento dos animais (Paiva, L. A. F. et al., 1998; Veiga Junior et al. 2002; Pieri et al. 2009).

A literatura evidencia as potentes atividades farmacológicas do óleo resina das copaibeiras; confirmando o uso na medicina tradicional. Vale ressaltar, que devido a vasta variedade de espécies que compõe o gênero *Copaifera* sp. muitas pesquisas não apresentam identificação botânica. A Tabela 3 apresenta o levantamento de estudos das atividades farmacológicas comprovadas cientificamente por variados bioensaios. Apesar das evidências pré-clínicas de atividades e propriedades farmacológicas do óleo-resina de *Copaifera* sp., não existe no Brasil fitoterápico desenvolvido a base deste óleo.

Tabela 3 – Atividades farmacológicas do óleo resina das espécies de *Copaifera* sp. que possuem estudos científicos

Atividades farmacológicas	Espécies
Antibacteriana	<i>C. cearensis</i> Huber ex Ducke; <i>C. langsdorffii</i> Desf.; <i>C. lucens</i> Dwyer; <i>C. martii</i> Hayne; <i>C. officinalis</i> (Jacq.) L.; <i>C. paupera</i> (Herzog) Dwyer; <i>C. reticulata</i> Ducke;
Antifúngica	<i>C. langsdorffii</i> Desf.; <i>C. multijuga</i>
Anti-inflamatória	<i>C. cearensis</i> Huber ex Ducke; <i>C. duckei</i> Dwyer; <i>C. langsdorffii</i> Desf.; <i>C. multijuga</i> Hayne; <i>C. reticulata</i> Ducke; <i>C. pubiflora</i> ; <i>C. officinalis</i> (Jacq.) L.
Antileishmania	<i>C. cearensis</i> Huber ex Ducke; <i>C. langsdorffii</i> Desf.; <i>C. lucens</i> Dwyer; <i>C. martii</i> Hayne; <i>C. multijuga</i> Hayne; <i>C. officinalis</i> (Jacq.) L.; <i>C. paupera</i> (Herzog) Dwyer; <i>C. reticulata</i> Ducke
Antinociceptiva	<i>C. duckei</i> Dwyer; <i>C. multijuga</i> Hayne; <i>C. reticulata</i> Ducke; <i>C. langsdorffii</i> ; <i>C. pubiflora</i> ;
Antitripanossômica	<i>C. duckei</i> Dwyer; <i>C. reticulata</i> Ducke; <i>C. officinalis</i> (Jacq.) L.
Cicatrizante	<i>C. langsdorffii</i> ;
Gastroprotetor	<i>C. langsdorffii</i> Desf.;

Fonte: Trindade, et al., 2018; Arruda, et al., 2019; Lima, et al., 2021.

2.6 Formulações contendo óleo resina de copaíba

O uso tradicional e as atividades farmacológicas que o óleo resina de copaíba apresenta como cicatrizante, anti-inflamatório, antimicrobiano e analgésico demonstra que essa matéria prima vegetal apresenta grande potencial para o desenvolvimento

de fitoterápicos para uso tópico; visando o tratamento de lesões cutâneas. Porém, os óleos resina de copaíba não são disponíveis veiculados em formulações farmacêuticas (Albuquerque et al, 2017; Trindade, et al., 2018; Arruda, et al., 2019).

Visto isso, há estudos científicos visando o desenvolvimento de formas farmacêuticas de uso tópico veiculando o óleo resina de copaíba. As formas farmacêuticas destinadas a uso tópico, geralmente, disponíveis no mercado e alvo de desenvolvimento dos estudos, são em sua grande maioria cremes, loções e nanoemulsões. Diante disso, foi realizado um levantamento da literatura de formulações de uso tópico contendo óleo resina de copaíba (Tabela 4).

Tabela 4 – Formulações contendo óleo resina de copaíba descritas na literatura

Forma Farmacêutica	Óleo resina de copaíba (% p/p)	Referência
Creme	10%	Dos santos, Adriana Oliveira et al. <i>Leishmania amazonensis</i> : effects of oral treatment with copaiba oil in mice. <i>Experimental parasitology</i> , v. 129, n. 2, p. 145-151, 2011.
Nanoemulsão com filme de pectina (PEC)	1,3 a 6%	Norcino, L. B. et al. Pectin films loaded with copaiba oil nanoemulsions for potential use as bio-based active packaging. <i>Food Hydrocolloids</i> , v. 106, p. 105862, 2020.
Nanoemulsão	20%	Lucca, Leticia G. et al. Determination of β -caryophyllene skin permeation/retention from crude copaiba oil (<i>Copaifera multijuga</i> Hayne) and respective oil-based nanoemulsion using a novel HS-GC/MS method. <i>Journal of pharmaceutical and biomedical analysis</i> , v. 104, p. 144-148, 2015.
Nanoemulsão	5%	Rodrigues, Escarleth da CR et al. Development of a larvicidal nanoemulsion with Copaiba (<i>Copaifera duckei</i>) oleoresin. <i>Revista Brasileira de Farmacognosia</i> , v. 24, p. 699-705, 2014.
Nanoemulsão	10% e 20%	Dias, Daiane de O. et al. Optimization of Copaiba oil-based nanoemulsions obtained by different preparation methods. <i>Industrial Crops and Products</i> , v. 59, p. 154-162, 2014.
Nanoemulsão	10%	De Moraes, Alessandra Regina Dhorm Pimentel et al. Effects of nanoemulsions prepared with essential oils of copaiba-and andiroba against <i>Leishmania infantum</i> and <i>Leishmania amazonensis</i> infections. <i>Experimental parasitology</i> , v. 187, p. 12-21, 2018.

Fonte: desenvolvida pela autora, por meio de levantamento de dados da literatura.

2.7 Espumas medicamentosas

As formulações destinadas para aplicação tópica disponíveis no mercado são, em sua grande maioria, loções, pomadas, cremes e géis. No entanto, devido à necessidade

de espalhamento, essas formas farmacêuticas apresentam desvantagens na aplicação em pele lesionada e sensibilizada, como a pele de pacientes oncológicos, que não raramente têm dificuldade de suportar o toque. Como alternativa, há as formulações na forma de espuma medicamentosa, que propiciam um contato mais suave com a pele inflamada, infectada e sensível (Zhao, et al., 2010; Gennari, et al., 2019; Kumar, et al., 2022).

As espumas também propiciam uma distribuição mais fácil da formulação em comparação com as bases semissólidas (cremes, pomadas, géis, loções), e uma melhor aderência em relação às formulações líquidas (soluções), podendo permanecer por mais tempo no local de administração (Feldman, Steven R., 2000; Hoc, Dagmara; Haznar-garbacz, Dorota., 2021).

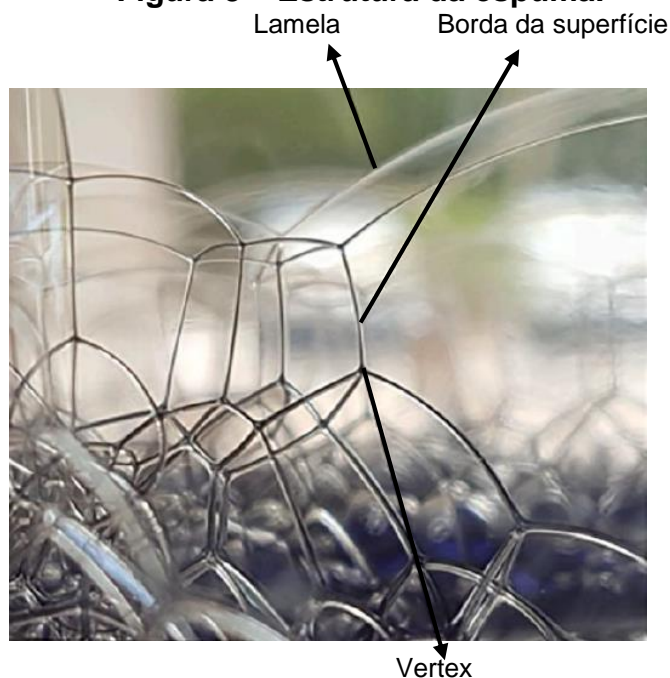
Segundo a Farmacopeia Europeia 10^a edição (Ph. Eur. 10th Edition), as espumas medicinais podem ser definidas como espumas constituídas por um grande volume de gás disperso em um líquido contendo uma ou mais substâncias ativas, geralmente formadas no momento da aplicação, a partir de um líquido contido em um recipiente pressurizado. Resumidamente, as espumas constituem uma dispersão de gás em um líquido ou sólido, podendo ser, portanto, divididas em espumas líquidas e espumas sólidas.

A espumas apresentam uma estrutura na qual as bolhas de gás individuais são separadas por uma camada fina contínua de fase líquida ou sólida, com espessura de cerca de 10nm a 1µm, chamada de lamela, o que favorece a formação de uma grande superfície (Figura 8). Portanto, as espumas constituem um sistema termodinamicamente instável e sua decomposição ocorre quando há ruptura da lamela, quando o volume de líquido que a forma é muito pequena em relação à superfície. Logo, a estabilidade das espumas está diretamente relacionada com a tensão superficial da interface líquido-gás, que depende de sua composição (Hoc, Dagmara; Haznar-garbacz, Dorota., 2021; Falusi, et al., 2022).

As espumas também podem ser classificadas de acordo com o tamanho das bolhas de gás que a formam, podendo ser: microporosa (diâmetro dos poros abaixo de 2nm), mesoporosa (diâmetro dos poros de 2 a 50nm) e macroporosa (diâmetro dos poros

acima de 50 nm). Quanto à distribuição do tamanho desses poros, pode-se classificar em monodispersos, poros de mesmo tamanho; ou polidispersos, poros de tamanhos variáveis (Malysa, K.; Lunkenheimer, Klaus., 2008; Hoc, Dagmara; Haznar-garbacz, Dorota., 2021; Kumar, et al., 2022).

Figura 8 – Estrutura da espuma.



Fonte: HOC, Dagmara; HAZNAR-GARBACZ, Dorota., 2021.

As espumas podem ser produzidas por três métodos: (i) agitação mecânica de um líquido ou solução; (ii) injeção de uma corrente de gás, líquido ou mistura em um líquido; (iii) redução abrupta de pressão em uma solução, suspensão ou emulsão por ativação de válvula em sistemas pressurizados (Zhao, Yanjun; Brown, Marc B.; Jones, Stuart A., 2010; Gennari, et al., 2019).

A composição das espumas, incluindo tanto os princípios ativos e excipientes, pode interferir na estabilidade e qualidade da forma farmacêutica; especialmente por serem termodinamicamente instáveis. Geralmente, as espumas são constituídas por tensoativos, solventes, estabilizadores de espuma e conservantes, podendo conter também promotores de penetração e gás propelente (Tabela 4). Caso sejam sem gás propelente, a espuma é produzida pela adição de ar por agitação a uma solução de polímero ou através da utilização de um dispositivo de bomba sem propelente (Parsa, et al., 2019; Gennari, et al., 2019; Falusi, et al., 2022; Kumar, et al., 2022).

Tabela 5 – Exemplos de constituintes de espumas.

Constituintes	Exemplo	% p/p
Solventes hidrofílicos	Água destilada, etanol, isopropanol, glicerina, propilenoglicol	q.s.p.
Solventes hidrofóbicos	Óleo mineral	11,2 – 5,6%
	Miristato de isopropila	5,0 – 2,5%
	Triglicérides de cadeia média	7,5 – 3,8%
Adjuvantes	Álcool estearílico	0,5 – 0,25%
	Éster de sacarose	0,8 – 0,81%
Tensoativos	Monoestearato de glicerila	1,2 – 0,6%
	Lauril sulfato de sódio	0,1 – 0,2%
Estabilizadores de espuma	Goma xantana	0,3%
	Celulose	0,5%
Modificador de viscosidade	Polivinil pirrolidona	0,05 – 2,0%

Fonte: Gennari, et al., 2019; Farkas, et al., 2019; Kumar, et al., 2022.

Os solventes utilizados na produção das espumas, podem ser hidrofílicos, como a água ou propilenoglicol; ou hidrofóbicos, como óleos insaturados, silicone e óleo mineral. Co-solventes anfífilos são utilizados para propiciar a solubilização e estabilidade de algumas substâncias ativas que são instáveis ou insolúveis em formulações aquosas, além disso, conferem emoliência às formulações (Kumar, et al., 2022).

Os agentes surfactantes são essenciais para gerar e estabilizar a espumas, atuando através da redução da tensão superficial da interface, diminuindo a energia do sistema e, conseqüentemente, aumentando a durabilidade da espuma. Também pode-se utilizar estabilizadores de espuma, que são polímeros como celulose, goma xantana e álcool laurílico; que atuam retardando o colapso da espuma, estabilizando-a depois de gerada. A viscosidade das espumas é outro parâmetro importante para que a formulação possua a textura desejável e boa propriedade de espalhamento; para isso pode-se utilizar modificadores de viscosidade, como polímeros naturais, semissintéticos (ex.: éteres de celulose) ou sintéticos (ex.: polivinilpirrolidona) (Gennari, et al., 2019; Hoc, Dagmara; Haznar-garbacz, Dorota., 2021).

2.7.1 Caracterização das espumas medicamentosas

A constituição da formulação implica diretamente em suas características, assim como o processo de obtenção. Já as propriedades físico-químicas interferem nos métodos de avaliação e caracterização. A Farmacopeia Europeia (Ph. Eur. 10th Edition) preconiza dois testes básicos para espumas medicamentosas: teste de densidade relativa e teste de tempo de expansão da espuma.

Por constituírem um sistema dinâmico, com constante mudança nos parâmetros físico-químicos, alguns parâmetros básicos são comumente avaliados na caracterização das espumas: expansão/taxa da espuma (EE %), estabilidade do volume espuma (EVE%), estabilidade do líquido da espuma (ELE%), capacidade de espuma (K). Estes parâmetros propiciam a avaliação da capacidade de formação da espuma e sua estabilidade, sendo experimentalmente obtidos através do método do cilindro (Arzhavitina, A.; Steckel, H., 2010; Farkas, et al., 2019; Falusi, et al., 2022; Kumar, et al., 2022).

Macroscopicamente, avalia-se a capacidade da formulação em formar uma espuma; bem como o tamanho médio das bolhas de ar e sua dispersão. Os ensaios reológicos são realizados porque a viscosidade da formulação influencia no processo de aspiração e também contribui com a estabilidade da espuma, sendo realizados apenas com a formulação líquida, posto que as espumas formadas não são homogêneas em todo o volume, dificultando a reprodutibilidade (Gennari, et al., 2019; Farkas, et al., 2019; Hoc, Dagmara; Haznar-garbacz, Dorota., 2021).

Em um estudo conduzido por Falusi e colaboradores (2022) utilizando ferramentas de abordagem “*Quality by Design – QbD*”, foram definidos como atributos críticos de qualidade (CQAs): expansão da espuma, estabilidade do volume da espuma, tamanho e número de bolhas de ar, espalhabilidade, viscosidade e densidade. Com relação aos excipientes utilizados na formulação, os autores observaram que a concentração e tipo de polímero são altamente críticos para o desenvolvimento de espuma, estando de acordo com outros relatos da literatura (Farkas, et al., 2019; Gennari, et al., 2019).

2.7.2 Aplicação tópica das espumas medicamentosas

Como mencionado anteriormente, em comparação com as formulações para aplicação tópica disponíveis no mercado, as espumas apresentam vantagens, como o toque mais suave, minimizando/evitando a necessidade do toque/fricção para o adequado espalhamento. O espalhamento manual causa maior desconforto à pele sensível, irritada e inflamada, além de poder aumentar o risco de ocorrência de infecções secundárias decorrente do toque das mãos. Além disso, as espumas apresentam alta taxa de expansão, facilitando a cobertura de grandes superfícies de forma rápida e uniforme (Zhao, Yanjun et al., 2010; Farkas, et al., 2019; Velasco et al., 2019; Kumar, et al., 2022).

Diante do exposto, alguns estudos tiveram como objetivo comparar a eficácia e eficiência das espumas em relação à formas farmacêuticas tradicionais. Campieri e colaboradores (1992) desenvolveram uma espuma de ácido 5-aminossalicílico e avaliaram o perfil de distribuição após a aplicação em pacientes com colite ulcerosa (n= 10). O estudo seguiu um design randomizado cruzado e utilizou a técnica de cintilografia. O perfil de distribuição da espuma de ácido 5-aminossalicílico foi comparado à de enemas líquidos. Os autores observaram que a espuma desenvolvida se mostrou mais eficaz, atingindo o limite superior da doença (cólon transverso) em todos os casos, enquanto o enema líquido falhou em dois pacientes. Além disso, observaram que a espuma se distribuiu mais uniformemente e persistiu por um maior tempo no cólon descendente e sigmóide.

Huang e colaboradores (2005) compararam a distribuição do corticosteroide propionato de clobetasol a partir de diferentes formas farmacêuticas em um estudo *in vitro* utilizando pele humana com epiderme e camadas superficiais da derme papilar. Os resultados obtidos mostraram que a veiculação por meio de uma espuma medicamentosa propiciou a entrega de uma maior quantidade do fármaco (30%) quando comparados às formas farmacêuticas tradicionais: creme (20%), creme emoliente (15%), loção (20%) e solução (18%). Os autores também observaram que a permeação cutânea a partir da espuma foi superior (5,8%) quando comparada às outras formas farmacêuticas (1,3 a 2,8%).

Blume-peytavi e colaboradores (2011), em um estudo clínico randomizado com 113 mulheres com alopecia androgenética, compararam o tratamento tópico (24 semanas) de uma espuma de minoxidil 5% (n= 56) com uma solução de minoxidil a 2% (n= 57). Os resultados mostraram que a aplicação da espuma uma vez ao dia foi mais eficaz que a solução aplicada duas vezes ao dia, resultando em uma maior taxa de aumento do cabelo (16,2% vs 13,8%) e ampliação da área alvo (31,9 cabelos/cm² vs 28,4 cabelos/cm²; sendo 7,5 cabelos/cm² no início do tratamento). Adicionalmente, as mulheres tratadas com a espuma apresentaram menor incidência de efeitos adversos em relação à solução, respectivamente 43 eventos vs 51 eventos. Os efeitos adversos apresentados foram: hipertricose facial, queda de cabelo, dor de cabeça relacionada à medicação, exantema maculopapular e desconforto, tensão do couro cabeludo, dermatite e prurido no tegumento.

Em um estudo randomizado duplo-cego com 961 pacientes, Draelos e colaboradores (2015) compararam o desempenho de uma espuma de ácido azelaico a 15% (n=484) em relação ao veículo (n=477) no tratamento de pacientes com rosácea papulopustulosa moderada a grave. As formulações foram administradas por 12 semanas, de 12 em 12 horas. Ao final do tratamento a espuma de ácido azelaico mostrou-se eficiente e segura, com efeitos adversos leves a moderados, cutâneo e local; com taxa de avaliação global significativamente maior (32,0% vs 23,5%) e com maior diminuição na média de lesões inflamatórias (-13,2%) quando comparada com o veículo.

Kanti e colaboradores (2016), em um estudo randomizado, duplo-cego, controlado por placebo, avaliaram o tratamento tópico da alopecia androgenética em 45 homens divididos em dois grupos: 1- espuma de minoxidil 5% (n=22) e 2- placebo (n= 23). Após 24 semanas de tratamento os autores observaram que a espuma foi eficaz na estabilização da densidade e largura do cabelo, bem como na cobertura do couro cabeludo nas áreas frontotemporal e do vértice (10,8 cabelos/cm², aumento médio de 7,1 cabelos/cm² quando comparado à linha de base do estudo). A espuma também apresentou bom perfil de segurança e tolerabilidade; com baixa taxa de ocorrência de dermatite de contato.

Mais recentemente, Gold e colaboradores (2020) conduziram dois estudos clínicos de

fase 3, randomizados, de 12 semanas, controlados por veículo, em pacientes com rosácea papulopustulosa moderada a grave. Os estudos foram denominados 11 (espuma de minociclina 1,5%, n = 495; espuma de veículo, n = 256) e estudo 12 (espuma de minociclina 1,5%, n = 514; veículo espuma, n = 257). Os resultados mostraram que a espuma de minociclina 1,5% propiciou uma redução significativamente maior do número de lesões inflamatórias em relação ao placebo (estudo 11: -17.57 vs -15.65; $p= 0,0031$; estudo 12: -18.54 vs -14.88; $p < 0,0001$) e altas taxas de sucesso na avaliação global (estudo 11: 52.1% vs 43.0%; $p= 0,0273$; estudo 12: 49.1% vs 39.0%; $p= 0,0077$), com perfil de segurança favorável ao tratamento, não ocorrendo nenhum efeito adverso grave.

A Tabela 6 ilustra alguns princípios ativos veiculados na forma de espuma medicamentosa e disponíveis no mercado.

Tabela 6 – Espumas medicamentosas disponíveis no mercado, seus princípios ativos, concentração e indicação.

Princípios ativos	Concentração (p/p%)	Excipientes	Indicações
Ácido azelaico	15%	Ácido benzóico, álcool cetosteárico, dimetil isossorbida, triglicérides de cadeia média, metilcelulose, mono e diglicérides, polioxil 40 estearato, polissorbato 80, propileno glicol, água purificada, hidróxido de sódio e goma xantana.	Tratamento tópico de rosácea leve a moderada
Valerato de betametasona	0,12%	Álcool cetílico, ácido cítrico, etanol (60,4%), polissorbato 60, citrato de potássio, propilenoglicol, água purificada, álcool estearílico e hidrocarboneto (propano/butano)	Processos inflamatórios e pruriginosos de dermatoses do couro cabeludo
Dipropionato de Betametasona + calcipotrieno	0,064% + 0,005%	Parafina líquida, éter polioxipropileno estearílico, vitamina E, vaselina branca, butil-hidroxitolueno (E321), butano éter dimetílico.	Psoríase
Peróxido de benzoíla	9,8% 5,3%	BHT, C12-15 alquil benzoato, álcool cetosteárico, ácido cítrico, dimeticona, EDTA dissódico, cera emulsificante, glicerina, metilparabeno, poliéster-5, propilenoglicol, propilparabeno, água purificada, citrato de sódio, esteareth-10 e HFA-134a (1,1,1,2-tetrafluoretano).	Acne vulgar leve a moderada
Calcipotrieno	0,005%	Álcool cetílico, fosfato de sódio dibásico, vitamina E, edetato dissódico, miristato de isopropila, óleo mineral leve, éter cetosteárico polioxil 20, propilenoglicol, água purificada, álcool estearílico, petrolato branco e hidrocarboneto (propano/n-butano/isobutano).	Psoríase em placas do couro cabeludo e do corpo
Clindamicina	1%	Álcool, álcool cetílico, polissorbato 60, hidróxido de potássio, propilenoglicol, álcool estearílico e água.	Acne vulgar
Desonida	0,05%	Ácido cítrico anidro, álcool cetílico, ciclometicona, miristato de isopropila, óleo mineral leve, vaselina branca, éter cetosteárico polioxil 20, citrato de potássio (monohidratado), propilenoglicol, água purificada, monolaurato de sorbitano, fenoxietanol e hidrocarboneto (propano/butano).	Dermatites e a dermatoses
Cetoconazol	2%	Álcool cetílico, ácido cítrico, etanol 58%, polissorbato 60, citrato de potássio, propilenoglicol, água purificada, álcool estearílico e hidrocarboneto (propano/butano).	Dermatite seborreica
Minociclina HCl	1,5% 4%	Óleo de soja, óleo de coco, óleo mineral leve, ciclometicona, álcool cetosteárico, ácido esteárico, álcool miristílico, óleo de ricino hidrogenado, cera branca (cera de abelha), álcool estearílico, docosanol e hidrocarboneto (butano + isobutano + propano).	Lesões inflamatórias de rosácea; Lesões inflamatórias de acne vulgar não nodular moderada a grave
Sulfeto de selênio	2,25%	Dimeticona, etilparabeno, glicerina, metilparabeno, fenoxietanol, polissorbato 20, povidona, propilenoglicol, propilparabeno, água purificada, ácido esteárico, trolamina e hidrocarbonetos (butano/propano).	Dermatite seborreica e tinea versicolor de pele

Princípios ativos	Concentração	Excipientes	Indicações
Enxofre / Sulfacetamida	5% a 10%	Butileno Glicol, goma de Celulose, cetearéth-20, álcool cetearílico, dimeticona, glicerina, silicato de alumínio e magnésio, polissorbato 20, dióxido de titânio, água e hidrocarbonetos (butano/propano).	Acne rosácea, acne vulgar e dermatite seborreica
Tazaroteno	0,1%	Hidroxitolueno butilado, cetearéth-12, ácido cítrico anidro, adipato de diisopropil, óleo mineral leve, citrato de potássio monohidratado, sorbato de potássio, água purificada, ácido sórbico e hidrocarboneto (propano/n-butano/isobutano).	Acne vulgar
D-pantenol	5% a 9%	Água, Pantenol, glicerina, trimetilglicina (betaína), extrato de folha de <i>Aloe barbadensis</i> , extrato de <i>Chelidonium majus</i> , óleo de rícino hidrogenado PEG-40, citrato laureth-7, fenoxietanol, perfume, alantoína, acetato de tocoferol, palmitato de retinil, ácido linoleico, ácido linolênico, bisabolol, EDTA dissódico, ácido cítrico.	Queimadura solar, irritação da pele

Fonte: desenvolvida pela autora, por levantamento de dados da literatura (Farkas, et al., 2019; Hoc, Dagmara; Haznar-garbacz, Dorota., 2021; Kumar, et al., 2022).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Determinar o perfil fitoquímico e caracterizar o óleo resina de *Copaifera officinalis* (copaíba); realizar o controle de qualidade; desenvolver métodos qualitativos e quantitativos e desenvolver medicamento fitoterápico inovador veiculando o óleo resina de copaíba, para o terapia adjuvante de lesões cutâneas, como feridas oncológicas.

3.2 Objetivos específicos

- Obter o óleo resina de copaíba e realizar o controle de qualidade físico-químico;
- Determinar o perfil químico e realizar caracterização química do óleo resina de copaíba;
- Desenvolver método qualitativo por cromatografia em camada delgada no óleo resina;
- Desenvolver e validar método analítico quantitativo por cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massas no óleo resina;
- Desenvolver formulação inovadora veiculando o óleo resina de copaíba;
- Realizar caracterização da forma farmacêutica desenvolvida;
- Realizar estudo de identificação do marcador químico do óleo resina na formulação desenvolvida.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Equipamentos

- Balança analítica BEL Modelo M214Ai;
- Chapa aquecedora Corning Modelo 480C (Ciencor Scientific®, São Paulo, Brasil);
- Cromatógrafo a gás Shimadzu GC-2030; acoplado ao espectro de massas Shimadzu GCMS-QP2020 NX; com injetor AOC – 6000 auto sampler;
- Borrifador de vidro;
- Agitador magnético Corning PC-420D (Ciencor Scientific®, São Paulo, Brasil);
- Banho ultrassônico Branson 2510R-DTH (Soni-Tech do Brasil Ltda., São Bernardo do Campo, Brasil).

4.2 Materiais de consumo

4.2.1 Reagentes e solventes

Acetato de etila P.A. (ACS Científica, São Paulo, Brasil);

Ácido acético glacial (CRQ Produtos Químicos, São Paulo, Brasil);

Ácido etilenodiaminotetracético EDTA (Merck, Brasil);

Ácido sulfúrico P.A. (Labsynth, São Paulo, Brasil);

Água purificada (produzida no laboratório Milli-Q);

Anisaldeído (Vetec, Brasil);

BHT grau farmacêutico (Debonne Dermocosméticos, Belo Horizonte, Brasil);

Clorofórmio UV/HPLC (Dinâmica Química Contemporânea Ltda, Brasil);

Copolímero de enxerto de álcool polivinílico (75%), polietilenoglicol (25%) Kollicoat IR (BASF, Alemanha);

Dexpantenol (BASF, Alemanha);

Diclorometano P.A. (Anidrol, Brasil);

Éter monoetílico de dietilenoglicol - Transcutol® (Gattefossé, França);

Hexano PA, (Êxodo Científica, Brasil);

Metanol P.A. (Dinâmica Química Contemporânea Ltda, Brasil);

Miristato de isopropila - Kollicream® IPM (BASF, Alemanha);

Miristato de Povidona - Kollidon 17PF (BASF, Alemanha);

Polietileglicol (PEG) 400 - Kollisol PEG (BASF, Alemanha);

Poloxamer 188 - Kolliphor® P 188 (BASF, Alemanha);

Poloxamer 407 - Kolliphor® P 407 (BASF, Alemanha);

Propilenoglicol - Kollisol PG (BASF, Alemanha);

Sílica Gel para cromatografia em camada delgada (Lote: 129.0607, Macherey-Nagel, Alemanha);

Solução conservante de parabenos (6% metilparabeno, 3% propilparabeno, 91% propilenoglicol).

4.2.2 Substância química de referência

β -cariofileno \geq 80 (Lote: MKCH9718, Sigma-Aldrich, EUA)

4.2.3 Coluna cromatográfica

SH-Rtx-5MS; 30m x 0,25mm x 0,25 μ m (Lote: 1650813; Shimadzu, EUA);

DB-5MS; 30m x 0,25mm x 0,25 μ m (Lote:USR282321H; Agilent Technologies; EUA).

4.2.4 Materiais diversos

Seringa de injeção para CG-EM;

Cuba de vidro;

Placa de vidro recobertas com sílica gel F254;

Micropipetas de 10 μ L, 1000 μ L (Eppendorf Research® plus);

Micropipetas de 2 μ L, 200 μ L (Gilson Pipetman®);

Balão volumétrico 10mL;

Vials de vidro 2mL para análise em CG-EM.

4.3 Material Vegetal

O óleo resina de *Copaifera* sp. foi obtido, ex situ, de duas empresas que gentilmente forneceram os óleos para o estudo:

- Óleo-resina bruto de *Copaifera officinalis* (Jacq.) L. doado pela empresa Beraca Ingredientes Naturais S/A (Lote: 8183300APG; Pará, Brasil).
- Óleo essencial de *Copaifera* sp. doado pela empresa DoTerra (Lote: 2212513BR; São Paulo, Brasil).

Ambos foram registrados no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen), possuindo número de cadastro nº A749812.

4.4 Controle de qualidade: análise físico-químicas do óleo resina de *Copaifera officinalis* L.

O controle de qualidade do óleo resina de *Copaifera officinalis* L. foi realizado por meio da avaliação de suas características organolépticas e físico-químicas; os testes realizados estão descritos a seguir.

4.4.1 Características organolépticas

Os parâmetros organolépticos foram realizados por observação a olho nú e comparados com a descrição da literatura científica e estudos anteriores de nosso grupo (Rigamonte et al., 2004; Pieri et al., 2009; ACÁCIO, 2020).

4.4.2 Solubilidade

A solubilidade foi avaliada para complementação das análises qualitativas e quantitativas. Foi avaliada a obtenção de solução homogênea mediante diluição do óleo-resina de *Copaifera officinalis* L. em solventes de média a baixa polaridade.

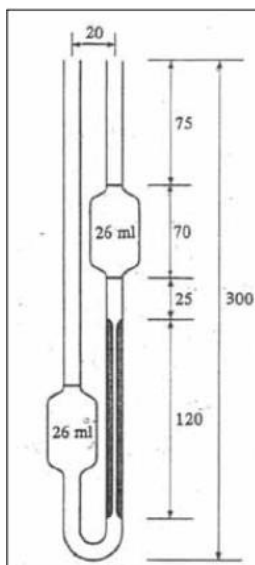
Conforme preconizado na Farmacopéia Brasileira 6ª Edição (Brasil, 2019) o experimento foi realizado à temperatura de 25 ± 5 °C. Em frascos de vidro de 2 mL, adicionou-se 1 µL de óleo resina de *C. officinalis* L.; posteriormente adicionou-se 1000 µL dos diferentes solventes e observou-se a olho nú a solução formada. Os solventes testados foram: hexano, diclorometano, clorofórmio e metanol; sendo testado um solvente por vez; a fim de se obter uma solução límpida e homogênea.

4.4.3 Densidade Relativa

A densidade relativa foi determinada pelo método do picnômetro, como preconizado na Farmacopeia Brasileira 6ª edição (Brasil, 2019). Utilizou-se picnômetro de 10mL, este foi pesado limpo e seco, com a tampa obteve-se o peso inicial (Pi) e posteriormente foi pesado com o óleo resina de *Copaifera officinalis* L., obtendo-se assim o peso final (Pf). O experimento foi realizado à temperatura de 25°C, em triplicata. Após as pesagens a densidade foi calculada pela fórmula: $D = \frac{Pi-Pf}{volume}$.

4.4.4 Viscosidade

A viscosidade foi determinada pelo viscosímetro de Ostwald, representado na Figura 9; no qual foi medido o tempo de fluxo do óleo resina de *Copaifera officinalis* L. (t1) e do líquido de referência (t2); o líquido de referência utilizado foi água destilada - µ2. O experimento foi realizado, utilizando-se 5mL de amostra, em triplicata, à temperatura de 20°C, mensurada no momento do experimento. Após a obtenção dos tempos de escoamento, a viscosidade foi calculada pela fórmula: $\mu_1 = \frac{\mu_2 (t_1 d_1)}{(t_2 d_2)}$.

Figura 9 - Viscosímetro de Ostwald – dimensões em milímetros

Fonte: Farmacopéia 6ª edição – volume 1.

4.5 Perfil químico e desenvolvimento de método para caracterização química de *Copaifera officinalis* L.

O perfil químico e a caracterização do óleo resina de *C. officinalis* foram realizadas por cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia gasosa acoplada ao espectro de massas (CG-EM), em métodos desenvolvidos.

Para ambas análises cromatográficas, por CCD E CG – EM, utilizou-se como substância química de referência (SQR) o padrão de β -cariofileno com pureza \geq 80% (Lote: MKCH9718, Sigma-Aldrich, EUA).

4.5.1 Obtenção do perfil químico e caracterização química por cromatografia em camada delgada (CCD)

O perfil químico do óleo resina de *C. officinalis* foi obtido por método desenvolvido por CCD utilizando sílica gel como fase estacionária e sistema eluente adequado para separação e detecção dos constituintes deste óleo. Com objetivo de proposta de método de identificação qualitativa da espécie.

A partir das condições, inicialmente estabelecidas por Acácio (2020), foram feitas

modificações na diluição da amostra e na constituição da fase móvel. A condição inicial consistiu em fase estacionária de 2,5 mm de gel de sílica 60 G (Merck); fase móvel diclorometano 100%, solução amostra constituída de 0,50 µL de amostra em 2mL de diclorometano e como revelador anisaldeído sulfúrico com aquecimento em chapa à temperatura de 300 °C até o aparecimento de bandas coloridas.

4.5.1.1 Preparo das soluções

4.5.1.1.1 Soluções padrão de β -cariofileno e amostra de óleo resina de *C. officinalis* L.

Todas as soluções foram preparadas utilizando-se pipetas automáticas no momento de realização do experimento, com auxílio de vórtex para melhor dissolução, por 1 mim. As diluições da solução padrão e amostra testadas estão demonstradas na Tabela 7.

Tabela 7 – Diluições avaliadas para o óleo resina de *Copaifera officinalis* e da SQR β -cariofileno para desenvolvimento de método qualitativo por cromatografia em camada desgada (CCD)

SQR β -cariofileno – (µL)	Oleo resina de <i>C. officinalis</i> (µL)	Diluyente: diclorometano (mL)
0,50	0,50	2
0,25	0,25	2
0,10	0,10	1
0,10	0,10	2
0,10	0,10	3
0,10	0,10	5

De acordo com os resultados apresentados nas cromatoplasmas, definiu-se a melhor diluição para aplicação, de ambas as soluções padrão de β -cariofileno e amostra de óleo resina de *C. officinalis* 0,10 µL diluídos em 5 mL de diclorometano.

4.5.1.1.2 Solução reveladora

Dissolveram-se 0,50 mL de anisaldeído em 10 mL de ácido acético glacial. Em seguida, adicionaram-se 85 mL de metanol e 5 mL de ácido sulfúrico

concentrado; a solução foi preparada à frio, em banho de gelo. Sendo, os reagentes adicionados respectivamente, na ordem mencionada.

4.5.1.2 Condições cromatográficas da CCD

Para condição cromatográfica, empregou-se como fase estacionária sílica-gel (Macherey-Nagel) com 0,25 mm de espessura. A fase móvel foi avaliada para diferentes misturas de solventes, conforme Tabela 8.

Tabela 8 – Diferentes fases móveis avaliadas para desenvolvimento de método qualitativo por cromatografia em camada delgada (CCD) para o óleo resina de *C. officinalis* e da SQR β -cariofileno.

Sistemas eluentes	Proporção
Tolueno : Acetato de etila	93 : 7
Tolueno : Acetato de etila	97 : 3
Hexano : Acetato de etila	90 : 10
Hexano : Clorofórmio	10 : 90
Hexano : Clorofórmio	5 : 95
Hexano : Clorofórmio: Acetato de etila	5 : 95 : 7
Hexano : Clorofórmio: Acetato de etila	70 : 10 : 7
Hexano : Clorofórmio: Acetato de etila	70 : 10 : 20

A fase móvel, definida como eluente foi a que proporcionou melhor separação dos constituintes do óleo resina; sendo observada pela separação, assim como, pelo fator de retenção (R_f) das diferentes bandas coloridas na cromatoplaça; comparando a solução amostra com a solução padrão de β -cariofileno. Portanto, o sistema de eluente definido foi hexano : clorofórmio : acetato de etila; na proporção de 70:10:20.

4.5.1.3 Procedimento

Aplicou-se na cromatoplaça, separadamente, em forma de banda, 10 μ L da SQR β -cariofileno (item 4.5.1.2) e 10 μ L da solução amostra (item 4.5.1.2). A cromatoplaça foi submetida a cuba de eluição; permanecendo até o eluente percorrer 10 cm do ponto de aplicação, posteriormente, após secagem ao ar, a cromatoplaça foi nebulizada com solução de anisaldeído sulfúrico (item

4.5.1.2.2). Após secagem ao ar, a cromatoplaça foi submetida a aquecimento em chapa à temperatura de 300°C. A Figura 10 apresenta o esquema da sequência de manchas, referentes às substâncias presentes, que devem ser obtidas na solução referência (SQR β -cariofileno) e solução amostra, respectivamente.

Figura 10 – Esquema da cromatoplaça obtida do método de análise qualitativa para identificação do óleo resina de *C. Officinalis*.

Mancha rosa pink	Mancha rosa pink	Rf - 0,5
	Manchas róseas	
	Manchas roxas	
	manchas róseas claras	
	manchas marrom	
SQR β -Cariofileno	Solução amostra	

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

4.5.2 Obtenção do perfil químico e caracterização química por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas – CG-EM

A caracterização química e obtenção do perfil cromatográfico por CG-EM foi realizada, conforme condições cromatográficas definidas em método desenvolvido por Acácio (2020) demonstrado na Tabela 9. Foram analisados no método duas amostras de óleo de *Copaifera* sp.; uma de óleo resina de *C. officinalis* L. e outra de óleo essencial de copaíba (item 4.3).

Tabela 9 – Condições cromatográficas de método preliminar por CG-EM para análise qualitativa do óleo resina de amostras de *Copaifera* sp.

PARÂMETRO	CONDIÇÃO
Coluna	SH-Rtx-5MS; 30m x 0,25mm x 0,25µm
Temperatura do forno	Inicial: 60 °C Rampa: 3 °C/min até 200 °C; 15 °C/min até 280 °C Final: 280 °C/20 min
Temperatura do injetor	250 °C
Temperatura da fonte de íons	250 °C
Temperatura da interface	250 °C
Tempo de corrida cromatográfica	70 min

Fonte: ACÁCIO, (2020)

A condição cromatográfica apresentada na Tabela 9 foi denominada condição A; utilizada como método exploratório para etapas subsequentes do desenvolvimento de método analítico para quantificação de β -cariofileno em óleo resina de *C. officinalis* L.

4.5.2.1 Preparo das soluções

4.5.2.1.1 Solução padrão de β -cariofileno

Prepararam-se uma solução misturando-se 1 µL da SQR de β -cariofileno em 1000 µL de hexano grau HPLC diretamente no vial de injeção de CG-EM. O vial foi submetido a homogeneização em equipamento vortéx.

4.5.2.1.2 Solução óleo resina de *C. officinalis* L.

Prepararam-se uma solução misturando-se 1 µL de óleo resina de *Copaifera officinalis* L. em 1000 µL de hexano grau HPLC diretamente no vial de injeção líquida do CG-EM. A solução no vial foi submetida a homogeneização em equipamento vortéx, por 1 min.

4.5.2.1.3 Solução de óleo essencial de copaíba

Prepararam-se uma solução misturando-se 1µL de óleo essencial de copaíba diretamente para o vial de injeção líquida de CG-EM em 1000 µL de hexano grau HPLC. A solução no vial foi submetida a homogeneização em equipamento vortéx por 1 min.

4.5.2.2 Procedimento

Todas as amostras preparadas conforme item 4.5.2.1 foram injetadas por injetor AOC – 6000 auto sampler em cromatógrafo a gás (Shimadzu GC-2030); acoplado a detector de massas (Shimadzu GCMS-QP2020 NX), com analisador de massas do tipo quadrupolo. Utilizando coluna capilar SH-Rtx-5MS; 30m x 0,25mm x 0,25µm (Shimadzu, EUA).

Utilizando o método de análise conforme condições cromatográficas apresentadas na Tabela 9; modo de injeção split 1:10 e volume de injeção de 1 µL. A aquisição dos dados ocorreu no modo SCAM, utilizando razão massa carga (m/z) de 40 a 400. A identificação dos componentes das amostras foi realizada a partir do tempo de retenção e do espectro de massas dos picos detectados. Estes foram comparados com o banco dos espectros da biblioteca National Institute of Standards and Technology (NIST). A identificação foi confirmada por comparação de dados obtidos para o gênero na literatura científica e cromatograma característico descrito para as espécies de copaíba (Veiga Junior et al., 2002; Albuquerque et al., 2017; Trindade, et al., 2018; Lima, et al., 2020; Lima et al., 2021).

4.6 Desenvolvimento de método analítico para quantificação de marcador químico no óleo resina de *Copaifera officinalis* L.

Para o desenvolvimento de método analítico para quantificação de marcador químico do óleo resina de *C. officinalis* foi utilizado o óleo de manufatura 09/2021 comercializado pela empresa Beraca. O desenvolvimento e validação do método foi realizado em cromatógrafo a gás (Shimadzu GC-2030), com injetor AOC – 6000 auto sampler; acoplado a detector de massas (Shimadzu GCMS-QP2020 NX), analisador de massas do tipo quadrupolo.

A validação do método analítico desenvolvido foi realizada de acordo com as diretrizes da RDC n.166, de 24 de Julho de 2017 (BRASIL, 2017), além de referências internacionais, capítulo geral <621> da United States

Pharmacopoeia (USP) e os guias: AOAC-Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals (2002) e FDA-Validation of Chromatographic Methods (1994).

4.6.1 Preparo das soluções

4.6.1.1 Solução amostra de óleo resina de *Copaifera officinalis* L.

Preparou-se uma solução pipetando 1 μL de óleo resina de *C. officinalis* em 1000 μL de hexano grau HPLC diretamente no vial de injeção líquida de CG-EM. O vial foi submetido a homogeneização em equipamento vortéx por 1 min.

4.6.1.2 Preparo da solução padrão de β -cariofileno

Preparou-se uma solução pipetando 1 μL do padrão de β -cariofileno em 1000 μL de hexano grau HPLC diretamente no vial de injeção líquida de CG-EM. O vial foi submetido a homogeneização em equipamento vortéx por 1 min.

4.6.1.3 Preparo da solução estoque de padrão de β -cariofileno

Para solução estoque prepararam-se soluções com 5mL de hexano grau HPLC em balão volumétrico de 10mL, em seguida adicionaram-se 14 μL da SQR β -cariofileno. O balão foi submetido a banho ultrassônico por 5 minutos para completa solubilização. Após o tempo, o volume foi completado no balão até o menisco com hexano e submetido a banho ultrassônico por mais 5 minutos.

4.6.1.4 Solução da SQR de β -cariofileno para adequabilidade do sistema

Preparou-se uma solução da SQR de β -cariofileno a 100%; pipetando 714 μL de solução estoque de padrão de β -cariofileno diretamente para o vial de injeção líquida de CG-EM e adicionou-se 286 μL de hexano grau HPLC. O vial foi submetido a homogeneização em equipamento vortéx por 1 min.

4.6.1.5 Preparo do diluente

Para o preparo do diluente pipetaram-se 1000 μL de hexano grau HPLC diretamente para vials de 2 mL de análise por CG-EM.

4.6.2 Desenvolvimento das condições cromatográficas

As condições cromatográficas de análise do método analítico quantitativo para o óleo resina de *C. officinalis* foram desenvolvidas a partir das condições cromatográficas previamente descritas por Acácio (2020), sendo denominado condição A (item 4.3.2). Para isso, foram realizadas modificações no método denominadas de condições B e C, respectivamente, até a definição da condição cromatográfica final, considerada adequada para análise quantitativa do marcador químico no óleo resina de *C. officinalis* L. As modificações realizadas implicaram em alterações da rampa de temperatura e variação nos tempos de manutenção da temperatura final de 280 °C; acarretando melhor resolução dos picos cromatográficos e alteração do tempo de corrida cromatográfica. As condições cromatográficas avaliadas nas condições A, B, C e D estão apresentadas na Tabela 10.

Tabela 10 – Condições cromatográficas A, B, C e D do método analítico por CG-EM desenvolvido para quantificação do β -cariofileno no óleo resina de *Copaifera officinalis* L.

PARÂMETRO	CONDIÇÃO A	CONDIÇÃO B	CONDIÇÃO C	CONDIÇÃO D
Temperatura do forno	Inicial: 60 °C Rampa: 3 °C/min a 200 °C; 15 °C/min a 280 °C Final: 280 °C 20min	Inicial: 60°C Rampa: 4°C/min a 200°C; 15°C/min a 280°C Final: 280 °C 10min	Inicial: 60°C Rampa: 4 °C/min a 200 °C; 15 °C/min a 280 °C Final: 280°C 5min	Inicial: 65°C Rampa: 4 °C/min a 200 °C; 15 °C/min a 280 °C Final: 280 °C 5min
Temperatura do injetor	250 °C	250 °C	250 °C	250 °C
Temperatura da fonte de íons	250 °C	250 °C	250 °C	250 °C
Temperatura da interface	250 °C	250 °C	250 °C	250 °C
Tempo de corrida cromatográfica	70 min	50 min	45 min	44 min

Fonte: desenvolvida pela autora.

De acordo com os resultados obtidos, a condição cromatográfica C foi definida como condição final. A fim de se comprovar adequabilidade do sistema em relação aos parâmetros necessários para método analítico; foram realizadas

injeções em triplicata da amostra de óleo resina de *C. officinalis* e da SQR β -cariofileno (Sigma Aldrich, Alemanha). Calculou-se a média e o desvio padrão relativo (DPR) da porcentagem de área sob o pico e tempo de retenção das análises de ambas amostras; avaliando-se a repetibilidade. Avaliou-se a reprodutibilidade da eluição dos constituintes do óleo resina por meio do tempo de retenção, resolução dos picos, porcentagens de área e identificação pela biblioteca do software; comparando os dados obtidos com o levantamento da literatura dos constiuintes do óleo resina para o gênero e espécie.

4.7 Validação do método analítico para quantificação de β -cariofileno no óleo resina de *Copaifera officinalis* L.

A validação do método analítico desenvolvido foi realizada conforme preconizado nas legislações (item 4.4); realizando-se diversas corridas cromatográficas correlacionadas à análises estatísticas dos dados obtidos, com objetivo de comprovar que o método quantitativo por CG-EM desenvolvido permite a quantificação do marcador químico β -cariofileno no óleo resina de *C. Officinalis*.

Avaliou-se os seguintes parâmetros de validação: adequabilidade do sistema, seletividade, linearidade, limites de detecção e quantificação, intervalo, precisão, exatidão e robustez. Cada um destes parâmetros foram avaliados conforme os critérios estabelecidos no Quadro 1. Os dados das análises foram adquiridos no programa LabSolution GCMSsolution 4.50 SP1 (Shimadzu, Japão). E estes foram submetidos à análises estatísticas realizadas nos programas Microsoft Excel e GraphPad Prim 8.

Quadro 1 – Critérios dos parâmetros de validação analítica do método por CG-EM para quantificação do marcador químico β -cariofileno no óleo resina de *C. officinalis*.

PARÂMETRO	CRITÉRIO
Adequabilidade do sistema	<ul style="list-style-type: none"> – Avaliação dos parâmetros: fator de retenção (k), número de pratos teóricos (N), fator de cauda (T), resolução (R); – $T < 2,0$ e $N > 2000$ (FDA, 1994). – Média e desvio padrão relativo (DPR) das áreas sob o pico e tempos de retenção; $DPR \leq 2\%$ (USP, 2017).
Intervalo	<ul style="list-style-type: none"> – Limite de quantificação superior e inferior devem ser $\leq 60\%$ e $\geq 140\%$ da concentração teórica do analito na amostra.
Linearidade	<ul style="list-style-type: none"> – Representação gráfica das respostas em função da concentração do marcador químico; – Equação da reta de regressão de y em x, estimada pelo método dos mínimos quadrados. – Coeficiente correlação (r) $> 0,990$. – Coeficiente determinação (r^2) de Pearson $\geq 0,98$. – Coeficiente angular significativamente diferente de zero.
Seletividade	<ul style="list-style-type: none"> – Não apresentar interferentes no tempo de retenção (TR) do marcador químico na presença de componentes que possam estar presentes na solução amostra, como o diluente e a fase móvel. – Avaliação do efeito matriz: os coeficientes angulares das curvas de calibração construídas com a SQR do analito em solvente e com a amostra fortificada com a SQR do analito devem ser estatisticamente semelhantes ($p > 0,05$). – O perfil cromatográfico da <i>solução amostra</i> deve ser semelhante ao perfil cromatográfico característico do gênero <i>Copaifera</i> sp.
Limite de Detecção	<ul style="list-style-type: none"> – Menor quantidade do analito presente na amostra que pode ser detectado em 3 curvas de calibração; – Calculado pela fórmula: $LD = \frac{3,3 \times \sigma}{IC}$ <p>Em que, σ: desvio padrão; IC: inclinação da curva de calibração.</p>
Limite de Quantificação	<ul style="list-style-type: none"> – Menor quantidade do analito determinado com precisão e exatidão em 3 curvas de calibração; – Calculado pela fórmula: $LQ = \frac{10 \times \sigma}{IC}$ <p>Em que, σ: desvio padrão; IC: inclinação da curva de calibração.</p>
Exatidão	<ul style="list-style-type: none"> – Avaliação da recuperação da SQR em três níveis de concentração da curva analítica; – Recuperação determinada, empregando a fórmula: $\frac{CA}{CTA} \times 100$ <p>Sendo, CA: Concentração experimental do analito CTA: Concentração teórica do analito</p>

PARÂMETRO	CRITÉRIO
Precisão	<ul style="list-style-type: none"> – Avaliação da repetibilidade e precisão intermediária, em seis soluções amostra a 100% da concentração da substância a ser quantificada, individualmente preparadas; – Cálculo do desvio padrão relativo (DPR) da série de medições, conforme a fórmula: $DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100$; em que, DP: desvio padrão; CMD: concentração média determinada; – Desvio padrão relativo $\leq 5\%$.
Robustez	<ul style="list-style-type: none"> – Resultado de análise semelhante, utilizando colunas de fabricante e lotes diferentes; – Resultado de análise semelhante alterando a temperatura do forno; – Resultado de análise semelhante alterando a velocidade do gás de arraste; – Resultado da análise semelhante quando utilizado equipamento de outro marca.

4.7.1 Adequabilidade do sistema (*System Suitability*)

A análise da adequabilidade do sistema foi realizada verificando-se os parâmetros: fator de retenção (k), número de pratos teóricos (N), fator de cauda (T), resolução (R), e desvio padrão relativo (DPR) entre as áreas sob o pico e os tempos de retenção do marcador no padrão de referência e amostra. A análise foi realizada na condição cromatográfica C (item 4.4.2) utilizando solução da SQR β -cariofileno na concentração de 100% (item 4.6.1.4); conforme faixa de trabalho de 60% a 140% estabelecida no presente trabalho.

Os dados foram calculados/obtidos pelo programa LabSolution GCMSsolution 4.50 SP1 (Shimadzu, Japão) de acordo com as equações recomendadas pela The United States Pharmacopoeia (USP) (USP, 2017), e o DPR das áreas e tempo de retenção foram calculadas utilizando o programa Microsoft Excel. A adequabilidade do sistema foi avaliada antes do início de cada sequência cromatográfica e foi realizado a comparação dos dados obtidos de cada análise, verificando-se a reprodutibilidade.

4.7.2 Intervalo para determinação da linearidade do método para quantificação de β -cariofileno no óleo resina de *Copaifera officinalis*.

É a faixa de trabalho estabelecida pela linearidade, juntamente com os resultados de precisão e exatidão. De acordo com o preconizado na RDC 166 (BRASIL, 2017) métodos para a determinação de teor é recomendado o intervalo mínimo de 80% a 120%, utilizando no mínimo cinco concentrações diferentes da SQR.

Diante disso, visando quantificar o marcador químico β -cariofileno, no óleo resina de *C. officinalis* no presente estudo utilizou-se a faixa de trabalho: 60%, 80%, 100%, 120% e 140% (Tabela 11); referentes a concentração de β -cariofileno no óleo resina de *C. officinalis* calculadas a partir da quantidade do analito estimada através da área sob pico/concentração obtidas das análises realizadas em triplicata para determinação da condição cromatográfica (item 4.6.2).

Tabela 11 - Faixa e concentração de trabalho estabelecida para o método analítico de quantificação de β -cariofileno no óleo resina de *Copaifera officinalis*.

Concentração de Padrão	
%	$\mu\text{g/mL}$
60,0	276
80,0	368
100,0	460
120,0	552
140,0	644

Método cromatográfico C, item 4.6

4.7.2.1 Procedimento

Foram preparadas em triplicata soluções da SQR β -cariofileno, independentes, conforme item 4.6.1.3. Essas foram transferidas para vials de análise em CG-EM conforme a concentração da faixa de trabalho estabelecida; 60%, 80%, 100%, 120% e 140% (Tabela 11). Injetaram-se um única vez cada uma das soluções, nas condições cromatográficas definidas no método quantitativo C, conforme item 4.4.2; obtendo-se a resposta analítica relacionada à concentração de β -cariofileno.

As respostas analíticas obtidas foram avaliadas quanto à relação linear com a concentração do analito; verificando-se a linearidade das respostas obtidas (item 4.5.2). A exatidão e a precisão foram avaliadas por análise dos cromatogramas obtidos, calculando-se a média e o DPR (%) do tempo de retenção e área do marcador químico β -cariofileno.

4.7.3 Linearidade: construção da curva de calibração da substância química de referência β -cariofileno

Para demonstrar a capacidade do método analítico desenvolvido de gerar respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração do marcador químico β -cariofileno no óleo resina de *C. officinalis* utilizou-se cinco concentrações diferentes da SQR; 60%, 80%, 100% 120% e 140% preparadas em triplicata, a partir de três soluções estoques independentes; construindo-se a faixa de trabalho. Todos os cálculos para a avaliação da linearidade foram realizados a partir das respostas analíticas individuais de cada concentração da faixa de trabalho e dos dados de concentrações reais.

4.7.3.1 Preparo das Soluções

- **Solução padrão estoque de β -cariofileno:** conforme item 4.6.1.3.
- **Diluyente:** conforme item 4.6.1.5

4.7.3.2 Procedimento

As soluções de SQR estoque foram preparadas em triplicata e transferidas para vials de análise de CG-EM de acordo com os volumes/concentração de β -cariofileno calculados conforme a faixa de trabalho; 60%, 80%, 100% 120% e 140% (Tabela 12). Injetaram-se uma única vez cada uma das soluções de concentração predefinida, obtendo-se assim uma curva analítica de calibração.

Tabela 12 – Preparo das soluções de SQR β -cariofileno conforme faixa de concentração de trabalho de *Copaifera officinalis*.

Concentração de Padrão		Aliquota da solução SQR estoque (μL)	Volume de solvente adicionado (μL)
%	$\mu\text{g/mL}$		
60,0	276	429	571
80,0	368	571	429
100,0	460	714	286
120,0	552	856	144
140,0	644	1000	0

As respostas analíticas foram avaliadas, por meio da representação gráfica em função da concentração do marcador químico β -cariofileno. A análise da regressão linear foi realizada pelo método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO); o modelo foi avaliado quanto sua adequação para ser utilizado; por meio do cálculo das variâncias (teste de Cochran). A verificação da linearidade dos dados obtidos foi realizada por análise de variância (ANOVA), avaliando a significância do coeficiente angular por meio do teste F; coeficiente correlação (r) > 0,990 e coeficiente determinação (r^2) de Pearson \geq 0,98. Essas análises estatísticas foram realizadas utilizando os programas Microsoft Excel e GraphPad Prim 8.

4.7.4 Seletividade

A seletividade do método foi verificada por meio do efeito matriz, avaliando-se se a matriz complexa do óleo resina de *C. officinalis* interfere na quantificação do marcador químico β -cariofileno. Assim como, a presença de impurezas, influência do diluente, se há componentes eluídos em mesmo tempo de retenção da SQR e avaliação dos cromatogramas obtidos comparando-os ao descrito na literatura científica como característico do gênero *Copaifera*.

4.7.4.1 Efeito Matriz

O parâmetro foi determinado por comparação do coeficiente angular da curva de calibração construída com a SQR β -cariofileno (linearidade), com o coeficiente

angular da faixa de trabalho do óleo resina de *C. officinalis* fortificada com a SQR. Foi analisado o paralelismo entre as retas visualmente por meio da representação gráfica e análise estatística dos coeficientes angulares das retas obtidas; que indica a ausência de efeito matriz na quantificação da SQR.

Ambas as curvas foram estabelecidas igualmente para os níveis de concentração. Utilizando-se cinco concentrações; 60%, 80%, 100%, 120% e 140%; preparadas a partir de três soluções estoque independentes. Para obtenção da curva analítica do efeito matriz, as soluções foram preparadas conforme apresentado a seguir e as amostras para análise conforme Tabela 13.

4.7.4.1.1 Preparo das Soluções

- **Solução amostra de óleo resina de *C. officinalis* L.:** conforme item 4.6.1.1
- **Solução padrão estoque da SQR β -cariofileno:** conforme item 4.6.1.3
- **Solução amostra contaminada com SQR:** pipetaram-se 1 μ L de óleo resina de *Copaifera officinalis* diretamente para cada vial conforme Tabela 13.
- **Diluyente:** conforme item 4.6.1.5

Tabela 13 – Preparo da solução amostra de óleo resina de *C. officinalis* fortificada com SQR conforme intervalo de linearidade, 60-140%.

Concentração de SQR		Aliquota da solução SQR estoque (μ L)	Volume de solvente adicionado (μ L)	Volume de OR* adicionado (μ L)
%	μ g/mL			
60,0	276	429	571	1
80,0	368	571	429	1
100,0	460	714	286	1
120,0	552	856	144	1
140,0	644	1000	0	1

*OR: óleo resina de *C. officinalis*.

4.7.4.1.2 Procedimento

Prepararam-se em triplicata a solução de SQR estoque (item 4.6.1.3), que foram transferidas de acordo com os volumes estabelecidos na Tabela 13 para cada solução preparada diretamente para vials de análise de CG-EM. Prepararam-se

uma solução da amostra conforme item 4.6.1.1 e diluente (item 4.6.1.5). Injetaram-se um única vez cada uma das soluções na sequência: diluente, solução amostra, e soluções SQR conforme linearidade (item 4.5.2). Posteriormente, a obtenção da curva de calibração, injetou-se as soluções amostras fortificadas com a SQR.

Os cromatogramas obtidos foram analisados, observando-se se havia componentes eluídos no mesmo tempo de retenção do marcador químico β -cariofileno (SQR), assim como, ocorrência de sobreposição de picos eluídos. Avaliou-se o paralelismo entre as retas da curva de calibração da linearidade e a reta da curva analítica obtida das análises da amostra fortificada com SQR β -cariofileno. O paralelismo entre as retas das respostas analíticas obtidas, foi avaliado visualmente por gráfico e confirmado por análise do coeficiente angular das duas retas no programa GraphPad Prim 8.

4.7.5 Limite de detecção de β -cariofileno no óleo resina de *C. officinalis*

O limite de detecção é a menor quantidade do analito β -cariofileno (SQR), que pode ser detectado nas condições cromatográficas desenvolvidas e foi determinado por meio da curva de calibração da linearidade; calculando o limite aplicando-se a fórmula:

$$LD = \frac{3,3 \times \sigma}{IC}; \text{ onde } \sigma \text{ é o desvio padrão e IC é a inclinação da curva de calibração.}$$

4.7.5.1 Procedimento

Prepararam-se em triplicata a solução SQR estoque de β -cariofileno, que foi transferido para vials de análise em CG-EM nos volumes/concentração conforme faixa de trabalho estabelecida; 60%, 80%, 100%, 120% e 140% (Tabela 11). Injetaram-se um única vez cada uma das soluções, nas condições cromatográficas definidas no método quantitativo C, conforme item 4.6.2; obtendo-se a curva de calibração analítica.

A linearidade dos dados obtidos foi analisada conforme item 4.7.5; a partir da obtenção da curva de calibração, os desvio padrão e a inclinação da curva que

foram calculados estatisticamente nos programas Microsoft Excel e GraphPad Prim 8. Aplicando-se a fórmula descrita anteriormente, obteve-se o limite mínimo de β -cariofileno que o método analítico desenvolvido permite ser detectado.

4.7.6 Limite de quantificação de β -cariofileno no óleo resina de *C. officinalis*

O limite de quantificação é a menor quantidade do analito β -cariofileno, que pode ser determinado com precisão e exatidão aceitáveis na amostra de óleo resina de *C. Officinalis*. Este foi determinado com base na curva de calibração analítica construída com a solução padrão de SQR β -cariofileno, na faixa de trabalho estabelecida; 60%, 80%, 100%, 120% e 140%. Sendo o limite de quantificação calculado através da fórmula: $LQ = \frac{10 \times \sigma}{IC}$, onde σ é o desvio padrão e IC a inclinação da curva de calibração.

4.7.6.1 Procedimento

Prepararam-se em triplicata a solução SQR estoque de β -cariofileno, que foi transferida para vials de análise em CG-EM nos volumes/concentração conforme faixa de trabalho estabelecida; 60%, 80%, 100%, 120% e 140% (Tabela 11). Injetaram-se um única vez cada uma das soluções, nas condições cromatográficas definidas C no método quantitativo conforme item 4.6.2; obtendo-se a curva de calibração analítica.

A partir da obtenção da curva analítica de calibração, foram calculados os desvios padrão e a inclinação da curva pelos programas Microsoft Excel e GraphPad Prim 8. Após obtenção destes dados, aplicou-se a fórmula descrita anteriormente (item 4.7.6); obtendo-se o limite de quantificação mínimo de β -cariofileno que o método analítico desenvolvido permite quantificar.

4.7.7 Precisão

Visando avaliar a proximidade entre os resultados de análises consecutivas; expressa por meio da repetibilidade, precisão intermediária ou da

reprodutibilidade; foram avaliadas seis réplicas de solução do óleo resina de *C. officinalis* a 100%. Posteriormente, foi analisado a dispersão dos resultados obtidos por meio do cálculo da média e desvio padrão relativo (DPR).

A repetibilidade foi avaliada pela análise das seis amostras de solução do óleo resina de *C. officinalis* a 100%, preparadas individualmente, analisadas sob as mesmas condições cromatográficas, condição C (definida no método analítico item 4.4.2), em uma única corrida cromatográfica, por um analista (A1) utilizando o mesmo equipamento cromatógrafo a gás, no denominado dia D1.

A precisão intermediária foi avaliada utilizando seis amostras de solução do óleo resina de *C. officinalis* a 100%, preparadas individualmente, sob a condição cromatográfica desenvolvida, condição C (item 4.6.2); por um segundo analista (A2), no denominado dia D2 (dia diferente da realização da repetibilidade); em uma única corrida cromatográfica, utilizando o mesmo equipamento cromatógrafo a gás.

4.7.7.1 Preparo das Soluções

- **Solução SQR β -cariofileno:** conforme item 4.6.1.2
- **Soluções amostras de óleo resina de *C. officinalis*:** conforme item 4.6.1.1

4.7.7.2 Procedimento

Prepararam-se uma solução padrão de β -cariofileno e seis soluções amostras de óleo resina de *C. officinalis*. Foi injetado no cromatógrafo a gás seis vezes as soluções SQR β -cariofileno preparadas em uma única vez para cada amostra de óleo resina de *C. officinalis* a 100%. Este procedimento foi realizado em um dia D1 pelo analista 1 (A1), repetibilidade; e realizado no dia D2 por um segundo analista (A2), precisão intermediária.

Os cromatogramas obtidos de ambas as análises; repetibilidade (D1, A1) e precisão intermediária (D2, A2), foram avaliados quanto a reprodutibilidade, sendo observado o perfil químico obtido, componentes detectados, tempo de

retenção, área (mil/porcentagem) e o teor do componente majoritário, marcador químico β -cariofileno. A partir dos dados das séries de repetição de medições, foi calculado a média e o desvio padrão relativo (DPR), que deve ser $\leq 5\%$.

4.7.8 Exatidão

Para determinação de analitos em matrizes complexa, como insumos de origem vegetal, a análise deve ser realizada pelo método de adição do padrão, em que quantidades conhecidas da SQR acrescentadas à amostra.

A exatidão foi verificada a partir de nove determinações, contemplando o intervalo linear do método analítico, nas concentrações de 60% (baixa), 100% (média) e 140% (alta); cada uma em triplicata, preparadas de maneira independentes, utilizando soluções diluídas da solução estoque da SQR, β -cariofileno. A exatidão foi calculada em função da porcentagem de recuperação de β -cariofileno nas amostras de solução do óleo resina de *C. Officinalis*. Os resultados foram analisados conforme preconizado pelo guia AOAC-Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals (2002).

4.7.8.1 Preparo das Soluções

- **Solução amostra de óleo resina de *C. officinalis*:** pipetaram-se 0,50 μL de óleo resina de *C. officinalis* para vial de análise de CG-EM, adicionaram-se 999,50 μL de hexano grau HPLC (diluente). A solução foi homogeneizada em equipamento vórtex por 1 minuto.
- **Solução estoque da SQR β -cariofileno:** conforme item 4.6.1.3
- **Solução amostra de óleo resina de *C. officinalis* fortificada 60,0%:** pipetaram-se 0,50 μL de óleo resina de *C. officinalis* para vial de análise de CG-EM, adicionaram-se 71,40 μL de solução estoque de SQR β -cariofileno e

928,10 μL de hexano grau HPLC (diluyente). A homogeneização da solução foi realizada em equipamento vórtex por 1 minuto.

- **Solução amostra de óleo resina de *C. officinalis* fortificada 100,0%:** pipetaram-se 0,50 μL de óleo resina de *C. officinalis* para vial de análise de CG-EM, adicionaram-se 357 μL de solução estoque de SQR β -cariofileno e 642,50 μL de hexano grau HPLC (diluyente). A solução foi homogeneizada em equipamento vórtex por 1 minuto.
- **Solução amostra de óleo resina de *C. officinalis* fortificada 140,0%:** pipetaram-se 0,50 μL de óleo resina de *C. officinalis* para vial de análise de CG-EM, adicionaram-se 642,60 μL de solução estoque de SQR β -cariofileno e 356,90 μL de hexano grau HPLC (diluyente). A solução foi homogeneizada em equipamento vórtex por 1 minuto.

4.7.8.2 Procedimento

Prepararam-se em triplicata independentes soluções estoque de SQR β -cariofileno e a partir dessas foram transferidos os volumes necessários para preparo das soluções amostras fortificadas; 60%, 100% e 140% e uma solução amostra de óleo resina de *C. officinalis*.; ambas conforme preparo de soluções (item 4.5.8.1). Em seguida injetaram-se no cromatógrafo a gás acoplado ao espectro de massa a solução amostra de óleo resina de *C. officinalis*, e uma única vez cada solução amostra fortificada.

Os cromatogramas obtidos das análises foram avaliados quanto ao perfil químico obtido, sendo comparado os cromatogramas obtidos de cada nível de concentração das amostras fortificadas com a concentração conhecida da SQR, β -cariofileno, baixa (60%), média (100%) e alta (140%) com o cromatograma obtido da análise da solução amostra de óleo resina de *C. Officinalis*. Para as análises, foram observados a reprodutibilidade entre as triplicatas e a relação linear da curva analítica obtida. As análises estatísticas foram realizadas no programa Microsoft Excel. A taxa de recuperação (%) foi calculada por meio da

fórmula: $R = \frac{CA}{CTA} \times 100$; onde, CA: Concentração experimental do analito e CTA: Concentração teórica do analito.

4.7.9 Robustez

Para indicar a capacidade do método analítico desenvolvido à resistir a pequenas variações das condições analíticas foi delineado experimentos com repetições de análises; em triplicata, para isso utilizaram-se solução SQR β -cariofileno e solução amostra de óleo resina de *C. officinalis* L. nas condições cromatográficas C (item 4.4.2) e nas condições alteradas preconizadas para técnica de cromatografia gasosa na RDC 166/2017; conforme Tabela 14.

Tabela 14 – Variações do método cromatográfico por CG-EM realizadas para estudo da robutez no método analítico de solução do óleo resina de *Copaifera officinalis*.

Parâmetro	Condição original	Condição alterada
Coluna	Lote 1: 1650813 Fabricante 1: Shimadzu	Lote 2: USR282321H Fabricante 2: Agilent Technologies
Temperatura do forno	60,00 °C	60,10 °C
Fluxo do gás de arraste	1,60 mL/min	1,61mL/min
Dissolução	Ultrassom 5,0 min	Sem ultrassom

4.7.9.1 Preparo das soluções

- **Solução SQR de β -cariofileno:** conforme item 4.6.1.2
- **Solução amostra de óleo resina de *C. officinalis*:** conforme item 4.6.1.1

4.7.9.2 Procedimento

Prepararam-se três soluções SQR de β -cariofileno e três soluções amostra de óleo resina de *C. officinalis* em vials independentes. Todas as amostras foram injetadas no cromatógrafo gasoso em uma única corrida cromatográfica nas condições iniciais do método desenvolvido (condição C); e em outra corrida analítica com as condições alteradas, conforme Tabela 14.

Os cromatogramas das amostras de óleo resina de *C. officinalis* obtidos da análise nas condições cromatográficas C foram comparados com os obtidos das análises com as condições alteradas; observando-se o perfil químico obtido, comparando-os com o cromatograma característico do gênero descrito na literatura científica, assim como, reprodutibilidade do método quanto aos componentes detectados. Também foram avaliados a área, o tempo de retenção e teor da SQR β -cariofileno em todas as amostras de óleo resina de *C. Officinalis*, comparando os resultados obtidos entre as condições cromatográficas. As soluções SQR β -cariofileno foram avaliadas quanto ao tempo de retenção de eluição do componente. Para os resultados obtidos foram calculados média e desvio padrão relativo (DPR).

4.8 Desenvolvimento de formulação farmacêutica de óleo resina de *Copaifera officinalis*

4.8.1 Estudos de pré-formulação

4.8.1.1 Seleção de excipientes grau farmacêutico

Inicialmente foi realizado um levantamento na literatura de excipientes utilizados em estudos de formulações contendo óleo resina de copaíba. Foram utilizadas as bases científicas: ScienceDirect, Pubmed (Medline), SciELO e Google Scholar. A busca foi realizada em inglês, utilizando as palavras-chaves: “copaiba resin oil formulations”, “copaiba resin oil topical formulations”, “copaiba resin oil emulsions” e “copaiba oil formulation”. Os artigos encontrados forneceram informações sobre a porcentagem de óleo resina da copaíba usualmente utilizada no desenvolvimento de formulações tópicas e excipientes. Em um primeiro momento os artigos foram selecionados de acordo com título e resumo. Em um segundo momento os artigos selecionados foram lidos na íntegra e as informações de interesse foram compiladas em tabelas. Na sequência foi realizada uma segunda busca na literatura nas mesmas bases de dados buscando correlacionar as formulações contendo óleo resina de copaíba e os efeitos farmacológicos obtidos, considerando a eficácia e segurança, tanto em estudos *in vitro*, *in vivo* e em humanos. Os

artigos e informações de interesse foram separados e compilados em tabelas e analisados na sequência.

4.8.1.2. Avaliação da solubilidade do óleo resina de *Copaifera officinalis* em diferentes excipientes

Por motivo de confidencialidade da tecnologia, que está em desenvolvimento para futuro patenteamento, a matéria sensível não será revelada no presente trabalho. Ao longo do presente trabalho todos os excipientes utilizados foram codificados e referenciados por X1 a X13. Após revisão da literatura, foram selecionados quatro excipientes (Tabela 15) para avaliação da solubilidade do óleo resina de copaíba, de acordo com o teste descrito na Farmacopeia Brasileira 6ª edição (2019). A avaliação foi conduzida à temperatura ambiente (25 ± 5 °C), com etapa de homogeneização em banho ultrassônico; sendo os perfis de solubilização analisados nos tempos 2, 5 e 10 minutos. A solubilidade foi avaliada macroscopicamente por observação a olho nu buscando a identificação de separação de fases entre o óleo resina e os excipientes selecionados.

Tabela 15 - Especificações e codificação dos excipientes selecionados para avaliação da solubilidade do óleo resina de *Copaifera officinalis*.

Excipientes	Função farmacotécnica	Faixa usual para aplicação tópica
X8	Emoliente	1,0 – 10,0
X10	Emulsificante	0,5 – 10,0
X12	Umectante	≈ 15
X5	Carreador de ativos	Até 10%

4.8.2 Desenvolvimento das formulações

A partir dos resultados obtidos na avaliação da solubilidade, foi selecionado o excipiente com maior capacidade de solubilização do óleo resina de copaíba. Os demais excipientes foram selecionados de acordo com a forma farmacêutica pretendida, assim como as características pretendidas para a formulação (Tabela 16).

Tabela 16 - Especificação e codificação dos excipientes selecionados para composição da formulação espuma de óleo resina de *Copaifera officinalis*.

Excipientes	Função Farmacotécnica	Concentração % para aplicação tópica
X1	Veículo/Solvente	-----
X2	Antioxidante	0,0075 – 0,1
X3	Hidratante	0,5 a 5,0
X4	Agente quelante	0,005 a 0,1
X5	Emoliente, solvente e promotor de permeação	Até 10%
X6	Agente formador de filme	Até 25%
X7	Solubilizante e emulsificante polimérico	1,0 – 5,0
X8	Emoliente, solvente e promotor de permeação	1,0 – 10,0
X9	Agente suspensor	Até 5,0
X10	Solubilizante	0,5 – 10,0
X11	Solubilizante e emulsificante polimérico	1,0 – 5,0
X12	Solvente, umectante	≈ 15
X13	Conservante	1,0 – 3,5

Todos os excipientes utilizados foram grau farmacêutico e biocompatíveis com a formulação proposta e via de administração. A concentração do óleo resina na formulação foi determinada com base no levantamento da literatura (item 4.9.1.1), sendo considerados os dados segurança e eficácia. Ao longo do trabalho foram desenvolvidas 12 formulações com óleo resina de copaíba à 20%, duas à 15% e uma formulação com óleo resina de copaíba à 10% p/p. Em todas as formulações foi mantido o excipiente que propiciou a melhor solubilização do óleo. Os demais excipientes foram alterados para otimizar o sensorial e aparência da formulação.

As diferentes combinações e porcentagens (p/p) dos excipientes estão apresentados na Tabela 17. Todas as formulações foram produzidas utilizando o mesmo processo, sem demanda de equipamentos específicos e de alto custo; com o objetivo de facilitar a transposição para a escala industrial. Em resumo, todos os componentes foram pesados em balança analítica e, de acordo com a fase na qual seriam inseridos, foram adicionados no béquer destinado à fase oleosa, onde se encontrava o óleo resina de copaíba (princípio ativo); ou no béquer destinado a fase aquosa, onde se encontravam os excipientes

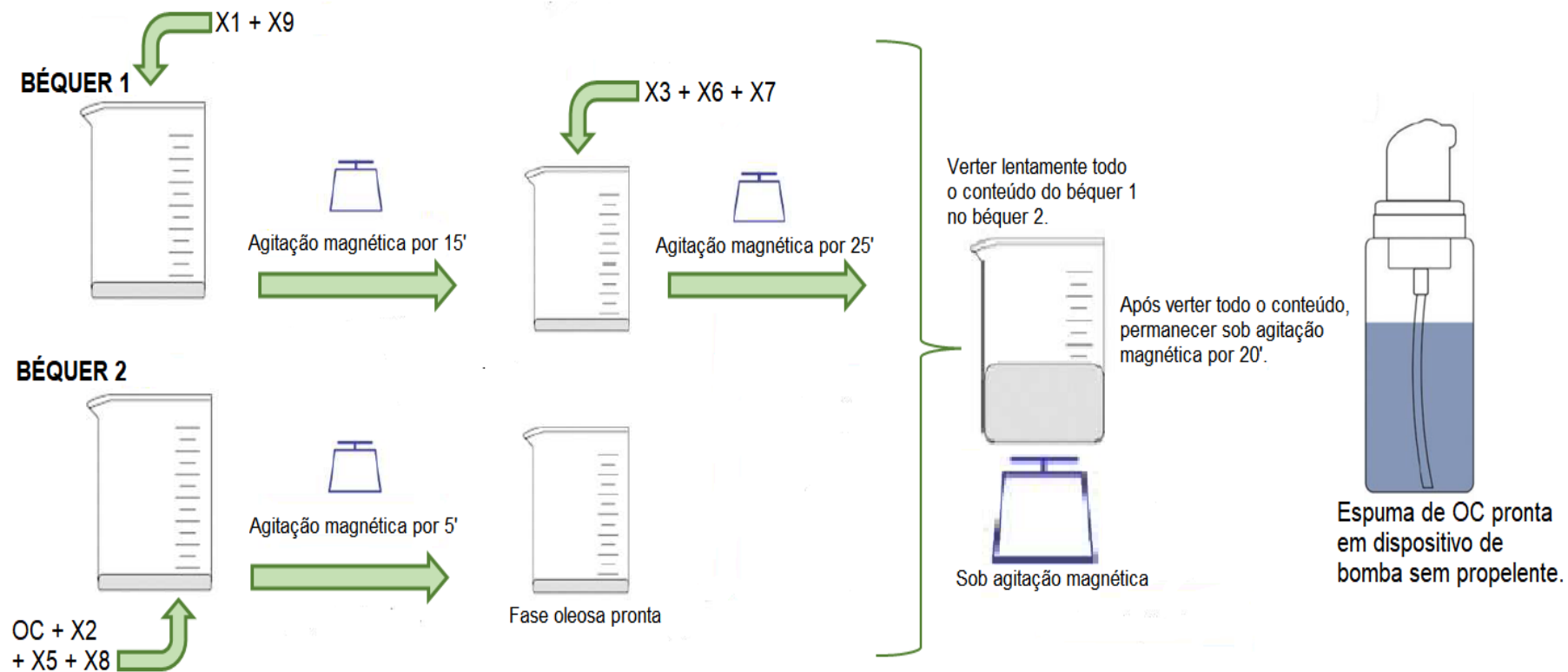
formadores da espuma. Após a pesagem, ambos os béqueres foram submetidos à agitação magnética até solubilização completa de todos os excipientes de cada fase. Na sequência, as fases foram misturadas, conforme processo ilustrado na Figura 11. Todos os lotes produzidos foram de 10 mL.

A melhor formulação foi selecionada de acordo com as características visuais e sensoriais. Durante essa avaliação foram observados a homogeneidade, ausência de precipitados, formação de uma espuma quando aplicada à pele por meio do frasco pump (sem adição de gás propelente), espalhabilidade, viscosidade e estabilidade da espuma. Essas avaliações foram conduzidas para cada formulação produzida após 24h de produção e, a partir dessas avaliações, a composição era analisada para identificação de pontos de melhoria até a obtenção da formulação final.

Tabela 17 – Composição (%p/p) das formulações de espuma (F1 a F15) com óleo resina de *Copaifera officinalis*.

Formulação	ATIVO		EXCIPIENTES												
	Óleo resina de copaíba (%)		X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9	X10	X11	X12	X13
F1	20	q.s.p.	-	-	-	-	-	-	3	5	10	10	-	10	-
F2	20	q.s.p.	0,1	-	-	-	20	-	3	20	10	-	-	-	-
F3	20	q.s.p.	0,1	-	-	-	10	-	3	30	5	-	-	-	-
F4	20	q.s.p.	0,1	-	-	-	20	-	3	20	5	-	-	-	-
F5	20	q.s.p.	0,1	-	-	-	20	-	3	15	5	-	-	-	-
F6	20	q.s.p.	0,1	-	-	-	15	-	3	15	5	-	-	-	-
F7	20	q.s.p.	0,1	-	-	-	10	-	5	10	5	-	-	-	-
F8	20	q.s.p.	0,1	-	-	-	10	-	5	10	9	-	-	-	-
F9	20	q.s.p.	0,1	-	-	-	10	-	5	10	5	-	3	-	-
F10	20	q.s.p.	0,1	-	-	-	10	2	5	10	5	-	3	-	-
F11	20	q.s.p.	0,1	-	-	-	10	1	3	10	7	-	-	-	-
F12	20	q.s.p.	0,1	-	-	-	7	1	3	7	7	-	-	-	-
F13	15	q.s.p.	0,1	-	-	-	7	1	3	7	7	-	-	-	-
F14	15	q.s.p.	0,1	4	-	-	5	1	3	5	7	-	-	-	-
F15	10	q.s.p.	0,1	4	0,1	-	5	1	3	5	7	-	-	-	1

Figura 11 - Fluxograma do processo de produção da espuma de óleo resina de *C. Officinalis*.



Fonte: desenvolvido pela autora.

4.9 Caracterização das propriedades da espuma de óleo resina de *Copaifera officinalis*

Os métodos realizados para a caracterização das propriedades da espuma de *C. officinalis* foram conduzidos conforme preconizado na Farmacopeia Europeia 10ª edição, Farmacopeia Brasileira 6ª edição e informações obtidas na revisão da literatura; todos os experimentos foram realizados em triplicata; utilizando três formulações denominadas FOC1, FOC2 e FOC3; preparadas de forma independente. A Farmacopeia Europeia (Ph. Eur. 10th Edition) preconiza na monografia “espumas medicamentosas” três testes para caracterização de espumas líquidas para aplicação tópica: densidade relativa da espuma, duração da expansão da espuma e esterilidade.

Na avaliação da capacidade de formação da espuma e sua estabilidade são obtidos os seguintes parâmetros: expansão da espuma – EE (%), estabilidade do líquido da espuma – ELE (%) e estabilidade do volume da espuma EVE(%), os quais são especificados nos itens abaixo. A avaliação é realizada pelo método do cilindro, no qual enche-se uma bureta com a espuma, registrando-se o volume inicial de espuma e após 30 minutos. É registrado também o volume de líquido drenado no decorrer deste tempo; e o volume do fluido que forma a espuma antes de se preencher a bureta.

4.9.1 Densidade Relativa da formulação

A Farmacopeia Brasileira 6ª edição (2019) conceitua a densidade relativa como a razão da massa da substância pela massa de igual volume da água, ambas na mesma temperatura. Assim, a densidade relativa (DR) é determinada pela razão m/e ; onde “m” é massa da formulação em gramas, e “e” é a massa do mesmo volume de água em gramas pelo método do picnômetro.

$$DR = \frac{m(\text{formulação})}{m(\text{água})}$$

O experimento foi conduzido em triplicata, utilizando picnômetro limpo e seco de 10mL, previamente calibrado. O picnômetro foi pesado vazio e contendo a amostra, obtendo-se o peso da amostra pela diferença de massa; o mesmo foi realizado com

água destilada. Após obtenção das massas, foi então realizado a razão entre a massa da formulação líquida e a massa da água.

4.9.2 Capacidade da espuma (k)

A capacidade da espuma (K) é uma avaliação macroscópica, na qual se mede a capacidade do fluido em formar uma espuma. É calculada pela razão do volume de espuma formado pelo volume do fluido que forma a espuma.

$$K = V_E/V_L$$

Onde V_E é o volume de espuma e V_L é o volume do líquido que forma a espuma.

4.9.3 Expansão da espuma (espumabilidade/taxa de espuma)

Após inserir a espuma na bureta, conforme descrito no item 4.10, a expansão da espuma é calculada pela seguinte fórmula:

$$EE(\%) = \frac{V_{espuma} - V_{formulação}}{V_{formulação}} \times 100\%$$

4.9.4 Estabilidade do líquido da espuma – ELE

Após inserir a espuma na bureta, conforme descrito no item 4.10, deve-se anotar o volume do líquido drenado ao final de 30 minutos. Os valores obtidos devem ser aplicados na fórmula abaixo para determinar a estabilidade do líquido que forma a espuma. Quanto menor o valor de ELE melhor estabilidade.

$$ELE(\%) = \frac{V_{líquido\ 30\ min}}{V_{formulação}} \times 100\%$$

4.9.5 Estabilidade do volume da espuma – EVE

Após inserir a espuma na bureta, conforme descrito no item 4.10, anotar o volume de espuma inicial ao colocar a formulação na bureta de vidro e o volume de espuma após

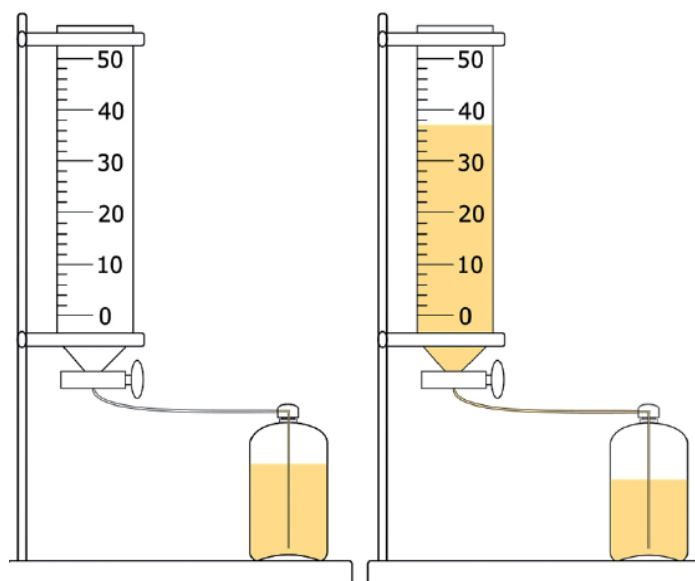
30 minutos e aplicá-los na fórmula abaixo. Este parâmetro indica a taxa de colapso da espuma, logo a relação da estabilidade do volume de espuma é inversamente proporcional a estabilidade da espuma (Falusi, et al., 2022).

$$EVE(\%) = \frac{V_{(espuma \text{ após } 30 \text{ min})}}{V_{espuma}} \times 100\%$$

4.9.6 Tempo de expansão da espuma

O tempo de expansão da espuma da formulação é determinado utilizando-se uma bureta (Figura 12) e cronômetro. Após homogeneização da formulação (agitação por três minutos), foi cronometrado o tempo de preenchimento de 30 mL da bureta; este tempo não pode exceder 5 minutos. O experimento foi realizado em triplicata, para cada formulação produzida, de maneira independente.

Figura 12 – Determinação do tempo de expansão da espuma.



Fonte: Farkas, et al., 2019.

4.9.7 Viscosidade

A viscosidade da forma farmacêutica foi avaliada em um viscosímetro rotacional Brookfield, modelo DV III (Ametek Brookfield, Middleborough, EUA); conforme preconizado na Farmacopeia Brasileira 6ª edição (2019). O equipamento foi

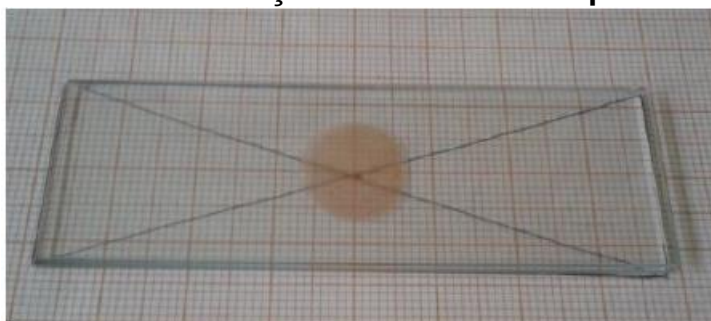
devidamente calibrado e os parâmetros de análise foram programados no *software*, sendo utilizada uma rampa de velocidade de 10 a 150 RPM à temperatura de $23,0 \pm 1,0^\circ$. Após calibração do equipamento e homogeneização da formulação, foram adicionados ao recipiente coletor do aparelho 1,0mL de amostra da formulação. Após a imersão do spindle CP40, o aparelho foi acionado. Os dados foram expressos em Viscosidade (Cp) vs Tensão de cisalhamento (D/cm^2) e Tensão de cisalhamento (D/cm^2) vs Taxa de Cisalhamento (1/sec) utilizando o software Rheocal V3.3 Build 49-1 (Brookfield Engineering Labs).

4.9.8 Espalhabilidade

A espalhabilidade é a força necessária para que o produto seja distribuído sobre a área de interesse. No caso da forma farmacêutica espuma, o objetivo é verificar a área na qual ela é espalhada.

O teste de espalhabilidade foi realizado pelo método da lâmina de vidro, sendo utilizadas duas lâminas de vidro (~ 5,0 gramas cada), uma folha de papel milimetrado e um cronômetro. Na folha de papel milimetrado foi determinado um ponto central, trançando os lados de uma lâmina de vidro e suas diagonais. No centro da lâmina, com o auxílio do desenho feito, a formulação desenvolvida foi borrifada por meio do frasco pump na qual foi envasada. Em seguida foi posicionada suavemente a outra lâmina de vidro (Figura 13).

Figura 13 – Demonstração do método de espalhabilidade.



Fonte: desenvolvido por colaboradores.

Após posicionamento da segunda lâmina de vidro, o cronômetro foi acionado. Decorrido um minuto, o raio médio do círculo formado foi medido e anotado. O raio médio foi medido sempre após um minuto do posicionamento da segunda lâmina de

vidro. As áreas das superfícies foram calculadas utilizando a fórmula: $A = \pi R^2$; onde A é a área, π é 3,14 e R o raio.

4.9.9 pH

O pH de formulações destinadas a aplicação tópica deve ser na faixa de 4,0 a 8,0 para segurança da pele e do produto (Lambers, Hans et al., 2006; Falusi, et al., 2022). Assim, a determinação do pH da espuma foi realizada o auxílio de um medidor de pH (MS Tecnopon medidor de Ph Mpa210, Brasil).

Antes de realizar a medição das amostras, os eletrodos foram lavados com água destilada e enxugados com papel absorvente. Em seguida, foram calibrados com solução tampão padrão de pH 4,0 e pH 7,0. Após calibração, que resultou em 99,10%, os eletrodos foram lavados com água destilada, secos com papel absorvente e imergidos em uma amostra da formulação, sendo a análise conduzida em triplicata. Os valores determinados de leituras de pH não devem variar acima de 0,05 unidade de pH nas três leituras sucessivas.

4.9.10 Avaliação macroscópica

O aspecto macroscópico da formulação foi realizado a partir da observação, à olho nu, de 2mL da formulação disposta em frasco de vidro borossilicato. O frasco foi deixado em repouso nos tempos 0, 10, 20 e 30 minutos, sendo obtidos registros fotográficos com o auxílio de uma câmera pontual.

4.9.11 Avaliação microscópica

A análise microscópica da formulação permite determinar a estrutura e tamanho das bolhas da espuma, uniformidade da espuma através da homogeneidade das bolhas de ar e também a estabilidade da espuma formada. A literatura descreve que a microscopia eletrônica pode ser realizada, podendo ser de transmissão, varredura, emissão e reflexão (Hoc, Dagmara; Haznar-garbacz, Dorota., 2021).

No presente trabalho o aspecto microscópico da formulação foi realizado em microscópio óptico (Zeiss Axio Imager M2, Carl Zeiss Microscopy S.L., Alemanha). Após a homogeneização da formulação, uma gota foi inserida em uma lâmina de vidro e coberta por uma lamínula. Os dados foram obtidos e processados utilizando o *software* ZEN Lite 2012. A estrutura da espuma foi analisada através das imagens microscópicas dos tempos 0, 10, 20 e 30 minutos.

4.10 Identificação do óleo resina de *Copaifera officinalis* veiculado na espuma medicamentosa

Para verificar se houve alterações no óleo resina de *C. officinalis* veiculado na espuma medicamentosa desenvolvida, a formulação foi submetida à partição líquido-líquido com solvente imiscível. O óleo extraído foi analisado por CG-EM, nas condições cromatográficas do método analítico desenvolvido e validado no presente trabalho.

4.10.1 Extração do óleo resina de *Copaifera officinalis* veiculado na espuma medicamentosa

O volume de 10 mL de espuma de óleo de *Copaifera officinalis* foi homogeneizada por agitação, colocada em funil de separação e ao mesmo adicionou-se hexano P.A., agitou-se o funil lentamente até formação de uma única fase. Aguardou-se a separação de fases. Sendo a fase orgânica recolhida e armazenada, e a fase aquosa da formulação colocada novamente no funil de separação para repetição do processo de adição de hexano P.A. por mais duas vezes. Totalizando uma extração líquido-líquido de três vezes com hexano P.A. A fase orgânica recolhida e ajuntada, foi submetida a evaporação do solvente por rotaevaporador e posteriormente centrifugada à vácuo, para concentração do óleo resina de *Copaifera officinalis* extraído da espuma farmacêutica.

4.10.2 Análise por CG-EM do óleo resina de *Copaifera officinalis* extraído da espuma medicamentosa

A fase orgânica foi pesada, e retirada uma alíquota de 1 µL para vial de análise em

CG-EM, ao mesmo foi adicionado hexano grau HPLC, em sequência foi agitado em equipamento de vórtex por 1 minuto. Após completa solubilização, a amostra foi analisada por CG-EM no método analítico desenvolvido e validado no presente trabalho (item 4.4.).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O controle de qualidade de matérias primas de origem vegetal é essencial para garantir a sua autenticidade e pureza; proporcionando segurança e efetividade, para os fitoterápicos, bem como durante o processo tecnológico de desenvolvimento de um novo fitoterápico. A realização de testes de controle qualidade fornecem dados para padronização das espécies, assim como, da droga vegetal. Visto que, a espécie alvo do presente estudo *C. officinalis* não possui monografia na Farmacopeia Brasileira e muitas espécies do mesmo gênero no Brasil são utilizadas como sucedâneas e aplicadas para o mesmo fim terapêutico pela população; torna-se imprescindível a obtenção de parâmetros físico-químicos e fitoquímicos de qualidade, bem como desenvolvimento de métodos analíticos para caracterização qualitativa e quantitativa e posterior padronização do óleo resina de *C. officinalis* garantindo sua autenticidade, ausência de impurezas e adulterantes, assegurando a qualidade em preparações fitoterápicas (Souza, et al., 2017; Acácio, 2020; BRASIL, 2014; BRASIL, 2022).

5.1 Controle de Qualidade: características organolépticas

Como características organolépticas, o óleo resina de *C. officinalis* apresenta-se como líquido transparente, mais ou menos viscoso, de coloração castanho dourado. Com odor característico amadeirado forte, penetrante e persistente. Acácio, 2020 demonstrou que o óleo resina de espécies de copaiba, incluindo, *C. officinalis* apresentaram densidade relativa média de $0,99029 \pm 0,001$, de acordo com o esperado para óleos que são em sua grande maioria menos densos que a água e apresentam densidade na entre 0,84 e 1,18g/mL (Simões et al., 2017).

5.2 Caracterização físico-químicas do óleo resina de de *Copaifera officinalis*

Foram avaliados os parâmetros físico-químicos de solubilidade, densidade e viscosidade do óleo resina de *C. officinalis* utilizado no presente estudo (lote:

8183300APG). As análises visaram estabelecer o controle de qualidade e garantir a autenticidade do óleo.

5.2.1 Solubilidade

O óleo resina de *C. officinalis* apresentou-se solúvel em solventes de baixa a média polaridade, de acordo com teste preconizado pela Farmacopeia Brasileira 6ª edição (2019). Com os solventes hexano, diclorometano e clorofórmio o óleo resina de *C. officinalis* formou soluções homogêneas e límpidas, com ausência de precipitado. De acordo com os resultados, foi insolúvel em metanol, formando solução turva e com precipitado.

Os resultados obtidos corroboram com estudo de Acácio (2020) e está de acordo com dados da literatura científica que descrevem que os óleo resina de espécies de copaíba são solúveis em solventes clorados, como diclorometano e clorofórmio, sendo estes utilizados para solubilização das amostras para a realização dos estudos fitoquímicos, por análises cromatográficas (Cascon, 2000).

5.2.2 Densidade relativa

A densidade relativa do óleo resina de *C. officinalis* foi determinada pelo método do picnômetro conforme preconizado na Farmacopeia Brasileira 6ª edição (2019); descrito no item 4.4.2. A Tabela 18 apresenta os resultados obtidos do experimento realizado em triplicata, à temperatura ambiente.

Tabela 18 – Densidade relativa, pelo método do picnômetro, do óleo resina de *C. officinalis*.

Triplicata	Pi*(g)	Pf**(g)	Densidade Relativa calculada (g/mL)
1	15,8670	26,2266	1,03596
2	16,8888	26,2405	1,00517
3	16,1182	26,2140	1,00958
Média	-----	-----	1,01690
DPR	-----	-----	1,63

*Peso inicial = picnômetro vazio ** Peso final = picnômetro com amostra de óleo resina de *C. officinalis* L.

Fonte: dados do presente estudo.

Conforme apresentado acima, a densidade relativa do óleo resina de *C. officinalis* obtida experimentalmente foi de 1,0117g/mL. De acordo com Silva e colaboradores (2012), a análise físico-química do óleo-resina de espécies de *Copaifera* sp. da região do Tapajós, apresentaram densidade em média de 0,98 g/mL. Em estudo de Acácio (2020), a amostra de óleo resina de *C. officinalis* proveniente da mesma empresa Beraca Ingredientes Naturais S/A; porém de lote e manufatura diferentes, apresentou densidade relativa média de 0,99029g/mL \pm 0,001.

O resultado obtido experimentalmente está dentro da faixa de densidade relativa descrita para óleos, podendo-se inferir que o óleo resina estudado é puro, visto que a mistura com outros óleos e/ou ácidos graxos promovem alterações significativas no valor de densidade; logo confirma-se a ausência de adulterantes e a pureza do óleo resina do presente estudo, conforme laudo da empresa do lote em estudo.

5.2.3 Viscosidade

A análise dos parâmetros físico-químicos, como a viscosidade, em óleos vegetais faz-se necessária para garantir a qualidade e estabilidade deste. Visto que, o óleo vegetal bruto podem conter impurezas como sólidos suspensos, ácidos graxos livres ou umidade; que podem interferir na qualidade do material vegetal. Além disso, a viscosidade é um parâmetro fundamental para caracterização e avaliação da textura do óleo (Brock, et al., 2008; de Moura, C. V. R. et al., 2019; Revista Analítica, 2020).

Conforme objetivo do presente estudo em utilizar o óleo resina de *C. officinalis* L. para o desenvolvimento de formulação farmacêutica destinada a uso tópico, a determinação da viscosidade é de suma importância, pois essa deve ser compatível com a aplicação, além de ser um fator determinante quanto à estética e o sensorial da forma farmacêutica tópica. A viscosidade da matéria prima deve ser avaliada e mantida na faixa desejável para que cumpra a finalidade da aplicação da forma farmacêutica pretendida sem interferir na eficácia e garanta a qualidade da matéria prima utilizada.

A viscosidade do óleo resina de *C. Officinalis* foi determinada utilizando o viscosímetro de Oswald (item 4.4.3), por meio do qual mediu-se o tempo de escoamento da amostra, em triplicata, à temperatura de 20 °C. O líquido de referência ($\mu 2$) foi a água destilada, com densidade obtida de 0,998 g/mL, viscosidade de 1,004, com tempo de escoamento de 50s. Assim obteve-se a viscosidade do óleo resina de *C. officinalis*, conforme demonstrado na Tabela 19.

Tabela 19 – Viscosidade do óleo resina de *C. officinalis* L. obtidos experimentalmente por viscosímetro de Oswald

Triplicata	Tempo escoamento (s)	Densidade (g/mL)	Viscosidade calculada (cP)
1	1251	1,03596	26,0755
2	1257	1,00517	25,4219
3	1253	1,00958	25,4521
Média	1254	1,0170	25,6498
DPR	0,24	1,63	1,44

Fonte: dados do presente estudo.

A literatura descreve para o óleo resina das espécies de *Copaifera* sp. como líquidos, mais ou menos viscosos, não mencionando dado quantitativo para comparação (Rigamonte et al., 2004; Pieri et al., 2009).

Observa-se pelos dados obtidos que o óleo resina de *C. officinalis* apresenta a característica descrita para as espécies do gênero, com um valor de viscosidade mediana, sendo um líquido “mais ou menos” fluido. Em experimentos prévios, Acácio (2020) avaliou a viscosidade de três óleos resina de copaíba, no qual a amostra de óleo resina de *C. officinalis* apresentou viscosidade de $26,1104 \pm 0,63$. Neste estudo, foi observado, visualmente, que o óleo resina apresenta aspecto de média fluidez com viscosidade média de $25,6498 \pm 1,44$. Este resultado permite confirmar que o óleo resina de *C. officinalis* apresenta média viscosidade, quando comparado a outros óleos resina de copaíba. Sendo, possível inferir que há ausência de adulterantes, como ácidos graxos que podem aumentar a viscosidade do óleo.

5.3 Perfil químico e caracterização do óleo resina de *Copaifera officinalis*

A caracterização e obtenção do perfil químico do óleo resina de *C. officinalis* foi obtida por cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia gasosa acoplada ao espectro de massas (CG-EM) a fim de realizar a identidade química dos constituintes da amostra e assim, propor método qualitativo e quantitativo de análise para a espécie, que não possui monografia na Farmacopeia Brasileira 6ª edição (2019).

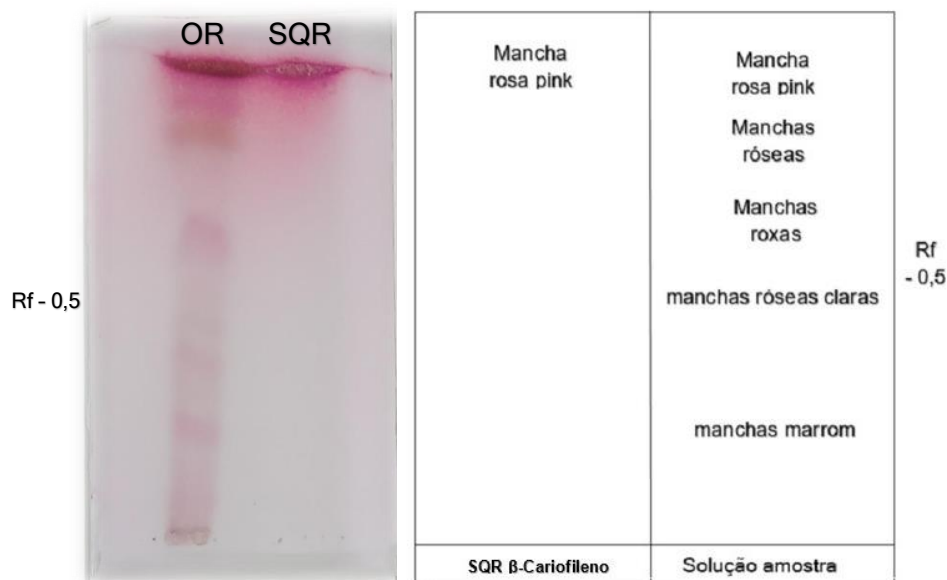
5.3.1 Perfil químico por cromatografia em camada delgada (CCD) do óleo resina de *Copaifera officinalis*

A cromatografia em camada delgada (CCD) é uma técnica que consiste na separação dos constituintes da amostra por meio da diferente migração de cada componente da amostra sobre a fase estacionária adsorvente, aderida a uma superfície plana. Sobre a fase estacionária, se aplica a amostra e a cromatoplaça é submetida ao sistema eluente, fase móvel, constituída de um solvente ou uma mistura de solventes, que irá permear a fase estacionária por capilaridade, permitindo a separação dos componentes da amostra de acordo com sua afinidade pela fase estacionária ou móvel (Silva, et al., 1998; Choze, 2004).

O perfil cromatográfico do óleo resina de *C. officinalis* e da solução SQR de β -cariofileno foi realizado por cromatografia em camada delgada, conforme método descrito em item 4.5.1, e permitiu a análise qualitativa do óleo, observando-se a separação de seus constituintes (Figura 14). O objetivo desta proposta de método foi em uma só cromatoplaça avaliar a parte essencial da amostra, constituída de sesquiterpenos, menos polar e a parte resinosa, constituída por diterpenos ácidos, mais polares. Para isso foi necessário, uma fase móvel que eluisse os dois tipos de constituintes. Assim, a fase móvel definida como sistema eluente foi hexano:clorofórmio:acetato de etila; na proporção de 70:10:20, possibilitou uma melhor seletividade e resolução dos componentes da amostra, sendo observado pelos diferentes fatores de retenção (R_f) das bandas eluídas com diferentes colorações marrom, roxas e róseas detectadas quando a cromatoplaça foi revelada com anisaldeído sulfúrico e aquecimento em chapa a

300 °C.

Figura 14 – Cromatograma do óleo resina de *C. officinalis* e SQR β -cariofileno obtido por CCD em gel de sílica x esquema.



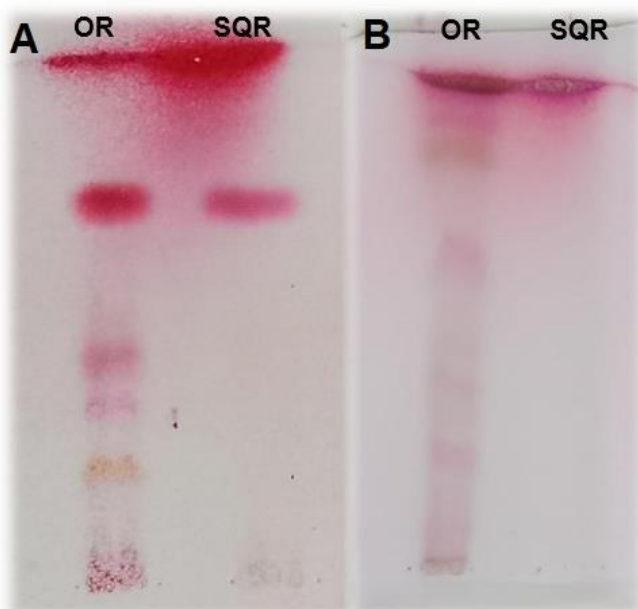
Nota: OR: óleo resina de *C. officinalis* . SQR: solução de β -cariofileno
Diluição das amostras: 10 μ L de óleo em 5mL de diclorometano.
Eluente: hexano: clorofórmio: acetato de etila 70:10:20.
Revelador: solução de anisaldeído sulfúrico.

É possível observar no perfil cromatográfico obtido que os terpenos percorreram a placa de gel de sílica de maneira diferente; de acordo com suas respectivas afinidades; possibilitando a visualização da separação dos constituintes da fração volátil (sesquiterpenos, 15C) e dos componentes da fração resinosa (diterpenoides, 20C). Essa separação pode ser observada pela presença de manchas róseas definidas presentes na região superior da cromatoplaça; com Rf acima de 0,5, inferindo-se a presença dos componentes menos polares, constituintes da fração volátil, confirmada pela detecção SQR β -cariofileno, um sesquiterpeno. As manchas de coloração marrons e roxas de tonalidade mais claras, presentes na região inferior da cromatoplaça, com Rf abaixo de 0,5 indicam a presença dos componentes mais polares, que ficam mais retidos à fase estacionária, os constituintes da fração resinosa, os diterpenos presentes na amostra (Figura 14). Cabe ressaltar que o marcador químico β -cariofileno ficou com Rf alto, o que não é ideal para análises cromatograficas por CCD, mas optamos para ter uma placa com os dois tipos de terpenos da amostra. Iremos, futuramente avaliar o desenvolvimento de um método somente para os

sesquiterpenos, uma vez que são os constituintes majoritários da amostra estudada.

A boa separação dos componentes obtida no método qualitativo proposto pode ser observada por comparação com cromatoplaça obtida em estudo prévio de Acácio (2020), na qual por CCD obteve-se o perfil químico do óleo resina de *C. officinalis* utilizando amostra de óleo resina 0,5 µL diluída em 2000 µL de diclorometano; fase móvel diclorometano 100%, revelador anisaldeído sulfúrico (Figura 15A). Em comparação com o resultado do presente trabalho pode-se observar melhor resolução com separação e detecção de mais manchas (Figura 15B). Além disso, pode-se observar a interferência da diluição da amostra de óleo resina, na qual a definida no método do presente trabalho; 0,10 µL de óleo resina em 5000 µL de diclorometano, propiciou visualização de manchas beme definidas e com boa intensidade em menor concentração.

Figura 15 – Cromatogramas do óleo resina de *C. officinalis* e SQR β -cariofileno obtido por CCD de gel de sílica. A: 0,5 µL de óleo em 2mL diclorometano. Eluente: diclorometano 100%. Revelador: solução de anisaldeído sulfúrico; B: Amostra: 10 µL de óleo em 5mL de diclorometano. Eluente: hexano: clorofórmio: acetato de etila 70:10:20. Revelador: solução de anisaldeído sulfúrico.



Nota: OR: óleo resina de *C. officinalis* SQR: solução de β -cariofileno

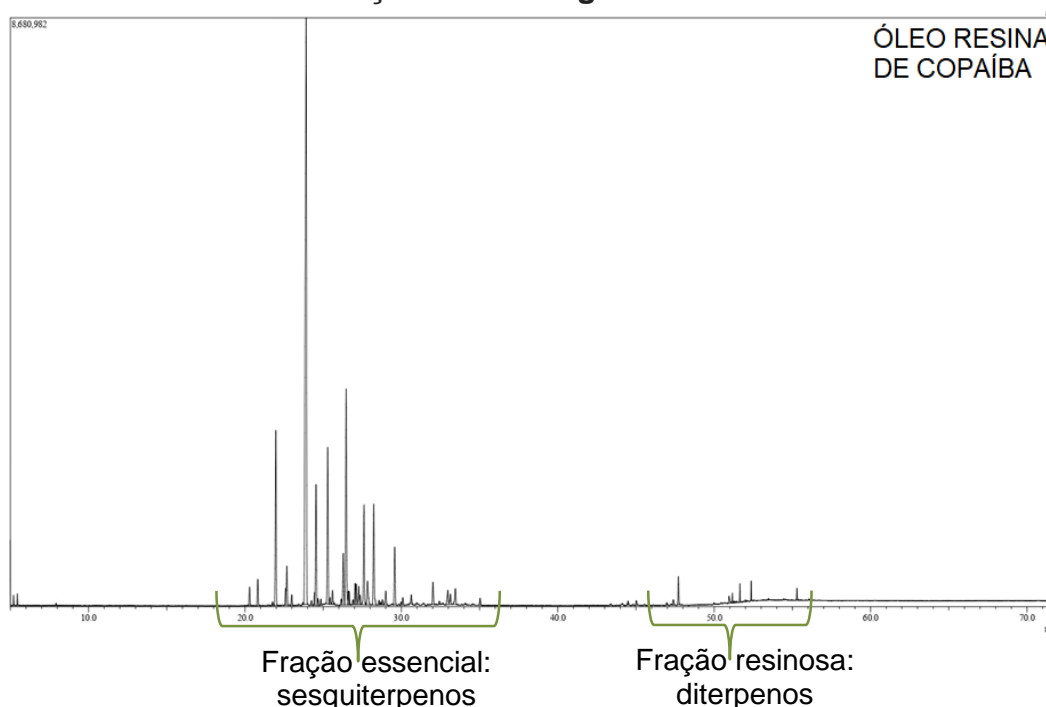
Vale ressaltar que a espécie não possui monografia na Farmacopéia Brasileira, portanto não há perfil qualitativo descrito como referência. E não foram

encontrados outros perfis cromatográficos por CCD na literatura para o gênero *Copaifera*. Diante disso, é necessário a validação do método qualitativo de caracterização química desenvolvido no presente trabalho; como perspectiva de contribuir com métodos de análise e parâmetros para monografia farmacopeica para espécie *Copaifera officinalis*.

5.3.2 Perfil químico e caracterização por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) do óleo resina de *Copaifera officinalis*

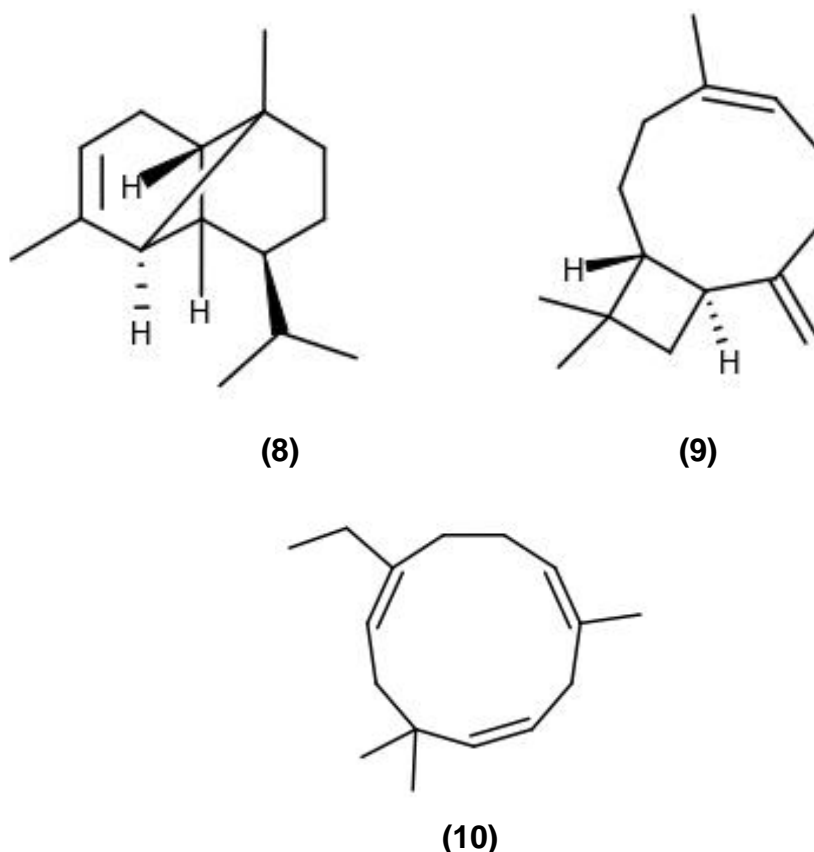
O cromatograma obtido por análise do óleo resina de *C. officinalis* por CG-EM, conforme método 4.5.2 demonstrou a presença de dois grupos principais de substâncias, sesquiterpenos e diterpenos que constituem a fração volátil e resinosa, respectivamente (Figura 16). A identificação dos constituintes foi realizada a partir do tempo de retenção e espectro de massa dos picos detectados comparados com o banco de espectros da biblioteca NIST e a comparação com dados espectrais obtidos da literatura científica para o óleo resina das espécies pertencentes ao gênero *Copaifera*.

Figura 16 – Cromatograma do óleo resina de *C. officinalis* obtido por CG-EM. Condições cromatográficas item 4.5.2.



A análise por CG-EM, conforme método de caracterização química (4.5.2) permitiu

a identificação de 64 substâncias do óleo resina de *C. officinalis* (Tabela 20). Das quais 49 são sesquiterpenos (cerca de 97%), sendo os majoritários identificados: como: copaeno **(8)**, β -cariofileno **(9)**, humuleno **(10)**, trans- α -bergamoteno, germacreno D, β -bisaboleno, germacreno B. Os outros componentes, 15 (cerca de 3%), foram identificados como diterpenos, cujos majoritários foram kolavelool, colavenato de metila e ácido hardwickiico.



Pinto e colaboradores (2000) em estudo descreveu que a constituição do óleo resina das espécies de *Copaifera* sp. é composta em sua maior parte por sesquiterpenos, cerca de 90% do óleo, sendo o principal constituinte o β -cariofileno. Possui também uma pequena quantidade de diterpenos, que corresponde a fração resinosa. Este resultado, corrobora com o presente estudo de análise por CG-EM do óleo resina de *C. officinalis*. que apresentou maior proporção de componentes voláteis, principalmente sesquiterpenos, sendo majoritário o β -cariofileno (35,5%).

Tabela 20 – Substâncias identificadas no óleo resina de *C. officinalis* por CG-EM, conforme método item 4.5.2.

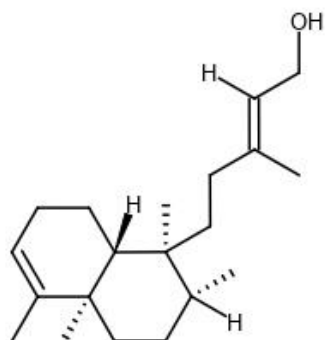
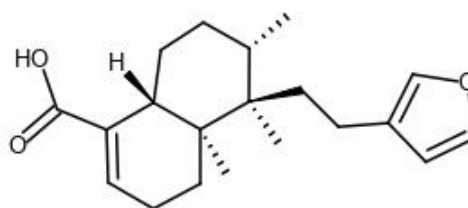
Pico	TR (min)	ÁREA %	NOME
1	5.209	0.22	Hidroperóxido,1-etilbutil
2	5.453	0.27	Hidroperóxido,1-metilpentil
3	7.929	0.06	<i>trans</i> - β -Ocimeno
4	20.299	0.72	Ciclohexeno,4-etenil-4-metil-3-(1-metil
5	20.825	1.00	α -Cubebene
6	21.772	0.12	Ylangene
7	21.974	7.24	Copaeno
8	22.600	0.66	1H-Ciclopenta[1,3]ciclopropa[1,2]benzeno
9	22.679	1.60	Ciclohexano, 1-etenil-1-metil-2,4-bis(1-metiletenil)
10	22.990	0.43	Cipereno
11	23.704	0.06	<i>trans</i> - α -Bergamoteno
12	23.916	35.54	β -Cariofileno
13	24.256	0.18	1H-Ciclopenta[1,3]ciclopropa[1,2]benzeno
14	24.452	0.45	Ciclohexano,1-etenil-1-metil-2-(1-metil)
15	24.546	4.98	<i>trans</i> - α -Bergamoteno
16	24.674	0.31	(2E,4S,7E)-4-isopropil-1,7-dimetilciclodeco
17	24.855	0.23	(1S,5S)-4-Metileno-1-((R)-6-metilhept-5-e)
18	25.293	6.53	Humuleno
19	25.441	0.28	(E)- β -Famesene
20	25.597	0.59	Aloaromadendreno
21	25.690	0.05	β -Sesquifelandreno
22	26.158	0.27	Zonareno
23	26.293	2.31	γ -Muuroleno
24	26.474	9.92	Germacreno D
25	26.615	0.64	(1S,5S,6R)-6-Metil-2-metileno-6-(4-metil)
26	26.665	0.44	Naftaleno,decahidro-4 α -metil-1-metil
27	26.902	0.20	Isoledeno
28	27.047	0.92	1H-Cicloprop[e]jazuleno, 1a,2,3,5,6,7,7 α ,7 β -o
29	27.121	0.88	γ -Elemene
30	27.279	0.81	α -Muurolene
31	27.368	0.37	Ciclohexeno,4-[(1E)-1,5-dimetil-1,4-hexadi
32	27.615	4.37	β -Bisaboleno
33	27.730	0.07	(R)-1-metil-4-(6-metil-hept-5-en-2-il)ciclo
34	27.837	1.28	γ -Muurolene
35	28.237	4.53	1-Isopropil-4,7-dimetil-1,2,3,5,6,8a-hexahy
36	28.573	0.18	Naftaleno,1,2,3,4,4a,7-hexahidro-1,6-dimetil
37	28.684	0.10	1H-Ciclopropa[a]naphthalene, decahidro-1,1,
38	28.797	0.22	Naphthalene, 1,2,4a,5,6,8a-hexahidro-4,7-dimetil
39	29.003	0.67	Ciclohexeno, 4-[(1E)-1,5-dimetil-1,4-hexadimetil
40	29.579	2.48	Germacreno B
41	29.987	0.13	(1aR,3aS,7S,7aS,7bR)-1,1,3 α ,7-Tetrametilo
42	30.098	0.32	Álcool cariofilenílico
43	30.635	0.38	Óxido de cariofileno
44	32.020	1.01	Junenol
45	32.432	0.15	1-Naftalenol, 1,2,3,4,4a,7,8,8 α -octahidro-1
46	32.969	0.77	τ -Muurolol

Pico	TR (min)	ÁREA %	NOME
47	33.142	0.51	1-Naftalenol, 1,2,3,4,4a,7,8,8 α -octahidro-1
48	33.453	0.79	α -Cadinol
49	35.036	0.30	1-Naftalenol, decahidro-1,4a-dimetil-7-1
50	44.496	0.15	acetato de colavenol
51	45.028	0.19	Derivado do kolavelool
52	46.975	0.09	Derivado do kolavelool
53	47.394	0.24	1-Naftalenopropanol, α -etenildecaí
54	47.712	0.97	Kolavelool
55	50.951	0.31	Derivado do kolavelool
56	51.162	0.22	Ácido 2-pentenóico, 5-(decahidro-5,5,8a-trimeto)
57	51.235	0.03	1,1,6-trimetil-3-metileno-2-(3,6,9,13-tetrametil
58	51.281	0.03	Acetato,[6-(acetiloxi)-5,5,8a-trimetil-2-metil
59	51.40	0.05	1-Naftalenopropanol, α -etenildecaí
60	51.646	0.39	Colavenato de metila
61	51.992	0.04	Derivado do kolavelool
62	52.367	0.39	Ácido Hardwickiico
63	53.466	0.03	2-Butenal, 2-metil-4-(2,6,6-trimetil-1-ciclo)
64	55.291	0.34	1 α -(acetoximetil)-7 α ,8 α -dimetil

A Figura 17, mostra ampliação do cromatograma, demonstrando os principais componentes da fração sequiterpênica e diterpênica. (A fração volátil, rica sesquiterpenos, apresenta-se na faixa de tempo de retenção de 20 a 35 min, dado obtido também por Dias et al. (2014), na qual os sesquiterpenos foram detectados na faixa de tempo de retenção de 20 a 30 min. Além disso, os componentes majoritários, copaeno (TR: 21974min), β -cariofileno (TR: 23916min), *trans*- α -bergamoteno (TR: 24546min), humuleno (TR: 25293min), germacreno D (TR: 26474min), β -bisaboleno (TR: 27615min), germacreno B (TR: 29579min) identificados no presente estudo, também foram identificados no trabalho citado. De acordo com a descrição da literatura para análise cromatográfica por CG-EM do óleo resina de *C. officinalis*. há uma segunda região com concentração de picos eluídos, na faixa de tempo de 44 a 55 minutos; representando a fração resinosa do óleo de copaíba, na qual foram identificados os diterpenos; sendo os majoritários kolavelool (TR: 47712min), colavenato de metila (TR: 51646min) e ácido hardwickiico (TR: 52367min).

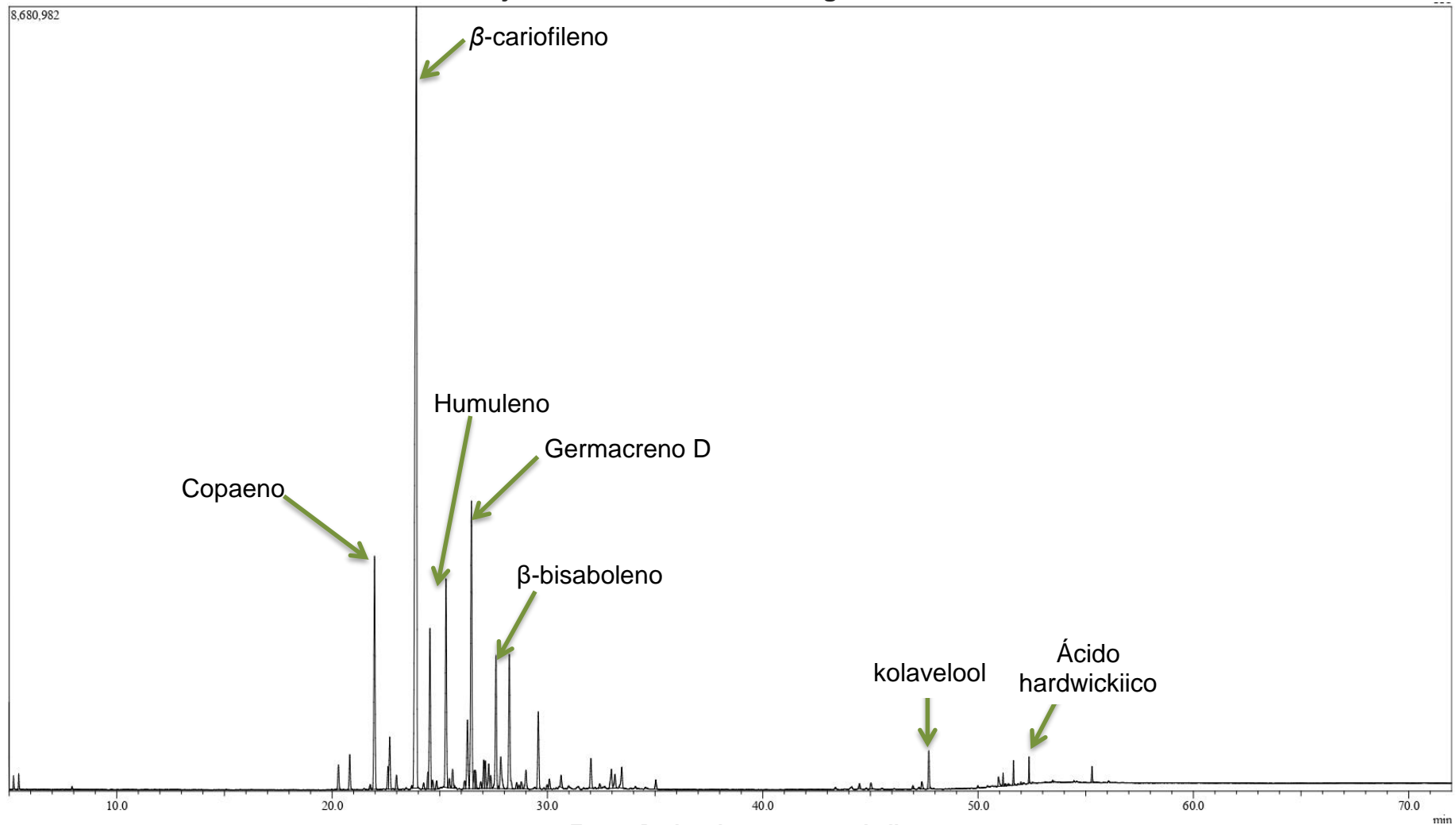
Trindade et al. (2018) em revisão sobre a fitoquímica e farmacologia das espécies de copaíba, descrevem que o óleo resina de *C. officinalis*. é um dos óleos de copaíba mais ricos em β -cariofileno; detectado no presente estudo

como sesquiterpeno majoritário, com 35,5%. Outros constituintes são o germacreno B, *trans*- α -bergamoteno, humuleno e ácido hardwickiico. A revisão ainda apresenta como componentes da fração resinosa do óleo, diterpenos do tipo clerodano, kolavenol (**11**) e ácido hardwickiico (**12**); também identificados como constituinte do óleo resina de copaíba no presente trabalho.

**(11)****(12)**

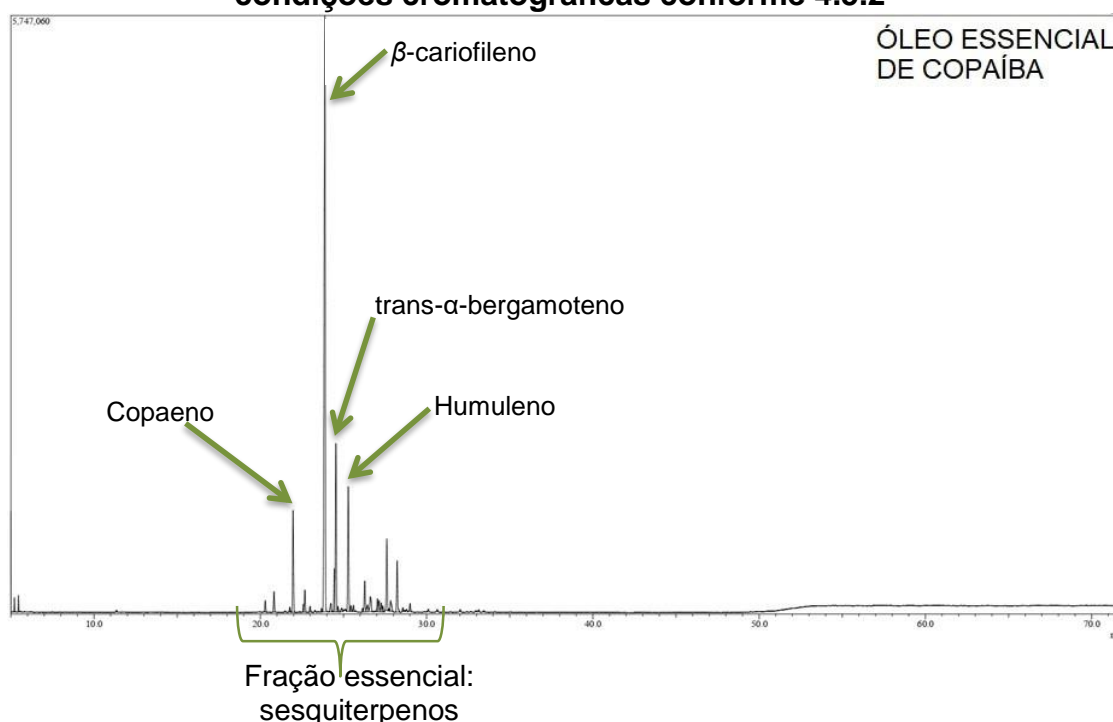
Veiga Junior e colaboradores (2002) descrevem em estudo sobre o gênero *Copaifera* sp. que os estudos fitoquímicos do óleo resina apresentam em análise por CG-EM cromatograma característico, com duas regiões de concentração de picos eluídos; referentes aos compostos voláteis e à fração não volátil. Logo, o cromatograma obtido por CG-EM do óleo resina de *C. officinalis* (Figura 17), está de acordo com os estudos fitoquímicos já realizados para espécies do gênero.

Figura 17 – Ampliação do cromatograma do óleo resina de *C. officinalis*, obtido por CG-EM, com os constituintes majoritários. Método cromatográfico item 4.5.2



Diante disso, visando validar a caracterização química por CG-EM, analisou-se sob as mesmas condições cromatográficas estabelecidas no método (4.5.2), o óleo essencial de copaíba, sem a fração resinosa. A amostra foi preparada conforme 4.5.2.2.3. No óleo essencial foram identificadas as substâncias: copaeno (TR:21965min), β -cariofileno (TR: 23876min), trans- α -bergamoteno (TR: 24542min) e humuleno (TR: 25287min) e a ausência dos diterpenos (Figura 18).

Figura 18 – Cromatograma do óleo essencial de copaíba obtido por CG-EM; condições cromatográficas conforme 4.5.2



Sousa, e colaboradores (2011) obtiveram por destilação do óleo resina de copaíba a fração essencial do mesmo, que é constituída somente pelos componentes voláteis, sesquiterpenos. Em análise por CG-FID e identificação por CG-EM, descrevem que este óleo essencial é constituído majoritariamente por β -cariofileno, copaeno e humuleno. Esses resultados estão de acordo com os resultados do presente estudo, e confirmam que o óleo essencial é constituído somente pelos componentes voláteis.

Diante disso, pode-se inferir que o método de caracterização por CG-EM desenvolvido está adequado para a análise do óleo resina e o óleo essencial de copaíba; pois permite a detecção e identificação dos constituintes do óleo de ambas as frações, essencial e resinosa, que o compõem e consegue diferenciar o óleo essencial de

copaíba. Além disso, o cromatograma obtido da análise de óleo resina de *C. officinalis* está de acordo com estudos do gênero descrito na literatura. O método propiciou a identificação dos principais sesquiterpenos, assim como, o componente majoritário, β -cariofileno, e diterpenos descritos na literatura como constituintes do óleo resina de copaíba. Vale ressaltar que a identificação dos componentes do óleo garante sua autenticidade, verificada pela ausência de impurezas e adulterantes; corroborando com a produção de conhecimento científico para a caracterização das espécies de *Copaifera* sp.

5.4 Desenvolvimento de método analítico por CG-EM para quantificação de marcador químico do óleo resina de *Copaifera officinalis* L.

As técnicas cromatográficas são amplamente utilizadas para análises qualitativas e quantitativas de matrizes complexas, como materiais de origem vegetal; permitindo a separação de seus componentes, identificação e quantificação. A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas é a técnica de escolha indicada para análise de óleos, por propiciar a separação de acordo com a volatilidade dos constituintes da amostra; quando utilizada a técnica acoplada ao espectro de massas há obtenção das informações estruturais e massa molar dos constituintes da amostra (Simões et al., 2017; Ladeira, 2019). Sendo assim, esta foi a técnica escolhida para o desenvolvimento de método analítico para avaliação da qualidade da espécie e da formulação desenvolvida.

A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas é o método de escolha para a análise de amostras voláteis; cujos os constituintes tenham pontos de ebulição até 300 °C e sejam termicamente estáveis. Logo, o ponto crítico da técnica é a programação da rampa de temperatura, que influencia diretamente no desenvolvimento do método analítico adequado (Harris, 2001; Ladeira, 2019).

Para o óleo de copaíba há na literatura descrição de métodos por CG-EM, no qual a programação da rampa de temperatura iniciam com 60 °C a 240 °C, por acréscimo de 3 °C min⁻¹ (Lameira, et al., 2005; Dias, et al., 2014; Galúcio, et al., 2016). Lucca, e colaboradores (2015); utilizou um método com uma rampa de temperatura que iniciou

em 60 °C e permaneceu por 3 min, aumentando-se 40 °C /min, até a temperatura final de 300 °C. Há outros estudos de análise por CG-EM de óleo de copaíba que utilizam rampas de temperaturas com início em temperatura mais elevadas, como 120 °C a 150°C, elevando-se 3 °C min⁻¹; de 150 °C a 280 °C acrescentando 8 °C min⁻¹, permanecendo por 5 minutos na última temperatura mais elevada; no entanto, em tais métodos as amostras de óleo de copaíba são esterificadas com diazometano (Barbosa, et al., 2012; Souza barbosa, et al., 2013).

Todos os estudos de análise do óleo resina por CG-EM utilizaram hélio como gás de arraste, em fluxo que variou de 1 mL/min a no máximo 2 mL/min. A injeção no modo split; com temperatura do injetor de no máximo 270 °C; sendo a maioria dos estudos essa temperatura mantida à 250 °C (Lameira, et al., 2005; Barbosa, et al., 2012; Souza barbosa, et al., 2013; Dias, et al., 2014; Lucca, et al., 2015; Galúcio, et al., 2016; Xavier-junior, et al., 2017).

A partir da análise do óleo resina de *C. officinalis* por CG-EM por método exploratório na caracterização química (item 4.5.2); foi possível a identificação da matriz química e detecção da presença do componente majoritário, β -cariofileno (35,5%, Tabela 20). Este componente está presente em todas as amostras já analisadas do óleo resina de espécies de copaíba e está relacionado com diversas atividades farmacológicas descritas na literatura (Trindade, et al., 2018; Arruda, et al., 2019). Portanto, o constituinte do óleo resina de *C. officinalis*, β -cariofileno, foi selecionado como marcador químico da espécie para o desenvolvimento de método analítico de quantificação.

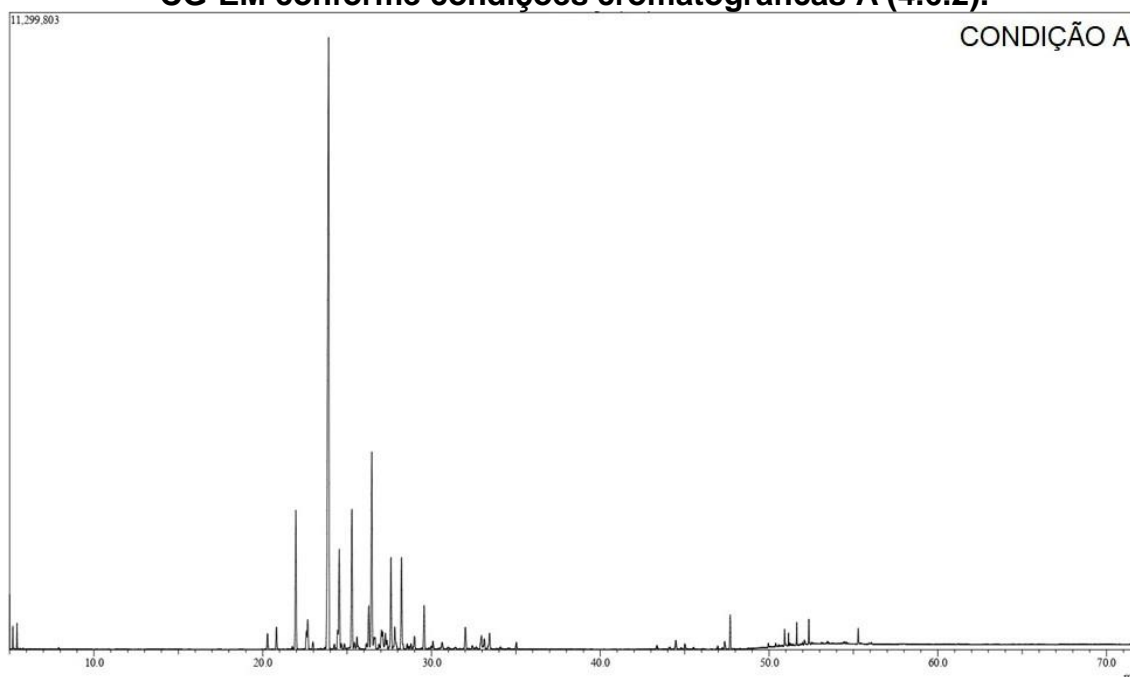
A condição cromatográfica utilizada como exploratória para a caracterização química (item 4.5.2) foi utilizada como ponto de partida para o desenvolvimento do método analítico. Para otimização do método, visou-se melhorar a separação cromatográfica, a resolução dos picos e reduzir o tempo de análise.

5.3.1 Desenvolvimento das condições cromatográficas

A partir da corrida exploratória (denominada A, Figura 19), foram realizadas modificações no método, visando a redução do tempo de análise, melhorar a

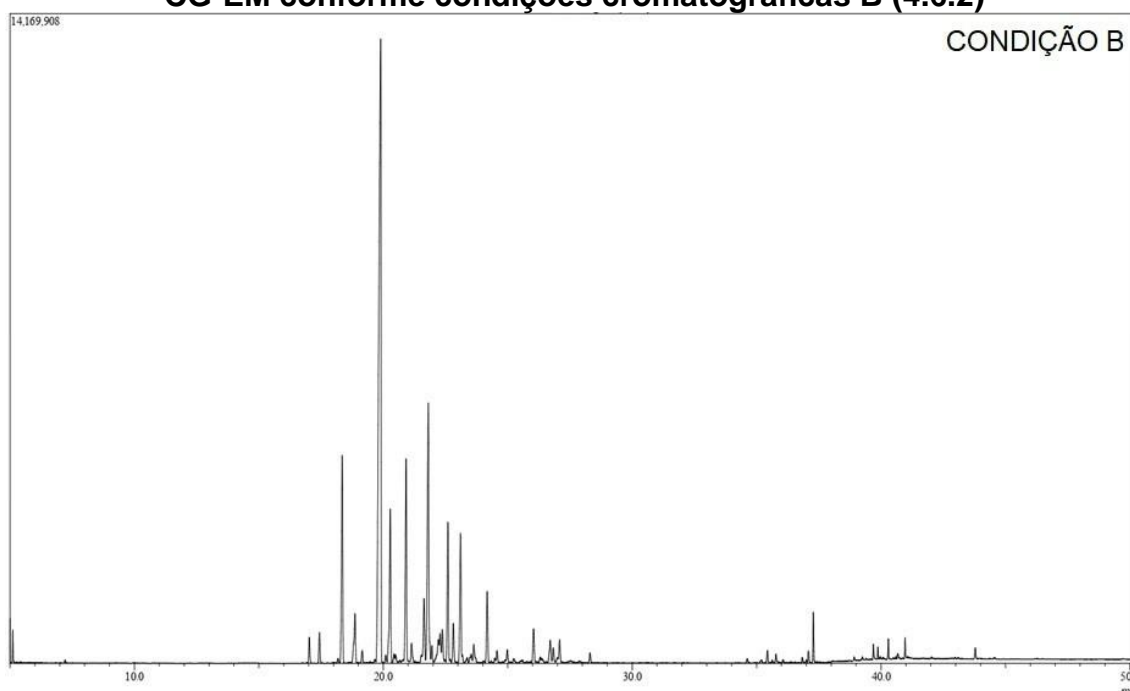
separação dos constituintes e resolução do picos cromatográficos; obtendo-se as condições B e C (Figura 20 e 21, respectivamente); até definição da condição cromatográfica adequada para o óleo resina de *C. officinalis* Todos os cromatogramas obtidos por CG-EM, conforme as condições cromatográficas propostas A, B e C, apresentaram duas regiões de concentração de picos, conforme descrito na literatura como cromatograma característico do gênero *Copaifera* sp. (Veiga Junior et al., 2002).

Figura 19 – Cromatograma obtido do óleo resina de *Copaifera officinalis* por CG-EM conforme condições cromatográficas A (4.6.2).



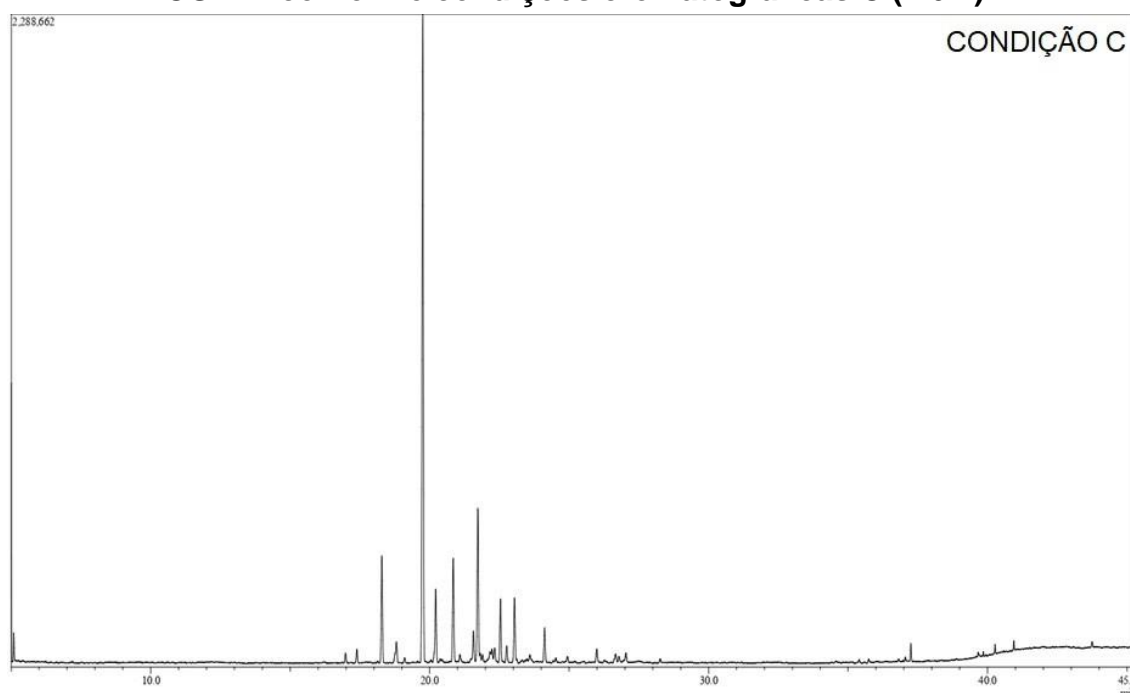
A condição cromatográfica A apresenta elevado tempo de corrida cromatográfica, 70 minutos, separação inadequada dos constituintes mais voláteis, sesquiterpenos, bem como, baixa resolução; o que faz o método não ser adequado para quantificação de marcadores. Nesta análise, os sesquiterpenos eluem a partir dos 20 minutos de análise, e não há a eluição de outros componente antes de 56 minutos de corrida, logo, o tempo de permanência na temperatura mais alta da rampa proposta, 280 °C não foi necessária para eluição dos diterpenos, portanto optou-se por reduzir o tempo de permanência na temperatura final; e aumentou-se a rampa de temperatura para acréscimo de 4 °C por minuto até a temperatura intermediária de 200 °C; propondo-se a condição B (Figura 20).

Figura 20 – Cromatograma do óleo resina de *Copaifera officinalis* L obtido por CG-EM conforme condições cromatográficas B (4.6.2)



O cromatograma obtido pela condição cromatográfica B apresentou menor tempo de corrida cromatográfica, 50 minutos, e menor tempo de retenção para o início da eluição dos componentes mais voláteis, sesquiterpenos; sendo observado a eluição do primeiro sesquiterpeno no tempo de retenção de 17 minutos. No entanto, não houve melhora na separação e resolução dos picos cromatográficos, observando-se sobreposição de muitos componentes nesta região do cromatograma. Observou-se ainda, que o tempo de retenção do último componente ocorreu em 43 minutos, logo, não é necessário uma corrida cromatográfica de 50 minutos; sendo proposto a condição C. Conforme a Tabela 10 (item 4.6.2), as modificações propostas para a redução do tempo de permanência na temperatura mais elevada da rampa, 280 °C para 5 minutos, não interferiu na eluição do último componente do óleo, permanecendo a eluição do último pico em 43 minutos; observou-se ainda, o início da eluição dos sesquiterpenos em 16 minutos de corrida cromatográfica e melhor resolução dos picos das substâncias mais voláteis (Figura 21).

Figura 21 – Cromatograma do óleo resina de *Copaifera officinalis*. obtido por CG-EM conforme condições cromatográficas C (4.6.2)



Mesmo diante do resultado da condição cromatográfica C, ainda foi realizado a análise do óleo com a condição D alterando a temperatura inicial do forno para 65 °C, no entanto, não houve redução do tempo de retenção em que se inicia a eluição dos sesquiterpenos. Além disso, houve redução da resolução dos picos cromatográficos e não propiciou redução significativa do tempo total da corrida cromatográfica.

Para a definição da condição cromatográfica C, a amostra de óleo resina de *C. officinalis* e a SQR β -cariofileno, conforme item 4.6.2, foram analisadas em triplicata, preparadas de forma independentes, sendo calculado média e desvio padrão dos tempos de retenção e porcentagem de área do β -cariofileno, componente majoritário da amostra de óleo resina de *C. officinalis* (Tabela 21). Os cromatogramas obtidos das análises estão apresentados a seguir, Figura 22 e 23, respectivamente. O diluente utilizado, hexano grau HPLC também foi analisado sob as mesmas condições.

Tabela 21 – Média e desvio padrão relativo do β -cariofileno, componente majoritário do óleo resina de *Copaifera officinalis* obtidos por análise em CG-EM pelo método da condição cromatográfica C.

Amostra	Área %	TR (min)	Amostra	Área %	TR (min)
OC 1	45,99	19.754	PAD 1	89,03	19.803
OC 2	44,64	19.755	PAD 2	88,98	19.804
OC 3	44,71	19.750	PAD 3	89,08	19.799
MÉDIA	45,11	19.753	MÉDIA	89,03	19.802
DPR	1,68	0,013	DPR	0,05	0,013

OC 1, 2 e 3; replicatas de óleo resina de *C. officinalis* L. PAD 1, 2 e 3; replicatas da solução padrão de β -cariofileno. DPR: desvio padrão relativo.

Nota: Todas as soluções foram preparadas conforme item 4.6.1

Figura 22 – Cromatograma do óleo resina de *Copaifera officinalis* obtido por CG-EM na condição cromatográfica C, definida como método.

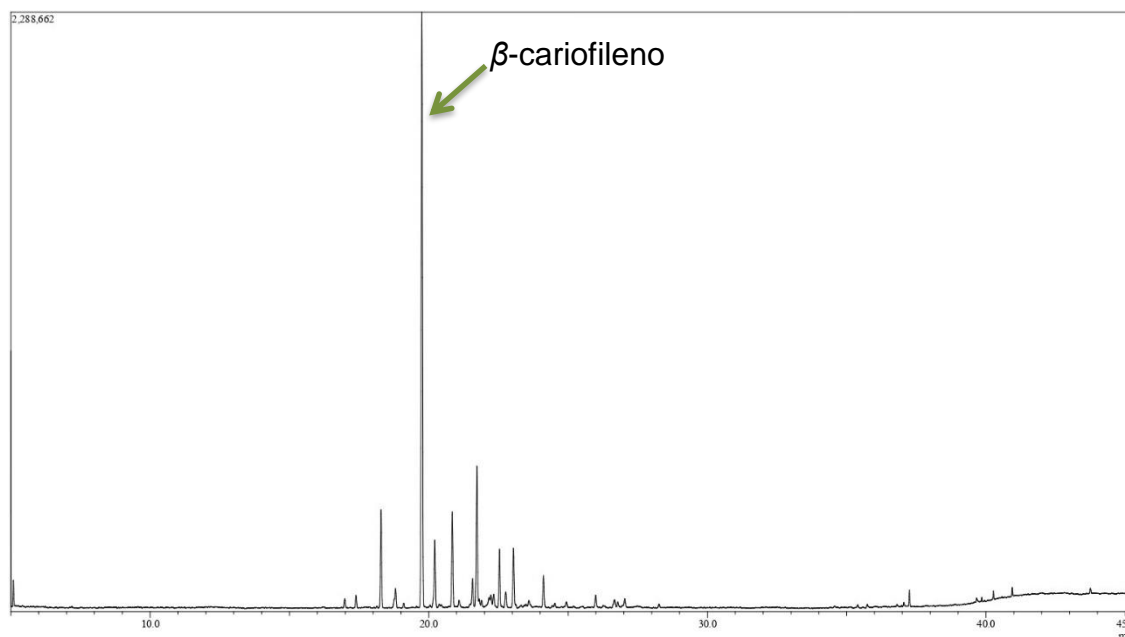
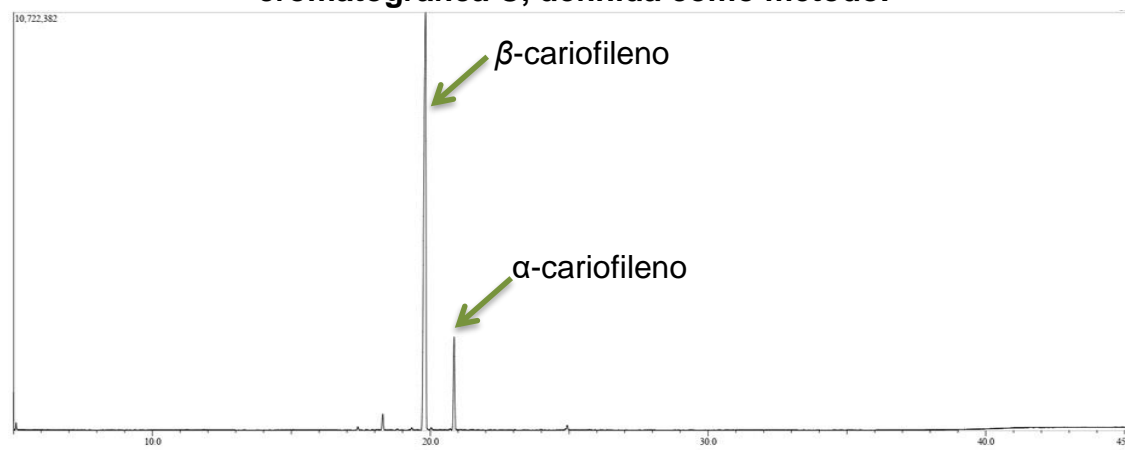
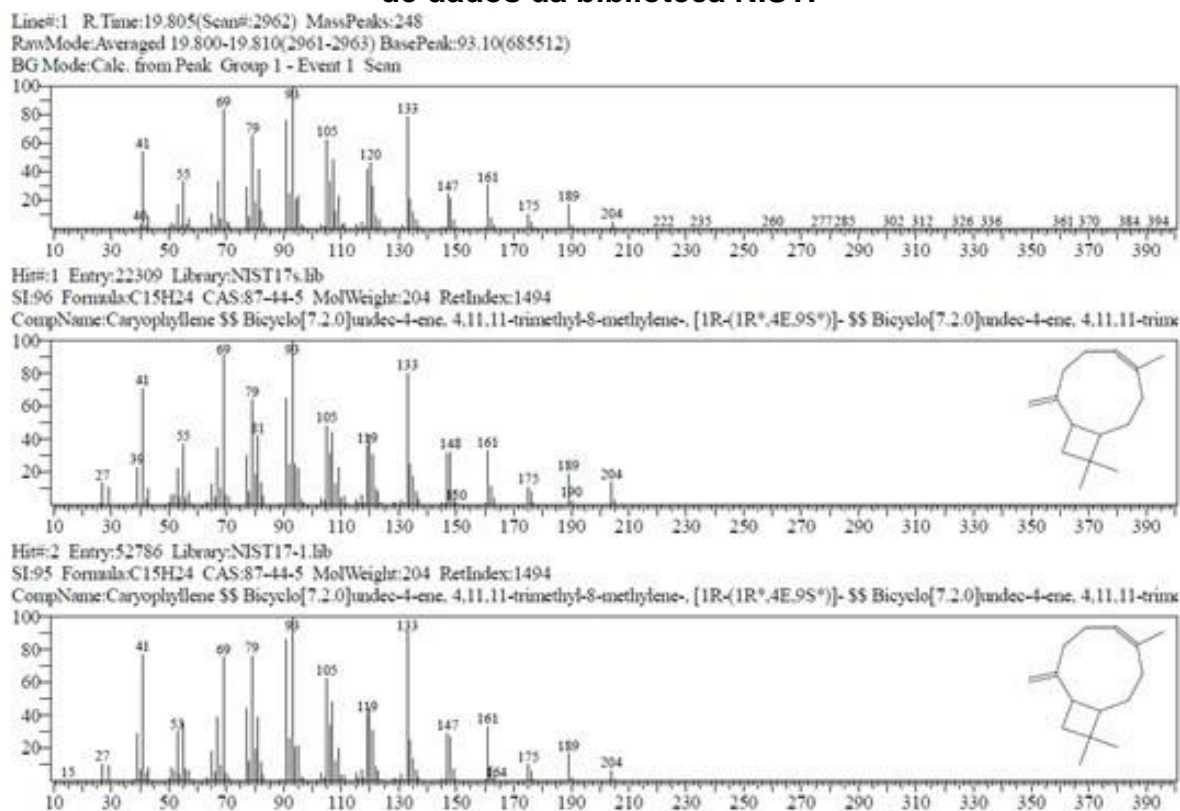


Figura 23 – Cromatograma do β -cariofileno obtido por CG-EM na condição cromatográfica C, definida como método.



Observa-se que o cromatograma obtido da análise do óleo resina de *C. officinalis* apresenta duas regiões com concentração de eluição de componentes; sendo os componentes mais voláteis constituintes da fração essencial sesquiterpênica eluidos no início da corrida cromatográfica, na faixa de tempo de retenção de 16 a 28 minutos. Os componentes de maior peso molecular, constituintes da fração resinosa, diterpenos, eluidos no final da corrida cromatográfica, na faixa de tempo de retenção entre 33 a 43 minutos. A identificação do sesquiterpeno, majoritário, foi realizada mediante comparação com a literatura e pela biblioteca NIST (Figura 24).

Figura 24 – Espectro de massa do β -cariofileno, comparação amostra e banco de dados da biblioteca NIST.



Fonte: banco de espectro de massa biblioteca NIST.

O cromatograma do diluente, hexano, utilizado para solubilização da amostra do óleo resina de *C. officinalis* e da SQR β -cariofileno não apresentou nenhum pico cromatográfico, comprovando que todos os picos eluidos apresentados nos cromatogramas da amostra são os componentes que constituem a mesma (Figura 23) O β -cariofileno apresenta-se adequado para quantificação do marcador químico e validação do método analítico desenvolvido.

Visto a repetibilidade do método, observado pelo tempo de retenção e área do componente β -cariofileno, sesquiterpeno majoritário, 45% da amostra de óleo resina de *C. officinalis* nas condições cromatográficas desenvolvidas no método. Este foi selecionado como marcador químico para a quantificação e validação do método analítico desenvolvido com as condições cromatográficas C, definida como método pois apresentou-se adequada para as etapas subsequentes do presente trabalho.

5.5 Validação do método analítico para quantificação do marcador químico β -cariofileno do óleo resina de *Copaifera officinalis*

A validação do método analítico confirma e evidencia a capacidade do método desenvolvido em determinar o teor do marcador químico selecionado, β -cariofileno, no óleo resina de *C. officinalis*. Além de quantificar o marcador; fornece evidências da qualidade da droga vegetal utilizada, e garante que o método atende todos os requisitos específicos para a finalidade de uso pretendida (AMORIM, 2017; BRASIL, 2017).

5.5.1 Adequabilidade do sistema

Para verificação do sistema cromatográfico e a adequabilidade das condições analíticas estabelecidas em gerar resultados de qualidade para as análises quantitativas; foram avaliados os seguintes parâmetros do sistema para o desempenho da coluna cromatográfica: resolução (R), fator de cauda (T), número de pratos teóricos (N) e análise das áreas e tempos de retenção. Os parâmetros foram definidos conforme literatura e aplicabilidade à sistema cromatográfico gasoso. Todos os dados foram obtidos pelo programa LabSolution GCMS Solution – Shimadzu 4.50 SP1 e submetidos ao cálculo da média e desvio padrão relativo (DPR).

A verificação destes parâmetros foi realizada por meio de cinco injeções consecutivas da solução SQR β -cariofileno na concentração de 100%; preparada conforme item 4.6.1.4. A Tabela 22 apresenta os resultados obtidos nas análises.

Tabela 22 – Parâmetros de adequabilidade do sistema cromatográfico na validação de método analítico para o óleo resina de *Copaifera officinalis* do marcador químico β -cariofileno por CG-EM

INJEÇÃO	TR (min)	ÁREA (mil)	T	N	RESOLUÇÃO
1	19.805	41185405	0,656	335815	-----
2	19.796	39710238	0,672	338236	-----
3	19.803	40340253	0,657	337646	-----
4	19.805	40265014	0,663	335366	-----
5	19.810	41148711	0,662	330832	-----
X	19803,8	40529924	0,662	335579	-----
DPR (%)	0,025599	1,55587	0,961323419	0,868370737	-----

A The United States Pharmacopoeia (USP, 2017), recomenda que o desvio padrão relativo de cinco injeções consecutivas da solução química de referência do analito utilizado para doseamento em método analítico seja inferior a 2%. E quanto aos parâmetros avaliados para verificação da adequabilidade do sistema; o FDA-Validation of Chromatographic Methods (1994) considera o sistema adequado para análise, recomendando que os parâmetros: $T < 2,0$ e $N > 2000$.

Diante disso, conforme dados obtidos das cinco injeções consecutivas (Tabela 18), visto DPR do tempo de retenção e área do analito de referência menor que 2%, T de 0,662 e N de 335.579; o sistema cromatográfico foi considerado adequado.

5.5.2 Intervalo para determinação da linearidade do método para quantificação de β -cariofileno no óleo resina de *Copaifera officinalis*

A faixa de trabalho utilizada no presente estudo para validação do método de teor de β -cariofileno em óleo resina de *C. officinalis* L. foi definida conforme item 4.7.2 seguindo o preconizado na RDCn.166 (BRASIL, 2017). A faixa de 60% a 140% (Tabela 23) foi definida mediante cálculo da quantidade estimada de β -cariofileno na amostra de óleo resina de *C. officinalis* L. através dos dados de área (%) obtidos na análise por CG-EM para definição das condições cromatográficas do método (item 4.6.2).

Tabela 23 – Intervalo definido para quantificação de β -cariofileno em óleo resina de *C. officinalis* L.

Concentração %	[] $\mu\text{g/mL}$ de β -cariofileno
60	276
80	368
100	460
120	552
140	644

5.5.3 Linearidade: construção da curva de calibração da substância química de referência β -cariofileno

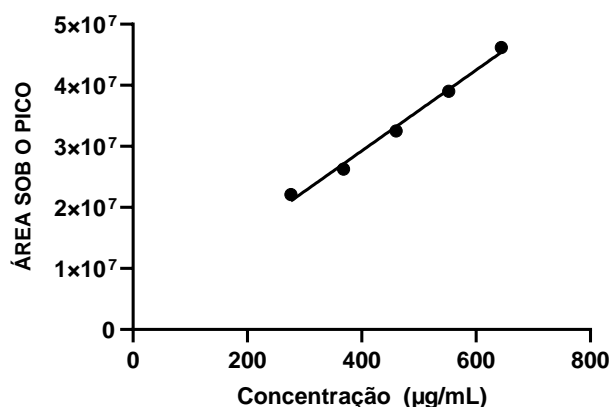
Para a verificação da linearidade do método desenvolvido, foi realizada a construção da curva analítica do marcador químico β -cariofileno, em triplicata a partir de três soluções estoques preparadas independentes (conforme item 4.6.1.3). Sendo a faixa de trabalho avaliada 60% a 140% conforme intervalo definido (item 5.4.3). As soluções padrão estoque de SQR β -cariofileno, nas concentrações de 60%, 80%, 100% 120% e 140% foram preparadas e analisadas conforme item 4.7.3.2 no método analítico para quantificação de β -cariofileno.

A curva de calibração foi obtida por meio da avaliação estatística das respostas analíticas da análise cromatográfica, conforme item 4.7.3; através da concentração ($\mu\text{g/mL}$) de β -cariofileno e resposta gerada pelo analito em forma de área sob pico em cada replicata das porcentagens da faixa de trabalho; obteve-se a equação da reta da curva de calibração, coeficiente correlação (r) e coeficiente determinação de Pearson (r^2). Os dados obtidos estão apresentados na Tabela 24, a representação gráfica da curva de calibração e o gráfico de resíduos correspondente estão apresentados na Figura 25 e 26, respectivamente.

Tabela 24 – Dados da curva de calibração da quantificação de β -cariofileno em óleo resina de *Copaifera officinalis*

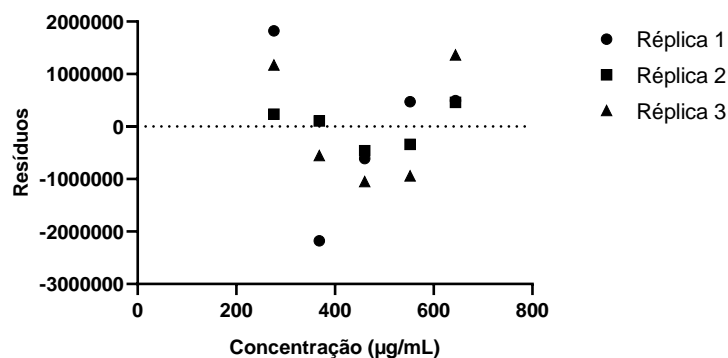
Concentração		Área sob o pico			Variância
%	$\mu\text{g/mL}$	Replicata 1	Replicata 2	Replicata 3	
60	276	23468096	21345916	21538990	1,37706E+12
80	368	25312073	27134512	26320877	8,33495E+11
100	460	32722019	32481195	32329287	8,90286E+12
120	552	39651199	38521174	38941672	3,26201E+11
140	644	45515799	45235165	47749693	1,89865E+12
Dados da curva					Soma
Equação da reta		$Y = 66175X + 2777529$			
r		0,9958			1,33383E+13
r²		0,9917			

Figura 25 – Curva de calibração da solução padrão SQR β -cariofileno para método de análise do óleo resina de *Copaifera officinalis*.



Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 26 – Gráfico de resíduos obtidos na avaliação da linearidade dae SQR β -cariofileno no para o óleo resina de *Copaifera officinalis*



Fonte: Dados da pesquisa.

A verificação da linearidade dos dados obtidos foi realizada por análise de variância (ANOVA), avaliando-se também a significância do coeficiente angular por meio do teste F. Todas as curvas avaliadas apresentaram-se significantes, com p menor que 0,001.

Conforme preconizado na RDCn.166 (BRASIL, 2017), o modelo também foi avaliado quanto sua adequação para ser utilizado por meio da avaliação das variâncias pelo teste de Cochran. A Tabela 25 apresenta os resultados da análise. Os dados foram considerados homocedásticos para todas as curvas avaliadas, o que permite inferir que as variâncias de Y podem ser consideradas constantes. Assim, a análise da regressão linear foi realizada por meio do método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO).

Tabela 25 – Análise da homocedasticidade dos dados da curva analítica para avaliação da linearidade do método analítico desenvolvido para quantificação do β -cariofileno no óleo resina de *Copaifera officinalis*.

Padrão	C _{tab}	C _{cal}	Resultado
β -cariofileno	0,684	0,667	Dados homocedásticos

Nota: C_{tab} = Valor de C tabelado; C_{cal} = Valor de C calculado. Nota: Se C_{tab} > C_{cal} os dados são considerados homocedásticos pelo teste de Cochran; O valor de C_{tab} foi definido de acordo com o número de níveis da curva de calibração e o número de replicas para cada nível de acordo com tabela padrão para valores críticos para teste de Cochran com nível de significância de 5%.

De acordo com os resultados a relação linear avaliada na faixa estabelecida é adequada. Diante disso, conclui-se que o método analítico desenvolvido apresenta linearidade para a quantificação de β -cariofileno no óleo resina de *C. officinalis*.

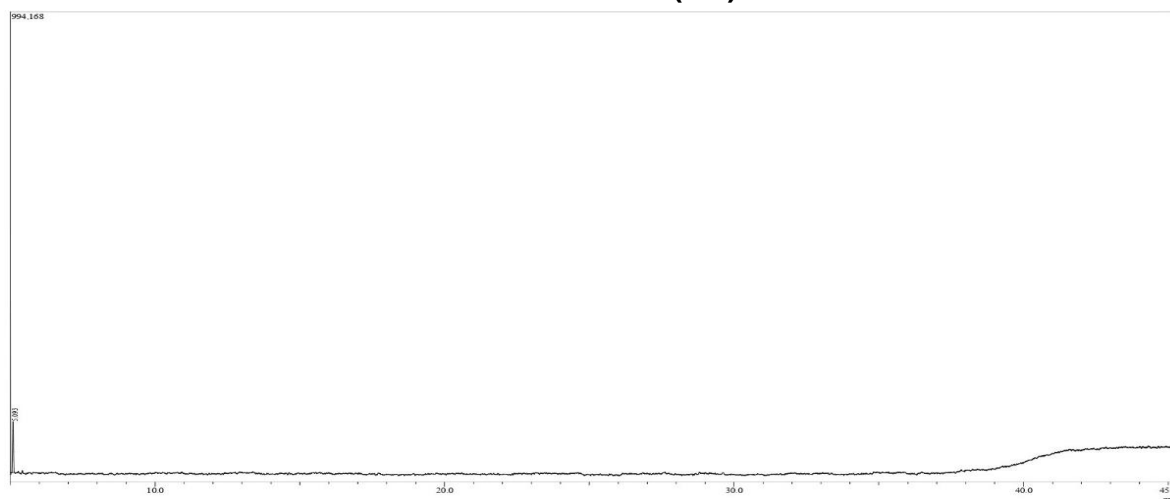
5.5.4 Seletividade

5.5.4.1 Comparação do perfil cromatográfico das soluções

A observação e comparação dos cromatogramas obtidos das análises de cada solução; branco (solvente utilizado para solubilização), amostra de óleo resina de *C. officinalis* e solução SQR β -cariofileno permite inferir que o solvente utilizado para a solubilização das amostras e SQR não apresentou picos no tempo de retenção do analito (Figura 27); indicando que o solvente não interfere na quantificação do β -cariofileno, que possui tempo de retenção de aproximadamente 20 minutos de corrida

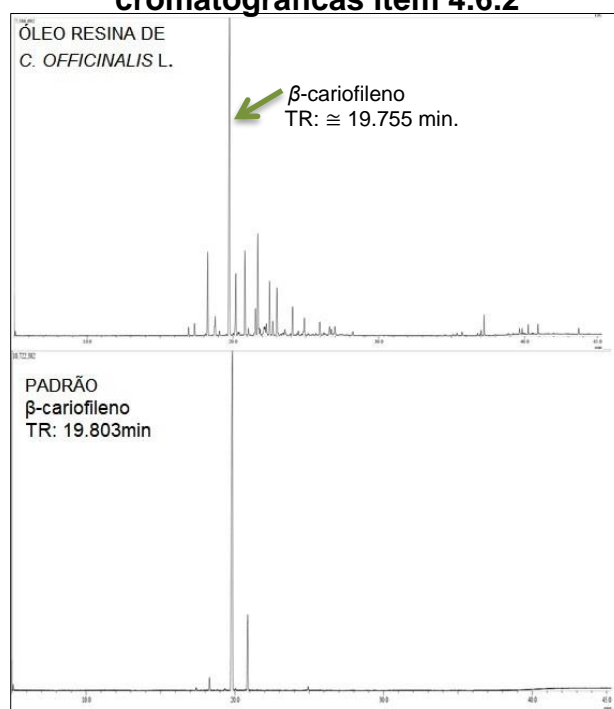
cromatográfica.

Figura 27 – Cromatograma do solvente hexano utilizado para solubilização das amostras, obtido por CG-EM, conforme condições cromatográficas do método desenvolvido (4.6)



O β -cariofileno na amostra do óleo resina de *C. officinalis* apresentou tempo de retenção similar ao da solução de SQR, bem como na solução amostra contaminada com a SQR, atendendo ao requisito de não apresentar interferentes no tempo de retenção. A Figura 28 apresenta a comparação dos cromatogramas das soluções amostra de óleo resina de *C. officinalis* e SQR de β -cariofileno.

Figura 28 – Cromatogramas das soluções amostra do óleo resina de *Copaifera officinalis*, SQR de β -cariofileno obtido por CG-EM, conforme condições cromatográficas item 4.6.2

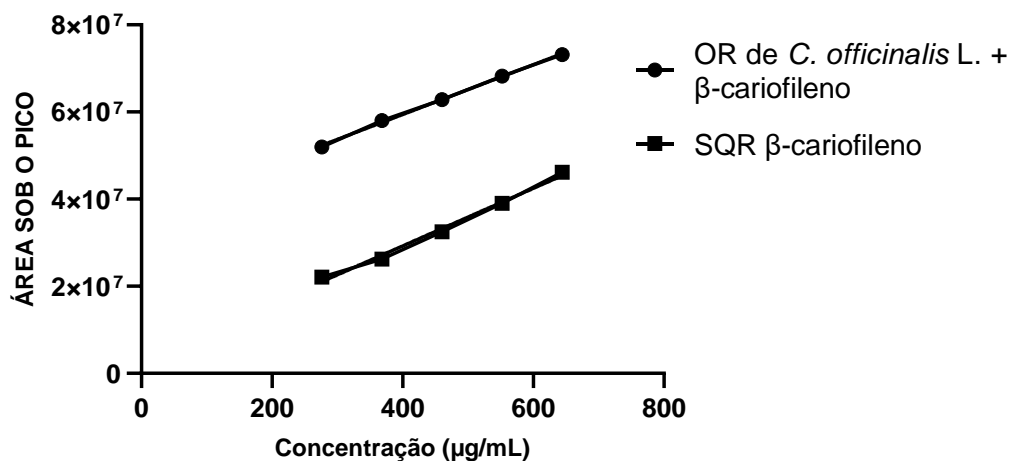


5.5.4.2 Avaliação do efeito matriz

O efeito matriz foi avaliado a partir da comparação da curva de calibração construída com a solução SQR β -cariofileno solubilizada em hexano, com a amostra do óleo resina de *C. officinalis* fortificada com este padrão. A curva de calibração foi construída utilizando cinco níveis de concentração da SQR; 60%, 80%, 100%, 120% e 140% a partir de soluções estoques preparadas em triplicata, independentes; contemplando a faixa de concentração de 276, 368, 460, 552 e 644 $\mu\text{g/mL}$ do marcador químico β -cariofileno. Para avaliação do efeito matriz o paralelismo entre as retas obtidas nas análises é indicação da ausência do efeito matriz na quantificação do β -cariofileno. A confirmação do paralelismo entre as retas foi realizada por comparação estatística dos coeficientes angulares das duas retas construídas a partir das respostas analíticas obtidas nas análises.

A Figura 29 apresenta a curva analítica da SQR do β -cariofileno em hexano e a matriz fortificada. É possível notar visualmente o paralelismo das duas curvas, que foi confirmado por análise estatística de covariância que demonstrou que a inclinação da curva da SQR β -cariofileno e do óleo resina de *C. officinalis* fortificado com a SQR são estatisticamente semelhantes (Tabela 26). Ambas as curvas apresentaram regressão linear significativa ($p < 0,01$).

Figura 29 – Curvas analíticas para avaliação do efeito matriz no método analítico desenvolvido para quantificação de β -cariofileno no óleo resina de *Copaifera officinalis*.



Fonte: Dados da pesquisa.

Tabela 26 – Avaliação do efeito matriz, demonstrando a inclinação e os coeficientes da curva analítica do marcador químico SQR β -cariofileno e OR de *C. officinalis* + β -cariofileno.

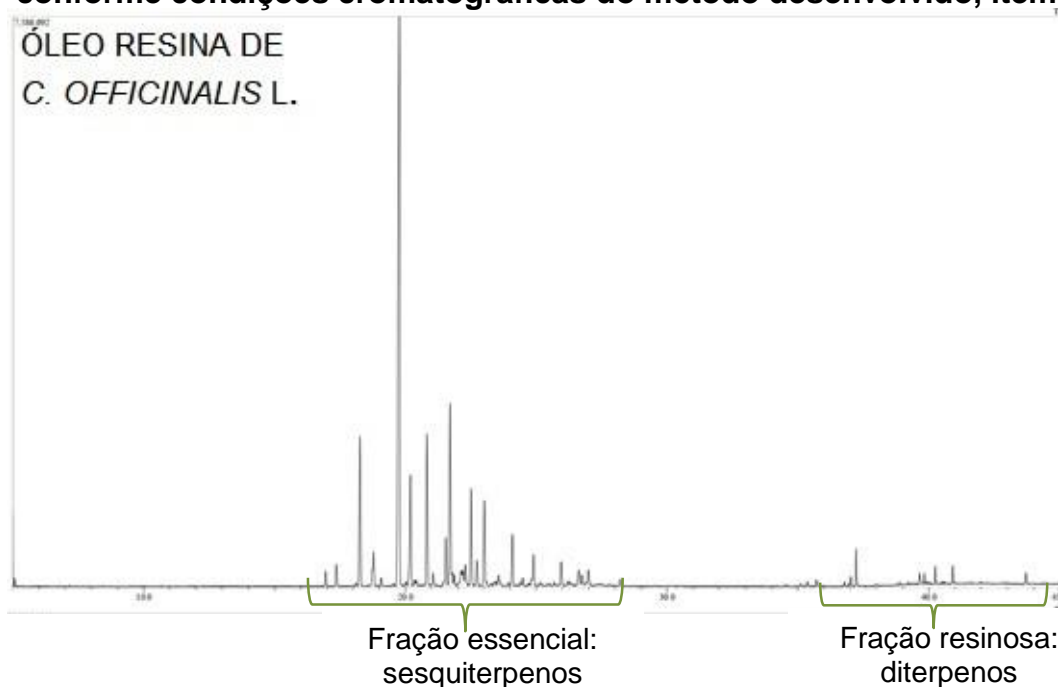
Curva	r^2	Inclinação
SQR β -cariofileno	0,9917	66175x
OR de <i>C. officinalis</i> L. + β -cariofileno	0,9988	57188x

Nota: A análise de inclinação das curvas por covariância indicaram que essas não são significativamente diferentes ($P > 0,05$).

Assim, infere-se que a matriz óleo resina de *C. officinalis* L. não interfere na quantificação do marcador químico β -cariofileno, logo não se faz necessário a utilização de curvas matrizadas para determinação do teor do marcador selecionado, β -cariofileno.

Além disso, a seletividade do método desenvolvido pode ser confirmada pelo cromatograma obtido na análise (Figura 30); que apresenta as duas regiões com concentração de eluição de picos cromatográficos, conforme resultados e descrição da literatura para as espécies do gênero *Copaifera* sp. (Veiga, Junior et al. 2002; Da Trindade, et al, 2018).

Figura 30 – Cromatograma do óleo resina de *C. officinalis* L. por CG-EM, conforme condições cromatográficas do método desenvolvido, item 4.6



Fonte: Dados da pesquisa.

5.5.5 Limites de detecção e quantificação de β -cariofileno em óleo resina de *C. officinalis* L.

Os limites de detecção e quantificação, foram calculados a partir de cada réplica da curva analítica de calibração no estudo de linearidade. Para isso, foi analisada como uma curva independente, sendo calculados o desvio padrão do intercepto e inclinação. Os resultados estão apresentados na Tabela 27.

Tabela 27 – Estimativa dos limites de detecção e quantificação de método analítico para quantificação de β -cariofileno em óleo resina de *C. officinalis* L.

Parâmetro estatístico	Padrão β -cariofileno
Faixa linear ($\mu\text{g/mL}$)	276 – 644
Inclinação média	66174,67
Dv intercepto	1707277,381
LD ($\mu\text{g/mL}$)	85,14
LQ ($\mu\text{g/mL}$)	258

5.5.6 Exatidão

A exatidão do método analítico desenvolvido foi avaliada por meio de ensaios de recuperação da SQR, pela fortificação da amostra com quantidades conhecidas da mesma; em três níveis de concentração da curva analítica. Para a determinação da taxa de recuperação (TR) do método analítico foram avaliados os níveis de concentração 60%, 100% e 140% da curva de calibração.

Os valores da taxa de recuperação (TR) foram calculados pela fórmula:

$$\frac{CA}{CTA} \times 100,$$

onde, CA é a concentração experimental do analito e CTA a concentração teórica do analito.

A concentração de β -cariofileno em 50% da amostra de óleo resina de *C. officinalis* é de 230 $\mu\text{g/mL}$. Os dados obtidos das análises e taxa de recuperação (TR) calculada, estão apresentados na Tabela 28.

Tabela 28 – Resultados obtidos no teste de exatidão para quantificação de β -cariofileno em óleo resina de *Copaifera officinalis*.

Nível de concentração (%)	Concentração de β -cariofileno ($\mu\text{g/mL}$)				TR (%)
	Amostra ^a	SQR ^b	Teórica ^c	Experimental ^d	
60	230	4,60	234,60	260,16	110,89
100	230	22,99	252,99	319,37	126,24
140	230	41,38	271,38	341,89	125,98

Nota:^aconcentração da SQR na solução amostra a 50% sem fortificação; ^bconcentração da SQR adicionada a solução amostra a 50%; ^cconcentração teórica do analito na solução amostra final após fortificação; ^dconcentração experimental obtida por meio das corridas das amostras.

Para avaliação da exatidão foram aplicados os parâmetros de taxa de recuperação estabelecidos conforme o guia AOAC Guidelines for single laboratory validation of chemical methods for dietary supplements and botanicals (2002). Conforme o guia, a taxa de recuperação aceitável é dada em função da concentração do analito na amostra e do objetivo da análise, assim como, sua aplicabilidade, sendo os limites de recuperação modificados conforme a necessidade em vista da variabilidade dos resultados individuais. De acordo com os resultados da Tabela 24, as recuperações encontradas para a amostra foram superiores a 100%, resultado esperado no caso em que há distribuição típica de analitos majoritários, presentes em 100% ou perto de 100% do total da amostra.

Conforme descrito na literatura o óleo resina de espécies de *Copaifera* sp. são compostos por cerca de 90% da fração essencial, constituída por sesquiterpenos, o qual o componente majoritário é o β -cariofileno (Pinto, et al., 2000; Dias, et al., 2014; Trindade, et al., 2018). Estes dados corroboram com o presente estudo, em que o β -cariofileno é o sesquiterpeno majoritário, constituindo cerca de 35% do óleo resina de *C. officinalis* (item 5.3.1). Logo, neste caso da SQR ser o principal componente é esperado, conforme guia AOAC Guidelines for single laboratory validation of chemical methods for dietary supplements and botanicals (2002), que o valor da taxa de recuperação seja superior a 100%. Diante disso, as taxas de recuperação estão aceitáveis e o método analítico desenvolvido apresenta exatidão adequada.

5.5.7 Precisão

A precisão foi avaliada conforme critérios preconizados pela RDC n.166 (BRASIL,

2017), por meio da avaliação da repetibilidade e precisão intermediária, em seis soluções amostra a 100% da concentração da substância a ser quantificada, individualmente preparadas. Sendo a precisão do método analítico expressa pelo cálculo do desvio padrão relativo (DPR) de uma série de medidas considerando a concentração do analito na amostra; não admitindo valores superiores a 5%.

Conforme procedimento descrito no item 4.7.7.2 foram injetados seis vezes consecutivas em cromatógrafo a gás utilizando o método analítico desenvolvido para análise, a solução da SQR β -cariofileno e seis amostras de óleo resina de *C. officinalis* preparadas independentemente. Sendo para a repetibilidade n=6 e para precisão intermediária n=12. Os dados obtidos e analisados estatisticamente estão apresentados na Tabela 29.

Tabela 29 – Resultados obtidos no teste de repetibilidade (n=6) e precisão intermediária (n=12) para quantificação de β -cariofileno em óleo resina de *Copaifera officinalis*

Amostra	β -cariofileno		
	[] $\mu\text{g/mL}$	DPR n=6 ¹	DPR n=12 ²
1	0,423	0,92	0,85
2	0,429		
3	0,420		
4	0,423		
5	0,429		
6	0,421		
7	0,417	0,86	
8	0,409		
9	0,408		
10	0,410		
11	0,414		
12	0,409		
X	0,418		

Nota: ¹desvio padrão relativo da repetibilidade (n=6); ² desvio padrão relativo da precisão intermediária (n=12).

Visto que os DPR's apresentados para estudo da repetibilidade e da precisão intermediária obtidos são $\leq 5\%$, o método analítico desenvolvido é considerado preciso para a quantificação de β -cariofileno em óleo resina de *C. officinalis*.

5.5.8 Robustez

A susceptibilidade do método analítico desenvolvido à pequenas variações foi avaliada conforme parâmetros preconizados na RDCn.166 (BRASIL, 2017), sendo estes para cromatografia gasosa a manutenção ou obtenção de resultados similares mesmo quando for utilizado colunas de diferentes lotes ou fabricantes; temperatura do forno e velocidade do gás de arraste. Além disso, foi avaliado o parâmetro de solubilização da amostra, verificando a interferência ou não da utilização do banho ultrassônico. A determinação da robustez foi avaliada por meio da diferença observada na média e desvio padrão relativo ($\leq 2\%$) das áreas e tempo de retenção, em triplicatas independentes, da solução SQR β -cariofileno (Quadro 2) e do marcador químico β -cariofileno na solução amostra de óleo resina de *C. officinalis* (Quadro 3).

Quadro 2 – Dados obtidos nas análises da solução da SQR β -cariofileno condição inicial^a vs condições alteradas^b.

Variável	Padrão β -cariofileno			
	Área % ^a	TR (min) ^a	Área % ^b	TR (min) ^b
Coluna	89,47	19.814	91,90	18.795
	89,73	19.813	91,75	18.825
	89,45	19.820	91,86	18.808
X	89,55	19.816	92,0	18.809
DPR	0,17	0,02	0,08	0,08
Temperatura do forno	89,47	19.814	89,08	19,805
	89,73	19.813	89,07	19,813
	89,45	19.820	89,03	19,817
X	89,55	19.816	89,06	19,811
DPR	0,17	0,02	0,03	0,03
Fluxo do gás de arraste	89,47	19.814	89,44	19,814
	89,73	19.813	89,5	19,811
	89,45	19.820	89,54	19,812
X	89,55	19.816	89,49	19,812
DPR	0,17	0,02	0,06	0,007
Dissolução	89,47	19.814	89,41	19,818
	89,73	19.813	89,31	19,816
	89,45	19.820	89,37	19,817
X	89,55	19.816	89,37	19,817
DPR	0,17	0,02	0,06	0,005

Nota: ^a valores médios da triplicata da solução de SQR β -cariofileno analisado na condição cromatográfica inicial (item 4.7.9). ^bvalores médios da triplicata da solução de SQR β -cariofileno analisado na condição cromatográfica alterada (item 4.7.9).

Quadro 3 – Dados obtidos nas análises da amostra de *Copaifera officinalis* condição inicial^a vs condições alteradas^b.

Variável	Óleo resina de <i>C. officinalis</i> L.					
	Área % ^a	Teor $\mu\text{g/mL}^a$	TR (min) ^a	Área % ^b	Teor $\mu\text{g/mL}^b$	TR (min) ^b
Coluna	41,64	0,423	19.768	36,80	0,363	18.823
	42,19	0,429	19.759	36,50	0,360	18.818
	42,21	0,429	19.771	36,51	0,360	18.824
X	42,0	0,427	19.766	37,0	0,361	18.822
DPR	0,77	0,44	0,03	0,46	0,48	0,017
Temperatura do forno	41,64	0,423	19.768	41,57	0,422	19,766
	42,19	0,429	19.759	41,34	0,42	19,765
	42,21	0,429	19.771	41,44	0,421	19,779
X	42,0	0,427	19.766	41,45	0,421	19,77
DPR	0,77	0,44	0,03	0,2782283	0,2375297	0,039505562
Fluxo do gás de arraste	41,64	0,423	19.768	40,05	0,407	19,745
	42,19	0,429	19.759	40,31	0,409	19,745
	42,21	0,429	19.771	39,96	0,406	19,749
X	42,0	0,427	19.766	40,10	0,407	19,746
DPR	0,77	0,44	0,03	0,45	0,375	0,01
Dissolução	41,64	0,423	19.768	38,64	0,393	19,76
	42,19	0,429	19.759	38,65	0,393	19,754
	42,21	0,429	19.771	39,68	0,403	19,744
X	42,0	0,427	19.766	38,99	0,396	19,752
DPR	0,77	0,44	0,03	1,53	1,45	0,04

Nota: ^avalores médios do marcador químico β -cariofileno em óleo resina de *C. officinalis* L. analisados na condição cromatográfica inicial (item 4.7.9)

^bvalores médios do marcador químico β -cariofileno em óleo resina de *C. officinalis* L. analisados na condição cromatográfica alterada (item 4.7.9)

Os dados de área (%) e tempo de retenção do marcador químico β -cariofileno no óleo resina de *C. officinalis*; assim como, da solução de SQR β -cariofileno, não apresentaram diferenças significativas no valor médio da triplicata realizada e DPR ao proceder as análises no método analítico com as pequenas alterações cromatográficas propostas (item 4.7.9).

Vale ressaltar que as condições alteradas foram realizadas em outro cromatógrafo a gás que apresenta maior sensibilidade; propiciando a interferência de picos minoritários, na qual a detecção altera a porcentagem de área total. Tal observação pode justificar a maior diferença da SQR no óleo resina de *C. officinalis* ,

consequentemente, em seu teor. No entanto, mesmo com a diferença observada entre os valores quantificados de β -cariofileno (Quadro 3), os teores detectados estão dentro da faixa de trabalho linear do método analítico. Diante disso, conclui-se que o método apresentou-se robusto, não sendo susceptível à pequenas alterações na condição cromatográfica.

5.6 Quantificação do marcador químico β -cariofileno no óleo resina de *Copaifera officinalis* L. por CG-EM

Utilizando-se o método analítico desenvolvido item 5.3, conforme condições cromatográficas definidas; a análise por CG-EM utilizando rampa de temperatura programada com temperatura inicial 60 °C, acrescido de 4 °C/min até T 200 °C; seguido de acréscimo de 15 °C/min até a temperatura final de 280 °C permanecendo por 5 minutos até o final; totalizando uma corrida cromatográfica de 45 minutos; permitiu a quantificação do marcador químico β -cariofileno no óleo resina de *C. officinalis*.

O teor do marcador químico foi calculado pela equação:

$$[\beta - \text{cariofileno no OR}] = \frac{A\% \text{ OR} \times [\text{SQR } \beta - \text{cariofileno}]}{A\% \text{ SQR } \beta - \text{cariofileno}}$$

Em que, A% são áreas sob o pico obtidas nas análises por CG-EM nas condições cromatográficas desenvolvidas; OR é o óleo resina de *Copaifera officinalis*; SQR de β -cariofileno é a solução padrão utilizada.

A partir da densidade da SQR β -cariofileno, D= 0,908 g/mL foi calculada a massa do analito referente ao volume de 1 μ L, utilizado para análise, visto que a SQR trata-se de uma substância líquida volátil. Obtendo-se assim, a massa de 0,908 μ g de β -cariofileno na solução padrão analisada no método analítico proposto. Assim, calculou-se a concentração do marcador químico no óleo resina de *C. officinalis* pela equação citada acima. As análises para obtenção do teor de β -cariofileno foram realizadas em triplicata preparadas de forma independentes, conforme item 4.6.1.1 (óleo resina de *C. officinalis*) e 4.6.1.2 (solução padrão de SQR β -cariofileno). Sendo

considerada as médias das áreas sob o pico (%) de β -cariofileno das réplicas de óleo resina de *C. officinalis* e das soluções de padrão SQR β -cariofileno. Diante disso, o método analítico por CG-EM proposto determinou que o teor de β -cariofileno no óleo resina de *Copaifera officinalis* é 0,460 $\mu\text{g/mL}$.

5.7 Desenvolvimento de formulação farmacêutica de óleo resina de *Copaifera officinalis*

5.7.1 Estudos de pré-formulação

5.7.1.1 Seleção de excipientes grau farmacêutico

Em um estudo *in vivo* de atividade antiedematogênica por edema de pata induzido por carragenina, uma microemulsão carregada com 6% de óleo resina de copaíba propiciou uma redução mais efetiva do edema quando comparada com microemulsões com 10 e 12% do ativo (Neves, 2013). Mais recentemente, LEITE, Viviane Vasconcelos e colaboradores (2022) demonstraram que formulações farmacêuticas com 7% e 10% de óleo resina de *C. officinalis* L. em óleo de girassol propiciaram uma maior proliferação de fibroblastos quando comparadas ao controle dimetilsulfóxido – DMSO 50% ($p < 0,001$). Assim, esse estudo mostrou que a partir de 7%, o óleo resina de copaíba induz a proliferação de células essenciais para o processo de cicatrização, sendo a concentração de 10% mais efetiva. Já nas concentrações de 12%, 15% e 100% houve uma redução na proliferação celular de forma dose dependente.

Importante ressaltar que 10% é a concentração indicada no Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2011). No entanto, também foram encontrados relatos de nanoemulsões carregadas com 20% deste princípio ativo (DIAS, Daiane de O. et al., 2014; LUCCA, Letícia G. et al, 2015). Assim, a partir da análise dos dados de eficácia e segurança obtidos na literatura, selecionamos três concentrações de óleo resina de copaíba para ser avaliadas nas formulações em desenvolvimento: 20, 15 e 10%p/p. A proposta era ver a capacidade da formulação em desenvolvimento em carregar o ativo nas principais concentrações descritas na literatura como seguras e eficazes.

5.7.1.2 Avaliação da solubilidade do óleo resina de *Copaifera sp.* em diferentes excipientes

Dentre os excipientes selecionados, a partir do levantamento literário, para avaliar o potencial de solubilização do óleo resina de copaíba, os excipientes X5 e X8 foram os mais promissores, formando uma única fase na proporção de 1:1, mesmo sem auxílio de homogeneização em banho ultrassônico. Já para os excipientes X10 e X12 observamos separação de fases, mesmo quando realizada a etapa de homogeneização por 10 minutos em banho ultrassônico. Assim, selecionamos como componentes da fase oleosa da formulação o óleo resina de copaíba associado aos excipientes X5 e X8, na proporção de 1:1.

5.7.2 Desenvolvimento das formulações

Após a seleção dos excipientes com maior capacidade de solubilização do óleo resina de copaíba; iniciamos a seleção dos excipientes para compor a fase aquosa, de forma a proporcionar a formação da espuma medicamentosa. Os excipientes selecionados (Tabela 16) foram avaliados em diferentes proporções até se obter uma espuma medicamentosa com os atributos desejados (leveza, consistência, boa espalhabilidade). Com exceção dos excipientes necessários, X1 (veículo/solvente) e X2 (antioxidante); a proporção dos demais excipientes foram variadas resultando no desenvolvimento de 15 (quinze) formulações.

Como forma de desafiar a estabilização do ativo na formulação, inicialmente avaliamos uma concentração de 20% p/p. No entanto, ao reduzimos a concentração para 15% p/p verificamos uma melhor estabilização da espuma, que foi ainda aprimorada na concentração de 10% p/p.

Após 24 horas da produção de cada formulação (Tabela 17), os aspectos macroscópico e sensorial da espuma formada eram avaliados. Na F1 observamos que o óleo resina de copaíba não se solubilizou adequadamente nos excipientes, levando à remoção dos excipientes X10 e X12. Na F2 observamos uma viscosidade superior ao desejado para uma espuma medicamentosa, levando à redução das proporções p/p de X5 e X9 e no aumento de X8.

A formulação F3 também não foi adequada, sendo observada uma inadequação na proporção de X5 e X8, o que alterou a solubilização do óleo resina de copaíba levando à separação da formulação em duas fases, que mesmo com agitação não se tornava homogênea. Assim, optou-se por seguir com a menor porcentagem p/p de X9; e igualamos a porcentagem p/p de X5 e X8, adicionando ambos na proporção de 20%, sendo observada a completa solubilização do óleo resina de copaíba (F4). Porém, o aumento na proporção de ambos excipientes levou à uma redução na viscosidade da formulação F4, levando à necessidade de redução de X8 (formulação F5). No entanto, a formulação F5 continuou apresentando baixa viscosidade.

Ao avaliarmos o conjunto dos dados obtidos verificamos que as formulações apresentavam viscosidade próxima à desejada quando os excipientes X5 e X8 estavam na mesma proporção p/p. Diante disso, desenvolveu-se a F6, na qual X5 e X8 foram alterados de forma a apresentarem a mesma porcentagem p/p, sendo mantidos os demais excipientes. Como a formulação F6 apresentou pouco aumento da viscosidade e a espuma formada não se apresentou estável, a formulação F7 foi proposta, sendo reduzidos os excipientes X5 e X8 e aumentado o excipiente polimérico X7. A formulação F7 apresentou viscosidade adequada, boa textura e sensorial suave na aplicação tópica. Entretanto, a espuma formada apresentou-se instável. Assim, na formulação F8 aumentamos o polímero X9, mas um sensorial “plastificante” foi observado. Portanto na formulação F9 a porcentagem p/p de X9 foi reduzida e acrescentamos o excipiente X11 visando a formação de rede polimérica na espuma sem o efeito “plastificante”.

A formulação F9 apresentou uma espuma mais estável, porém com baixa viscosidade. Assim adicionamos o excipiente X6 para favorecer a formação de uma fina camada contínua (formulação F10). A formulação F10 não propiciou a obtenção de espuma adequada, levando à remoção do excipiente X11 e redução do excipiente X7 (formulação F11).

A formulação F11 apresentou maior formação de espuma, mas ainda com poucas bolhas e baixa estabilidade. Visto que o aumento do veículo propiciou uma melhor formação de espuma; reduzimos a proporção p/p dos excipientes solubilizantes do óleo resina de copaíba, mantendo-os proporcionalmente iguais para não ocorrer separação de fases, e aumentamos o volume do veículo (Formulação F12).

Na formulação F12 verificamos que uma limitação poderia ser a porcentagem alta do princípio ativo (20% p/p), que devido ao aspecto resinoso estava dificultando a formação da espuma. Assim, na formulação F13 reduzimos o ativo para 15% p/p. A espuma formada na F13 apresentou estabilidade adequada, não escorrendo com facilidade da pele. Porém, o aspecto organoléptico sensorial não foi adequado, apresentando-se “plastificante” ao toque. Assim, reduzimos a porcentagem de X5 e X8, mantendo-os na mesma proporção para solubilização eficiente do ativo, e acrescentamos o excipiente X3, resultando na formulação F14.

A formulação F14 apresentou todos os atributos adequados, possuindo viscosidade ideal, formação de espuma estável ao aplicar à pele e sensorial cremoso, hidratante, com toque suave. Entretanto, visando estudos posteriores e o desenvolvimento de um ensaio clínico piloto para comprovação da eficácia e efetividade da espuma medicamentosa desenvolvida; acrescentamos à formulação os excipientes X4 e X13 para adequada conservação da formulação. Adicionalmente, reduzimos a concentração do óleo resina de copaíba para 10% p/p, visando uma segurança maior, visto ser essa a concentração mais estudada na literatura (formulação F15). A formulação F15 manteve os atributos da F14, sendo selecionada para a etapa de caracterização da forma farmacêutica.

5.8 Caracterização da espuma medicamentosa de óleo resina de *Copaifera officinalis* desenvolvida

5.8.1 Densidade Relativa

Utilizando um picnômetro (10mL, 13,2367g) obteve-se a massa da água (0,4357g/10mL) e das formulações: 0,5954g/10mL (FOC1), 0,6347g/10mL (FOC2) e 0,6149g/10mL (FOC3). Os dados obtidos experimentalmente foram então aplicados à fórmula de DR (tópico 4.10.1) obtendo-se a densidade relativa das formulações: 0,137g/mL (FOC1), 0,146g/mL (FOC2) e 0,141g/mL (FOC3).

Segundo de Falusi, Fanni e colaboradores (2022) que aplicou a abordagem “*Quality by Design* – QbD” definindo atributos críticos para espumas, a DR das mesmas devem ser $\leq 0,5$. Comparando 11 espumas produzidas com diferentes tipos e concentrações de polímeros, obteve-se DR de 0,203g/mL para a formulação isenta de polímero e DR

máxima de 0,435g/mL para outras formulações, com diferentes tipos e concentrações de polímero; sendo observado o aumento da DR à medida que aumentou-se a concentração de polímero.

Diante disso, a DR da formulação desenvolvida encontra-se dentro da faixa preconizada na literatura ($\leq 0,5$), sendo esperado uma DR baixa devido o constituinte polimérico da formulação se encontrar em uma concentração mais baixa (X7, 3% p/p).

5.8.2 Avaliação da capacidade de formação de espuma e estabilidade

Na avaliação da capacidade de formação da espuma e sua estabilidade foram obtidos: expansão da espuma – EE %, estabilidade do líquido da espuma – ELE % e estabilidade do volume da espuma EVE % (Tabela 30), utilizando o método do cilindro (4.10).

Tabela 30 – Avaliação da capacidade de formação de espuma e estabilidade utilizando o método do cilindro.

Amostra	Volume formulação (mL)	Volume espuma (mL)	Volume formulação (mL)	Volume espuma (mL)
	t_0	t_0	t_{30}	t_{30}
FOC 1	56,0	85,0	23,0	44,0
FOC 2	58,0	89,0	21,0	48,0
FOC 3	56,0	86,0	24,6	50,0

Apesar desses parâmetros serem citados na literatura, não foram encontrados valores de referência para eles. No entanto, quando avaliamos os resultados apresentados é possível observar que mesmo após 30 minutos ainda observamos cerca de 50% do volume inicial da espuma, fornecendo um indício da estabilidade da espuma obtida a partir da formulação desenvolvida.

5.8.2.1 Capacidade da espuma (k)

A partir dos dados obtidos (Tabela 30), e utilizando a fórmula descrita no tópico 4.10.2, a capacidade do fluido para formar a espuma foi de 1,52; 1,53 e 1,53, respectivamente para as formulações FOC1; FOC2 e FOC3.

De acordo com Hoc, Dagmara; Haznar-garbacz, Dorota (2021), esse permite a caracterização da espuma líquida desenvolvida, sendo de suma importância, visto a

dinamicidade do sistema. Uma boa capacidade em formar a espuma tem relação linear com a expansão da espuma. Portanto, quanto maior a capacidade do fluido em formar a espuma, maior é taxa de espumabilidade da formulação. Valores acima de 1 fornecem evidência de uma boa capacidade de formação de espuma (Farkas, et al., 2019). Assim, a formulação desenvolvida encontra-se adequada, apresentando boa capacidade de formação de espuma.

5.8.2.2 Expansão da espuma (espumabilidade/taxa de espuma) – EE

Utilizando os dados obtidos (Tabela 30) pelo método do cilindro (4.10), e aplicando a fórmula de EE (tópico 4.10.3), obtivemos as taxas de espuma das formulações (Tabela 31).

Segundo Falusi, Fanni e colaboradores (2022), a taxa de expansão da espuma deve ser $\geq 100\%$. Nas formulações desenvolvidas por esses autores, as formulações que apresentaram maior espumabilidade foram as com taxa de expansão de espuma acima de 150%; sendo que das 11 espumas desenvolvidas o menor EE foi de 126%. Esses autores observaram que a presença de polímeros na composição das formulações interferia no valor de expansão da espuma. As formulações isentas de polímero apresentaram altos valores de taxa de expansão de espuma ($172\% \pm 15,7$), assim como as formulações com polímeros de baixo peso molecular ($X=178 \pm 1,41$). No entanto, as formulações com polímeros de alto peso molecular em baixa concentração (0,1 e 0,2% p/p) apresentaram taxas de espuma menores ($130\% \pm 3,33$). Esses resultados mostram uma interferência do tipo e concentração do polímero na espumabilidade da formulação, sendo esperadas variações nas taxas de EE%.

Tabela 31 – Expansão da espuma (EE) das formulações.

Formulação	EE	EE obtida (%)
FOC1	$\frac{85 - 56}{56} \times 100\%$	51,79
FOC2	$\frac{89 - 58}{58} \times 100\%$	53,44
FOC3	$\frac{86 - 56}{56} \times 100\%$	53,57
X	-----	52,93 ± 0,9

Diante do exposto acima, identificamos que formulação desenvolvida no presente trabalho apresentou valores de EE % abaixo da especificação recomendada pela literatura ($\geq 100\%$). No entanto, esse resultado pode ser explicado pela composição da espuma desenvolvida (tópico 4.9.2), onde estão presentes excipientes que possuem grandes cadeias poliméricas e em percentagens maiores do que as utilizadas no estudo apresentado acima (0,2% vs 3% p/p) (Tabela 17).

5.8.2.3 Estabilidade do líquido da espuma – ELE

A ELE foi calculada a partir dos dados experimentais apresentados na Tabela 30, utilizando a fórmula descrita no tópico 4.10.4. Como pode ser observado na Tabela 28, a média da ELE obtida para a triplicata da formulação desenvolvida foi de 42%, o que permite inferir que o líquido que forma a espuma é estável. Conforme dados da literatura, quanto menor o valor de ELE ($\leq 50\%$), mais estável é a espuma produzida pelo líquido. Observando-se os dados experimentais obtidos (Tabela 32) pode-se inferir que a formulação desenvolvida produz espuma estável.

Entretanto, a estabilidade da espuma é um critério difícil de se determinar e desenvolver; devido a alta dinamicidade do sistema e fatores estáticos que o influenciam. As espumas podem se desintegrar por diversos processos distintos, influenciando sua estabilidade e dificultando a medição deste parâmetro, para o qual não há informações relatadas nas principais farmacopeias (Arzhavitina, A.; Steckel, H., 2010; Gennari, *et al.*, 2019; Falusi, *et al.*, 2022; Kumar, *et al.*, 2022).

Tabela 32 – Estabilidade do líquido da espuma (ELE) das formulações desenvolvidas.

Formulação	ELE	ELE obtido (%)
FOC1	$\frac{23}{56} \times 100\%$	41,07
FOC2	$\frac{24}{57} \times 100\%$	42,10
FOC3	$\frac{24,6}{56} \times 100\%$	43,93
X	-----	42,37 ± 1,44

5.8.2.4 Estabilidade do volume da espuma – EVE

Utilizando a fórmula descrita no tópico 4.10.5 e os dados experimentais apresentados na Tabela 30, foi calculado a estabilidade do volume da espuma (Tabela 33). Como pode ser observado, a espuma desenvolvida apresentou estabilidade do volume de espuma médio de 56,20%. De acordo com a literatura, quanto maior o valor de estabilidade do volume de espuma maior estabilidade da mesma, pois este indica a taxa de colapso da formulação (Arzhavitina, A.; Steckel, H., 2010; Kumar, *et al.*, 2022; Falusi, *et al.*, 2022).

A EVE é um parâmetro importante para garantir que o princípio ativo tenha tempo de contato suficiente para exercer seu efeito (Kamal muhammad shahzad, 2019). Segundo Falusi, Fanni e colaboradores (2022) o ideal é que o EVE seja $\geq 50\%$. No estudo conduzido por esses pesquisadores, as formulações mais estáveis apresentaram EVE acima de 70%. Assim, embora para a formulação desenvolvida o EVE encontre-se abaixo de 70%, está acima de 50% (~57%), o que é um indício de uma formulação estável.

Tabela 33 - Estabilidade do volume da espuma (EVE) das formulações desenvolvidas.

FORMULAÇÃO	EVE	EVE OBTIDO (%)
FOC1	$\frac{48}{85} \times 100\%$	56,47
FOC2	$\frac{48}{87} \times 100\%$	55,17
FOC3	$\frac{49}{86} \times 100\%$	56,98
X	-----	56,20 ± 0,76

5.8.3 Tempo de expansão da espuma

O tempo de expansão da espuma foi determinado conforme descrito no tópico 4.10.6, sendo obtidos os seguintes valores para 30mL de expansão: 38, 7 segundos (FOC1); 34,3 segundos (FOC2) e 39 segundos (FOC3) (Tabela 34). Segundo Farkas e colaboradores (2019), o tempo gasto para preencher 30 mL da bureta não pode exceder 5 minutos em nenhuma das medições realizadas. Assim, os resultados obtidos para o tempo de expansão da espuma encontram-se de acordo com o preconizado na literatura; sendo o tempo gasto para preencher o volume de 30mL aproximadamente 10 vezes menor que o valor máximo preconizado (300 segundos).

Tabela 34 – Tempo de expansão da espuma.

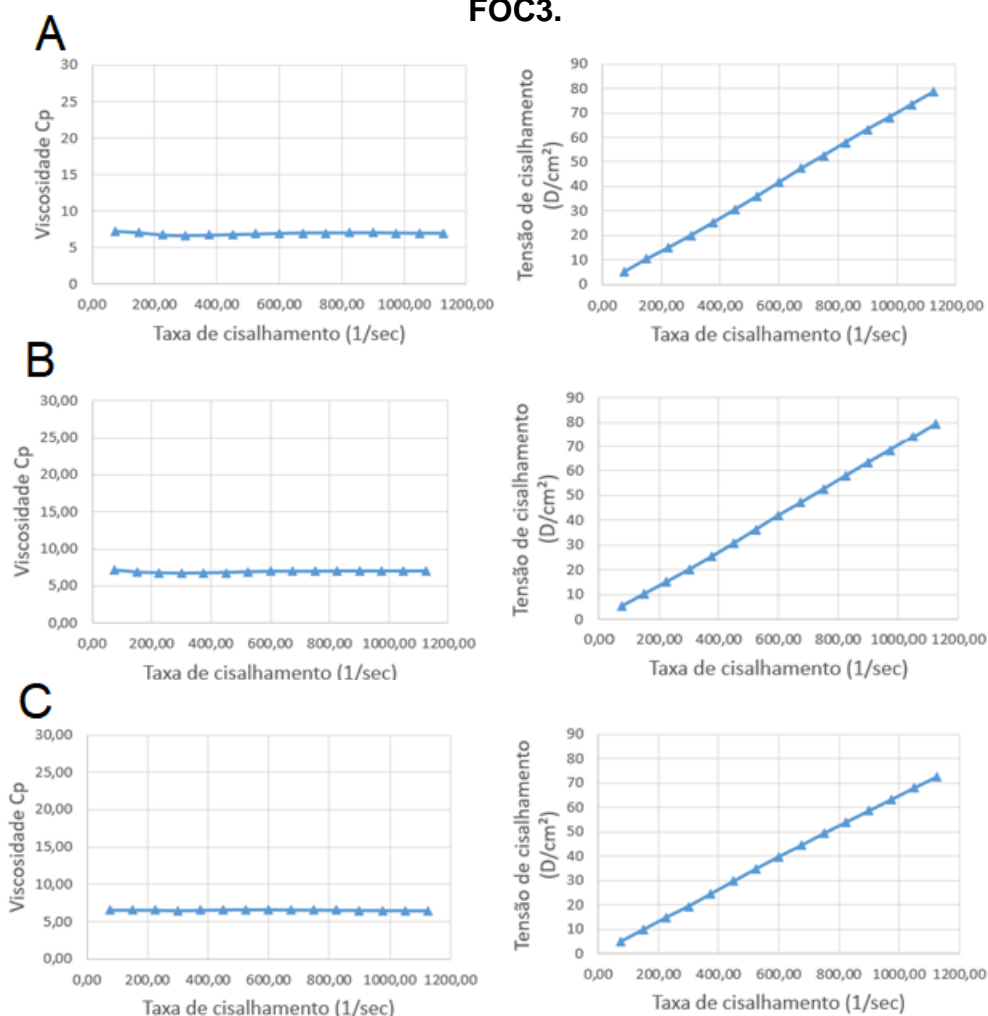
FORMULAÇÃO	TEMPO ATÉ 30ML			
	t1(s)	t2(s)	t3(s)	X(s)
FOC 1				
FOC 2	38	39	39	38,67 ± 0,6
FOC 3	34	34	35	34,33 ± 0,6
X	38	39	40	39 ± 1

5.8.4 Viscosidade

A viscosidade é um parâmetro que influencia a estabilidade da espuma e sua aplicação tópica. Para as espumas medicamentosas desenvolvidas os seguintes valores de viscosidade foram obtidos: 6,94cP (FOC1), 6,94cP (FOC2) e 6,54cP

(FOC3) (Figura 31 A, B e C respectivamente).

Figura 31 – A: Dados experimentais de viscosidade FOC1; B: Dados experimentais de viscosidade FOC2; C: Dados experimentais de viscosidade FOC3.



Fonte: desenvolvido pela autora mediante dados da pesquisa.

No estudo conduzido por Falusi e colaboradores (2022), a faixa de aceitação para este atributo foi de 20 a 200 cP. Assim, os resultados obtidos estão abaixo do alvo determinado por esses autores. No entanto, esta faixa de aceitação não pode ser considerada de forma absoluta para todas as formulações, visto que a concentração e tipo de surfactante, bem como os polímeros utilizados influenciam fortemente na viscosidade da formulação. Quando avaliamos os resultados obtidos para identificar o comportamento reológico da formulação desenvolvida (Figura 31 A, B e C respectivamente) é possível observar um perfil Newtoniano, onde a viscosidade não é alterada pela taxa de cisalhamento, havendo uma relação linear entre tensão e taxa de cisalhamento.

5.8.5 Espalhabilidade

A espalhabilidade denota a extensão da área na qual a formulação tópica se espalha quando aplicada à pele, contribuindo para sua eficácia terapêutica (UGANDAR, R. E.; DEIVI, K. Sakthy., 2013). No caso das espumas, é recomendado que se espalhem sem a necessidade de força, toque ou dispositivos de aplicação, como acontece com outras formas farmacêuticas de uso tópico (FALUSI *et al.*, 2022).

Na avaliação da espalhabilidade da espuma desenvolvida, que se espalhou de forma circular, os raios medidos foram de 5,8cm (FOC1); 5,9cm (FOC2) e 6,5cm (FOC3), correspondendo às seguintes áreas: 18,21cm² (FOC1), 18,52cm² (FOC2) e 20,41cm² (FOC3). Embora não tenhamos encontrado um valor de referência na literatura, as áreas encontradas fornecem um indício de uma boa espalhabilidade, propiciando o tratamento da área de forma mais fácil.

5.8.6 pH

A avaliação do pH das triplicatas da formulação resultou em um valor médio de pH de 5,2 (Tabela 35).

Tabela 35 – Valores de pH das triplicatas da formulação desenvolvida

Formulação	pH	Temperatura °C
FOC1	5,13	26,10
FOC2	5,18	25,40
FOC3	5,21	25,20
X	5,17 ± 0,03	25,60 ± 0,40

De acordo com Lambers, Hans e colaboradores (2006) as formulações tópicas devem apresentar pH dentro da faixa de 4,0 a 8,0. Assim, a formulação desenvolvida apresentou um pH adequado para aplicação tópica.

5.8.7 Avaliação macroscópica

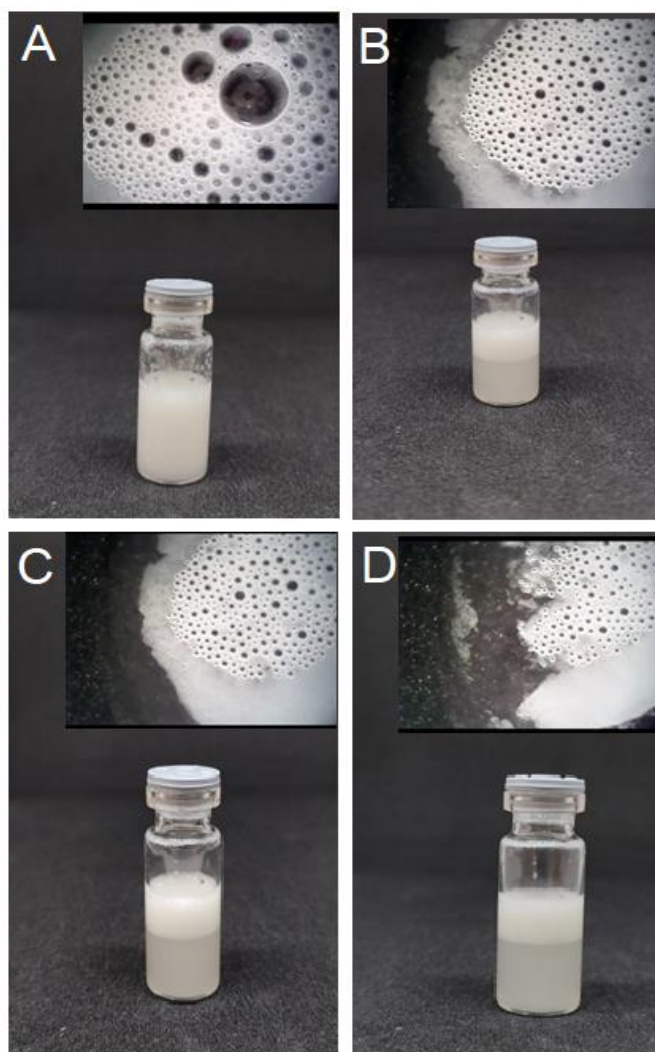
A avaliação macroscópica permite a identificação da aparência geral da formulação e da espuma obtida; possibilitando a observação do tamanho das bolhas, se são finas ou grossas; da distribuição do tamanho das bolhas e da viscosidade aparente, observando se a formulação é viscosa ou aquosa (KUMAR *et al.*, 2022).

Os registros fotográficos oriundos da observação macroscópica da formulação nos tempos 0, 10, 20 e 30 minutos estão apresentados na Figura 32. Como pode ser observado, após 30 minutos ainda é possível visualizar a presença de espuma, estando este registro concordante com os resultados acima apresentados, fornecendo mais uma evidência da estabilidade da espuma da formulação.

Importante observar também que a formulação desenvolvida é bifásica, apresentando separação das fases entre os tempos 0 e 10 minutos, porém é de fácil homogeneização. Com relação ao aspecto da espuma desenvolvida, é possível inferir que essa apresenta uma homogeneidade na distribuição e tamanho das bolhas de ar, que são mais finas e pequenas, apresentando poucas bolhas de tamanhos médio a grande. Conforme dados da literatura, essa é a condição ideal, visto que um maior número de bolhas médias e grandes favorece a desestabilização do sistema, levando à coalescência (FALUSI *et al.*, 2022).

Adicionalmente, pode-se observar que as imagens macroscópicas da espuma desenvolvida (Figura 32) está em concordância com os resultados acima apresentados, fornecendo mais uma evidência da estabilidade da espuma da formulação. Também é possível observar que a espuma desenvolvida neste trabalho apresenta aspecto similar às espumas descritas na literatura, as quais também foram veiculadas em frasco pump sem propelente (Figura 33).

Figura 32 - Aspecto macroscópico da formulação espuma de óleo de copaíba ao longo de 30 minutos. A – 0 minuto; B – 10 minutos; C – 20 minutos; D – 30 minutos.



Fonte: dados da presente pesquisa.

Figura 33 – Espuma sem propelente



Fonte: Farkas, et al., 2019.

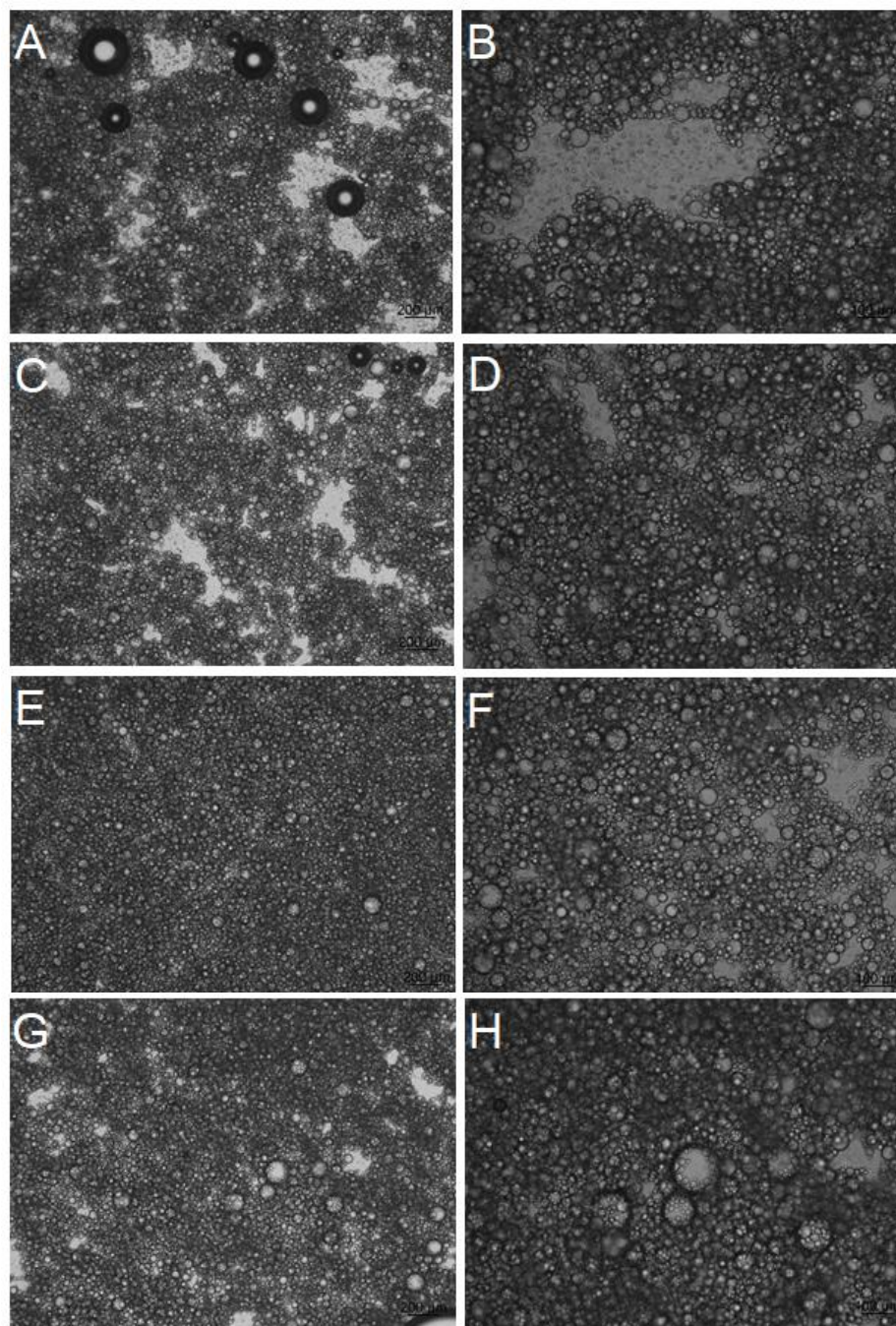
5.8.8 Avaliação microscópica

A análise microscópica da espuma preparada a partir da formulação líquida permite obter mais informações sobre a uniformidade da espuma e a homogeneidade das bolhas de ar, visualizando o tamanho, o arredondamento e a proporção das bolhas de ar incorporadas, bem como a quantidade de bolhas em uma área predeterminada. As análises microscópicas também permitem observar a cinética de desestabilização da espuma, observando os tamanhos das bolhas após tempos determinados (Zhao, Yanjun., et al., 2009; Falusi, Fanni et al., 2022).

As imagens microscópicas da espuma desenvolvida estão ilustradas na Figura 34. Como podemos observar, em algumas regiões da espuma há homogeneidade do tamanho e distribuição das bolhas de ar; havendo várias camadas de bolhas se sobrepondo. Há também a presença de bolhas de ar de tamanhos maiores, que ocasionam a desestabilização da espuma ao longo do tempo; podendo ser visto a presença de espaços constituídos da formulação líquida. Já nas imagens que apresentam bolhas de ar pequenas, observa-se que as camadas apresentam-se uniformes e mais estáveis, não coalescendo facilmente e não havendo os espaços com a formulação líquida.

A obtenção de uma espuma com bolhas menores propicia maior estabilidade, pois a prevalência de bolhas menores favorece a estabilização da espuma. FALUSI, Fanni e colaboradores (2022) observaram que as espumas com bolhas maiores desde o tempo 0 são mais friáveis. Segundo esses mesmos autores, o tamanho das bolhas é dependente da concentração do polímero, que influencia na espessura das lamelas. Além disso, observa-se que a espuma desenvolvida é um sistema polidisperso, visto que há bolhas de ar de diversos tamanhos formando várias camadas que se sobrepõem. Ainda segundo Falusi e colaboradores (2022), as espumas constituem sistemas polidispersos, independente do polímero presente em sua composição.

Figura 34 : Imagens microscópicas da formulação espuma de óleo de copaíba. A - 0 minuto aumento 5X; B - 0 minuto aumento 10X; C - 10 minutos aumento 5X; D - 10 minutos aumento 10X; E - 20 minutos aumento 5X; F - 20 minutos aumento 10X; G - 30 minutos aumento 5X; H - 30 minutos aumento 10X.

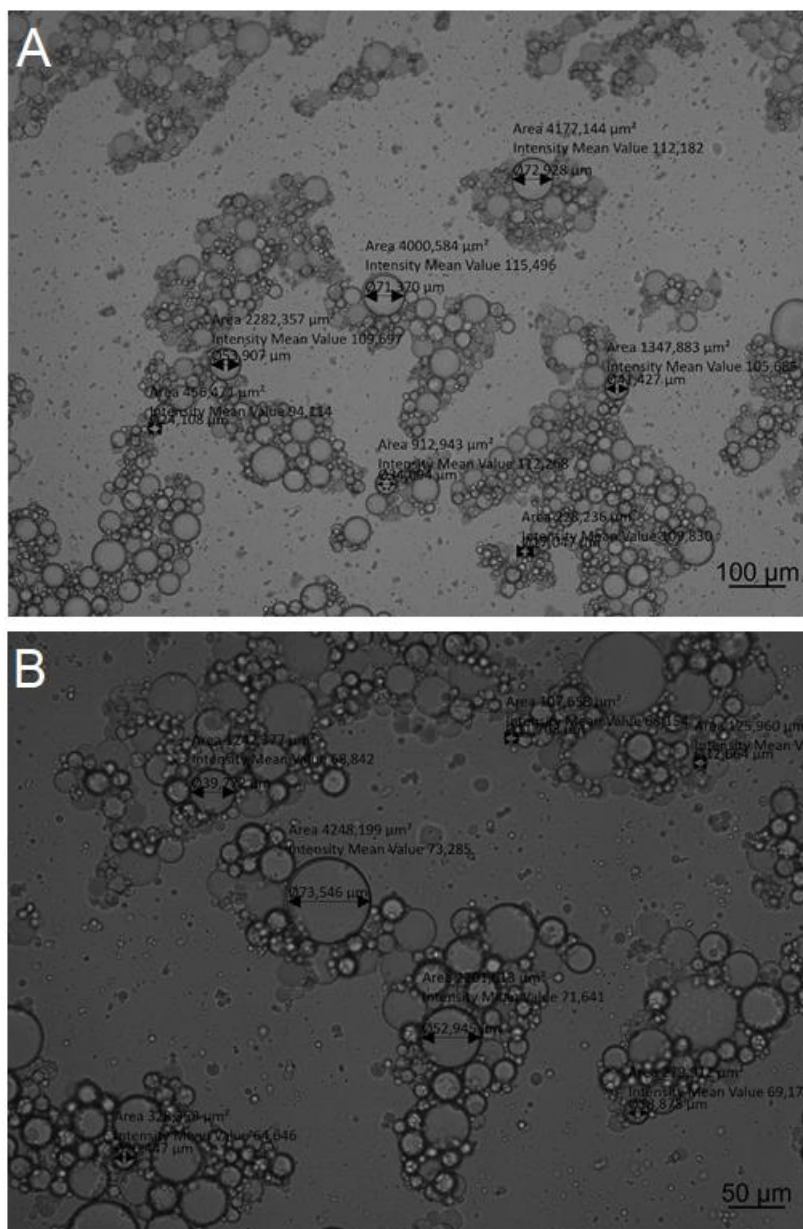


Fonte: dados da presente pesquisa.

A formulação líquida que forma a espuma também foi avaliada microscopicamente nos aumentos de 10X e 20X (Figura 35 A e B, respectivamente) . Nessas imagens é possível observar a polidispersabilidade do sistema, sendo visualizadas bolhas de ar de tamanhos variados, de 0,17 µm a 0,73 µm. Importante observar também que na formulação líquida há predominância de bolhas maiores em relação à espuma

formada a partir da mesma.

Figura 35 – A: Imagem microscópica da formulação líquida aumento 10X; B: Imagem microscópica da formulação líquida aumento 20X.



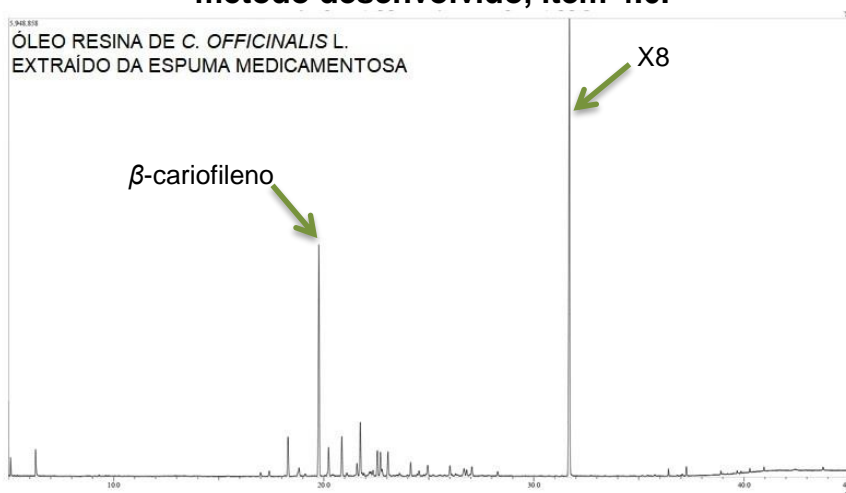
Fonte: dados da presente pesquisa.

5.9 Identificação do óleo resina de *Copaifera officinalis* veiculado na espuma farmacêutica desenvolvida

Com o objetivo de avaliar a concentração do marcador químico, β -cariofileno, na espuma farmacêutica foi desenvolvido método de extração do óleo de *C. officinalis*

no mesmo. A extração do óleo resina de *C. officinalis* da espuma farmacêutica foi realizada por partição líquido-líquido com hexano P.A. (item 4.10.1); na qual após extração exaustiva (três vezes com solvente), evaporou-se o solvente e concentrou-se o óleo resina. Posteriormente, realizou-se a análise do material extraído por CG-EM no método analítico desenvolvido e validado para a matéria prima. O cromatograma obtido está representado na Figura 36.

Figura 36 – Cromatograma do óleo resina de *C. officinalis* extraído da espuma medicamentosa, obtido por CG-EM, conforme condições cromatográficas do método desenvolvido, item 4.6.



O cromatograma obtido da análise do óleo resina veiculado na espuma farmacêutica apresenta as duas regiões de concentração de eluição de picos cromatográficos característicos do óleo resina de copaiba, mantendo o perfil químico característico das espécies do gênero conforme descrito na caracterização do óleo no presente estudo (item 5.2.2). Além disso, o marcador químico β -cariofileno (TR: 19,766 min), sesquiterpeno majoritário, constituinte da fração volátil do óleo resina de *C. officinalis* permaneceu como majoritário de acordo com a análise da matéria prima, entretanto apresentou área do pico reduzida, aproximadamente 20%, devido a presença do miristato de isopropila, componente da formulação.

A identificação das substâncias do óleo resina extraído da formulação farmacêutica desenvolvida, foi realizada por meio do espectro de massa obtido da amostra, com o banco de espectro da biblioteca NIST; o que possibilitou a confirmação da extração efetiva do óleo resina de *C. officinalis* L. da espuma farmacêutica, visto que, o excipiente no qual este apresentou maior solubilidade e compatibilidade foi detectado

na análise por CG-EM; X8, TR:31,695min. Além disso, outras substâncias identificadas na matéria vegetal bruta, também foram identificadas como constituintes do óleo veiculado na formulação. Os sesquiterpenos, copaeno (TR 18,299 min) β -cariofileno (TR 19,766 min), trans- α -bergamoteno (TR 20,229 min), humuleno (TR 20,859 min), germacreno D (TR 21,740 min), β -bisaboleno (TR 22,551 min), bem como os diterpenos, kolavelool (TR 37,262 min) e colavenato de metila (TR 40,285 min). Portanto, com os resultados, pode-se inferir que a extração proposta para o óleo resina da formulação foi efetiva; e mantém sua composição quando veiculado na forma farmacêutica espuma. Apresentando-se estável, sem alteração de seus constituintes ou formações de derivados e/ou impurezas.

Com o objetivo de estimar a concentração do marcador químico na espuma farmacêutica a 10% do óleo resina de *C. officinalis*, realizou-se o cálculo do teor por extrapolação de curva analítica de calibração obtida para matéria prima obtendo-se o teor de 0,209 $\mu\text{g/mL}$ de β -cariofileno na espuma farmacêutica. Como perspectiva futura o método analítico desenvolvido será validado para a quantificação do marcador químico no óleo resina veiculado na espuma farmacêutica.

6 RESUMO DOS RESULTADOS

O óleo resina de *Copaifera officinalis* é castanho dourado, de densidade relativa esperada para óleo; apresentando-se com densidade próxima à água (1,0170 g/mL). É líquido de viscosidade intermediária, 25,6498cP, não apresentando portanto, adulterantes como ácidos graxos que podem elevar à viscosidade.

O óleo resina de copaíba fazendo alusão ao nome é constituído por uma fração resinosa diluída na fração essencial. Constituição demonstrada pela caracterização química realizada por CCD e por CG-EM. Para análise qualitativa por CCD foi desenvolvido método que utilizou cromatoplaça de sílica gel, com espessura de 0,25 mm e fase móvel composta por sistema eluente com os solventes hexano:clorofórmio:acetato de etila. Com o método foi possível a identificação do marcador químico, o β -cariofileno. A caracterização por CG-EM, permitiu identificar os principais constituintes do óleo resina de espécies de copaíba diferenciar o óleo resina

do óleo essencial, devido a presença de duas regiões de concentração de picos eluídos, região rica em sesquiterpeno e região rica em diterpeno.

A análise por CG-EM, permitiu a caracterização de 64 componentes do óleo resina de *C. officinalis*; dentre os quais 49 são sesquiterpenos, sendo os majoritários: copaeno, β -cariofileno, trans- α -bergamoteno, humuleno, germacreno D, β -bisaboleno, germacreno B e 15 são diterpenos, sendo os majoritários kolavelool, colavenato de metila e ácido hardwickiico.

Foi desenvolvido e validado método analítico para quantificação do componente majoritário β -cariofileno do óleo resina de *C. officinalis*, matéria prima para o desenvolvimento de fitoterápico. O método apresentou-se seletivo, não apresentou efeito matriz, apresentou relação linear ($r^2 \geq 0,99$), sendo capaz de gerar respostas diretamente proporcional às concentrações do padrão β -cariofileno. O método apresentou-se exato (110-125%) e preciso (DPR $\leq 5\%$); limite de detecção e quantificação de 85,14 ($\mu\text{g/mL}$) e 258 ($\mu\text{g/mL}$), respectivamente e robustez quando submetido a variações de marca/lote de coluna cromatográfica, temperatura de forno, fluxo de gás de arraste e dissolução da amostra.

Foi desenvolvido e caracterizada uma espuma medicamentosa para a veiculação do óleo resina de *C. officinalis*. A espuma medicamentosa desenvolvida é bifásica e apresenta fácil homogeneização e aplicação, boa espalhabilidade sem toque (19 cm^2), taxa de espumabilidade 53%, capacidade de espuma 1,53 e pH adequado para aplicação tópica (5,2).

A espuma medicinal de óleo de copaíba apresenta toque suave e estabilidade, sendo uma alternativa potencial para o tratamento de afecções cutâneas, como inflamação, infecção e sensibilidade, como, a pele dos pacientes oncológicos acometida por lesões. De acordo com as indicações da matéria prima é passível de ter ação cicatrizante, anti-inflamatória e antimicrobiana, que serão avaliados em estudos futuros.

Diante de todos os resultados do presente trabalho, conclui-se que o óleo resina de *C. officinalis* é autêntico, sem impurezas ou adulterantes; pode ser veiculado em

espuma medicamentosa apresentando-se promissor para tratamentos tópicos; abrindo perspectiva para estudos futuros *in vitro* e *in vivo* comprovando os efeitos farmacológicos da espuma medicamentosa desenvolvida com este princípio ativo.

7 CONCLUSÕES

Com o desenvolvimento do trabalho foi possível determinar o perfil fitoquímico e caracterizar quimicamente o óleo resina e o óleo essencial de *C. officinalis*, sendo possível identificar no óleo resina 64 substâncias, das quais aproximadamente 76% são sequiterpenos e 23% diterpenos, sendo o constituinte majoritário o β -cariofileno, eleito como marcador químico para espécie. Foi realizada a caracterização organoléptica e físico-química do óleo resina, que demonstrou a autenticidade e pureza do óleo utilizado neste estudo.

Os métodos analíticos cromatográficos qualitativos e quantitativos desenvolvidos para o óleo resina de *C. officinalis* foram eficientes na determinação do perfil químico e caracterização das substâncias constituintes do óleo resina, assim como, possibilitou a quantificação do marcador químico β -cariofileno de acordo com as legislações vigentes. Abrindo a perspectiva de auxiliar a construção de uma monografia farmacopeica para a espécie *C. officinalis*.

Foi desenvolvido e caracterizado uma espuma medicamentosa veiculando o óleo resina de *C. officinalis*. Esta se demonstrou adequada para o objetivo proposto de desenvolvimento de formulação inovadora para o tratamento de lesões tópicas, incluindo pacientes oncológicos. Em adição, a formulação possibilitou a veiculação do Insumo Farmacêutico Ativo Vegetal (IFAV) sem prejuízo em sua constituição. Com isso, o trabalho abre perspectivas para a comprovação da eficácia e segurança da formulação e do IFAV em ensaios pré-clínicos e clínicos.

REFERÊNCIAS

- ACÁCIO, T. M. Controle de qualidade físico-químico e fitoquímica do óleo resina de *Copaífera* sp. (Copaíba). Monografia de Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) – Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2020.
- ALBUQUERQUE, Kelly Cristina Oliveira de et al. Brazilian Amazon traditional medicine and the treatment of difficult to heal leishmaniasis wounds with *Copaifera*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, 2017.
- AMORIM, J. M. Estudo químico e biológico para a padronização de extrato de *Costus spiralis* (Jacq.) Roscoe: quantificação de marcadores, avaliação da citotoxicidade e efeito nefroprotetor / Juliana Mendes Amorim. – 2017.
- ARRUDA, Caroline et al. Occurrence, chemical composition, biological activities and analytical methods on *Copaifera* genus—A review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 109, p. 1-20, 2019.
- ARZHAVITINA, A.; STECKEL, H. Foams for pharmaceutical and cosmetic application. *International journal of pharmaceutics*, v. 394, n. 1-2, p. 1-17, 2010.
- BARBOSA, Paula et al. Influence of abiotic factors on the chemical composition of copaiba oil (*Copaifera multijuga* Hayne): soil composition, seasonality and diameter at breast height. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, p. 1823-1833, 2012.
- Basf we create chemistry. **Technical Information Kollicoat® IR**. 03_030724e-12/Page 1 of 12 WF-No.: 130458. November 2015. Supersedes issue dated February 2013.
- BIKARD, Jérôme et al. Numerical simulation of 3D polyurethane expansion during manufacturing process. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 309, n. 1-3, p. 49-63, 2007.
- BLUME-PEYTAVI, Ulrike et al. A randomized, single-blind trial of 5% minoxidil foam once daily versus 2% minoxidil solution twice daily in the treatment of androgenetic alopecia in women. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 65, n. 6, p. 1126-1134. e2, 2011.
- BLUME-PEYTAVI, Ulrike et al. Follicular and percutaneous penetration pathways of topically applied minoxidil foam. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, v. 76, n. 3, p. 450-453, 2010.
- BRANDÃO, Maria das Graças Lins. et al. **Plantas medicinais um saber ameaçado**. Vídeo produzido pelo CEPLAMT. Museu de História Natural e Jardim Botânico da UFMG. 2006.
- BRANDÃO, Maria das Graças Lins. **Plantas úteis nativas do Brasil na obra dos naturalistas**. *Horticultura Brasileira*, v. 28, n. 2, p. 0-0, 2010.

BRASIL. Agência nacional de vigilância sanitária. ANVISA. Resolução RDC n. 166, de 24 de Julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências, 2017.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Formulário de Fitoterápicos 2ª edição Farmacopeia Brasileira. Brasília, 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/farmacopeia/formulario-fitoterapico/2022-fffb2-versao-13-mai-2022.pdf> .

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2011. 126p.

BRASIL. FARMACOPEIA Brasileira, 6a ed. v. 1. Brasília, DF: Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2019. 873 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Sec. de Ciência, Tecnologia, Inovação e Complexo da Saúde. Departamento de Assistência Farmacêutica – DAF. Plantas Medicinais e Fitoterápicos Política e Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos Plantas Medicinais de Interesse ao SUS – Rénisus. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/composicao/sectics/daf/pnpmf/ppnpmf/renisus> .Acesso em 10 de fevereiro de 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Política nacional de práticas integrativas e complementares no SUS : atitude de ampliação de acesso / Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. – 2. ed. – Brasília : Ministério da Saúde, 2015. 96 p. : il.

BROCK, Josiane et al. Determinação experimental da viscosidade e condutividade térmica de óleos vegetais. **Food Science and Technology**, v. 28, p. 564-570, 2008.

CAMPIERI, Massimo et al. Spread and distribution of 5-ASA colonic foam and 5-ASA enema in patients with ulcerative colitis. *Digestive diseases and sciences*, v. 37, p. 1890-1897, 1992.

CHOZE, Rafael et al. Técnicas de separação e identificação empregadas na análise de produtos naturais de plantas. 2004.

CORRÊA, M.P. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: IBDF, 1931. v.2, p.370-375.

COSTA, J.A.S. 2020. Copaifera in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <https://floradobrasil2020.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB22895>>. Acesso em 23 jan. 2023.

COUNCIL OF EUROPE. Medicated foams. In: European Pharmacopoea 90. 2016. p. 85.

CRUZ, C. M. Sistema de liberação de extrato de própolis para aplicação odontológica. 2013. 44f, Monografia de Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) – Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

DA SILVA MORAES, Thaís et al. Assessment of the antibacterial, antivirulence, and action mechanism of *Copaifera pubiflora* oleoresin and isolated compounds against oral bacteria. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 129, p. 110467, 2020.

DA TRINDADE, Rafaela; DA SILVA, Joyce Kelly; SETZER, William N. *Copaifera* of the Neotropics: A Review of the Phytochemistry and Pharmacology. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 5, p. 1511, 2018.

DE ALBUQUERQUE, K.C.O.; da Veiga, A.D.S.S.; da Silva e Silva, J.V.; Brigido, H.P.C.; Ferreira, E.P.D.R.; Costa, E.V.S.; Marinho, A.M.D.R.; Percário, S.; Dolabela, M.F. Brazilian Amazon traditional medicine and the treatment of difficult to heal leishmaniasis wounds with *Copaifera*. *Evid.-Based Complement. Altern. Med.* 2017, 2017.

DE AZEVEDO, Isabelle Campos et al. Tratamento de feridas: a especificidade das lesões oncológicas. **Saúde e Pesquisa**, v. 7, n. 2, 2014.

DE MATOS GOMES, Niele et al. Antineoplastic activity of *Copaifera multijuga* oil and fractions against ascitic and solid Ehrlich tumor. **Journal of ethnopharmacology**, v. 119, n. 1, p. 179-184, 2008.

DE MORAES, Alessandra Regina Dhorm Pimentel et al. Effects of nanoemulsions prepared with essential oils of copaiba-and andiroba against *Leishmania infantum* and *Leishmania amazonensis* infections. *Experimental parasitology*, v. 187, p. 12-21, 2018.

DE MOURA, C. V. R. et al. Caracterização físico-química de óleos vegetais de oleaginosas adaptáveis ao Nordeste Brasileiro com potenciais para produção de biodiesel. 2019.

DEGANI, Ana Luiza G.; CASS, Quezia B.; VIEIRA, Paulo C. Cromatografia um breve ensaio. *Química nova na escola*, v. 7, n. 1, 1998.

DIAS, Daiane de O. et al. Optimization of Copaiba oil-based nanoemulsions obtained by different preparation methods. *Industrial Crops and Products*, v. 59, p. 154-162, 2014.

DIAS, Daiane de O. et al. Optimization of headspace solid-phase microextraction for analysis of β -caryophyllene in a nanoemulsion dosage form prepared with copaiba (*Copaifera multijuga* Hayne) oil. *Analytica chimica acta*, v. 721, p. 79-84, 2012.

DIAS, Débora S. et al. Copaiba oil suppresses inflammatory cytokines in splenocytes of C57Bl/6 mice induced with experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Molecules*, v. 19, n. 8, p. 12814-12826, 2014.

DOS SANTOS, A.O.; Ueda-Nakamura, T.; Prado Dias Filho, B.; da Veiga Junior, V.F.; PINTO, A.C.; Nakamura, C.V. Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of *Copaifera*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2008, 103, 277–281. [CrossRef]

DOS SANTOS, Adriana Oliveira et al. *Leishmania amazonensis*: effects of oral treatment with copaiba oil in mice. **Experimental parasitology**, v. 129, n. 2, p. 145-151, 2011.

DOS SANTOS, Michael Torres et al. Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de massas (CG-EM) e suas diversas aplicações. *Anais Conbracis* | ISSN: 2525-6696. II Congresso Brasileiro de Ciências da Saúde, 2017.

DRAELOS, Zoe Diana et al. A phase 3 randomized, double-blind, vehicle-controlled trial of azelaic acid foam 15% in the treatment of papulopustular rosacea. *Cutis*, v. 96, n. 1, p. 54-61, 2015.

DWYER JD, 1951. As espécies da América Central, das Índias Ocidentais e da América do Sul de *Copaifera* (Caesalpiniaceae). *Brittonia*, 7(3):143-72.

EICHENFIELD, L. et al. Clinical safety and pharmacokinetics of FMX101 4% topical minocycline foam in pediatric patients for the treatment of moderate-to-severe acne vulgaris. *SKIN The Journal of Cutaneous Medicine*, v. 3, p. S2-S2, 2019.

ESTEVIÃO, L. R.; MEDEIROS, J. P.; BARATELLA-EVÊNCIO, L.; SIMÕES, R. S.; MENDONÇA, F. D. E. S.; EVÊNCIO-NETO, J. Effects of the topical administration of copaiba oil ointment (*Copaifera langsdorffii*) in skin flaps viability of rats. *Acta Cirurgia Brasileira*, v.28, n. 12, p. 863-869, 2013.

Estimativa 2023 : incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer. – Rio de Janeiro : INCA, 2022.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA (Ph. Eur.) 10th Edition | EDQM - European Directorate for the Quality of Medicines [Internet]. Available from: <https://www.edqm.eu/en/european-pharmacopoeia-ph-eur-10th-edition>.

FALUSI, Fanni et al. Investigation of the effect of polymers on dermal foam properties using the QbD approach. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 173, p. 106160, 2022.

FARKAS, Dóra; KÁLLAI-SZABÓ, Nikolett; ANTAL, István. Foams as carrier systems for pharmaceuticals and cosmetics. 2019.

FELDMAN, Steven R.; SANGHA, Namrata; SETALURI, Vijay. Topical corticosteroid in foam vehicle offers comparable coverage compared with traditional vehicles. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 42, n. 6, p. 1017-1020, 2000.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Guidance for industry: analytical procedures and methods validation**. 2000.

GALÚCIO, Cleyson de S. et al. Recuperação de sesquiterpenos do óleo-resina de copaíba a partir da destilação molecular. **Química Nova**, v. 39, p. 795-800, 2016.

GELMINI, F.; BERETTA, G.; ANSELMINI, C.; CENTINI, M.; MAGNI, P.; RUSCICA, M.; CAVALCHINI, A.; FACINO, R. M. GC-MS profiling of the phytochemical constituents of the oleoresin from *Copaifera langsdorffii* Desf. and a preliminary in vivo evaluation of its antipsoriatic effect. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 440, n. 2, p. 170-178, 2013.

GENNARI, Chiara GM et al. Medicated foams and film forming dosage forms as tools to improve the thermodynamic activity of drugs to be administered through the skin. **Current Drug Delivery**, v. 16, n. 5, p. 461-471, 2019.

GOLD, Linda Stein et al. Minocycline 1.5% foam for the topical treatment of moderate to severe papulopustular rosacea: results of 2 phase 3, randomized, clinical trials. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 82, n. 5, p. 1166-1173, 2020.

HECK, Michele Cristina; VIANA, Lilian Ávila; VICENTINI, Veronica Elisa Pimenta. Importância do óleo de *Copaifera* sp.(Copaíba). **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, v. 7, n. 1, 2012.

HOC, Dagmara; HAZNAR-GARBACZ, Dorota. Foams as unique drug delivery systems. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 167, p. 73-82, 2021.

HORWITZ, W. AOAC guidelines for single laboratory validation of chemical methods for dietary supplements and botanicals. **Gaithersburg, MD, USA: AOAC International**, p. 12-9, 2002.

HUANG, Xinfan et al. A novel foam vehicle for delivery of topical corticosteroids. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 53, n. 1, p. S26-S38, 2005.

ILDIS, 2014. Banco de Dados Internacional de Leguminosas e Serviço de Informação., Reading, Reino Unido: Escola de Ciências Vegetais, Universidade de Reading. <http://www.ildis.org/>

INCA, Ministério da Saúde. Tratamento e controle de feridas tumorais e úlceras por pressão no câncer avançado -Série Cuidados Paliativos, 2009.

INCA. Instituto Nacional de Câncer, Ministério da Saúde. Cuidados paliativos, 2022. Disponível em > <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/tratamento/cuidados-paliativos> < Acesso em 06 de Fevereiro de 2023.

INCA. Instituto Nacional de Câncer, Ministério da Saúde. Disponível em > <http://www.oncoguia.org.br/conteudo/cancer/12/1/>< Acesso em 06 de Fevereiro de 2023.

INCA. Instituto Nacional de Câncer, Ministério da Saúde. Quimioterapia, 2022. Disponível em > <https://www.gov.br/inca/pt>

[br/assuntos/cancer/tratamento/quimioterapia](https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/tratamento/quimioterapia) < Acesso em 06 de Fevereiro de 2023.
INCA. Instituto Nacional de Câncer, Ministério da Saúde. ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer 2ª ed. Rio de Janeiro: INCA; 2012.

INCA. Instituto Nacional de Câncer, Ministério da Saúde. Radioterapia, 2022.
Disponível em > <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/tratamento/radioterapia> < Acesso em 06 de Fevereiro de 2023.

INCA. Instituto Nacional de Câncer, Ministério da Saúde. Tratamento do câncer, 2022. Disponível em > <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/tratamento> < Acesso em 06 de Fevereiro de 2023.

JOYCE, B.L., Al-Ahmad H, Chen F, Stewart N, 2012. Árvores a diesel. In: Handbook of Bioenergy Crop Plants [ed. por Kole, C. \Joshi, CP \Shonnard, DR]. Flórida, EUA: CRC Press, 615-625.

KAMAL, Muhammad Shahzad. A novel approach to stabilize foam using fluorinated surfactants. *Energies*, v. 12, n. 6, p. 1163, 2019.

KANTI, V. et al. Effect of minoxidil topical foam on frontotemporal and vertex androgenetic alopecia in men: a 104-week open-label clinical trial. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, v. 30, n. 7, p. 1183-1189, 2016.

KUMAR, Mohit et al. Foam-Based Drug Delivery: A Newer Approach for Pharmaceutical Dosage Form. **AAPS PharmSciTech**, v. 23, n. 7, p. 244, 2022.

L.A.F. Paiva, K.M. de Alencar Cunha, F.A. Santos, N.V. Gramosa, E.R. Silveira, V.S.N. Rao, Investigation on the wound healing activity of oleo-resin from *Copaifera langsdorffii* in rats, *Phyther. Res.* 16 (2002) 737–739, <https://doi.org/10.1002/ptr.1049>.

LADEIRA, G. D. A.; CASTILHO, R. O.; MACHADO, R. de R. Fitoquímica e avaliação das atividades anti-inflamatória e antinociceptiva de *Lippia lacunosa* Mart. & Schauer. 2019. 123 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia.

LAMBERS, Hans et al. Natural skin surface pH is on average below 5, which is beneficial for its resident flora. *International journal of cosmetic science*, v. 28, n. 5, p. 359-370, 2006.

LAMEIRA, Osmar Alves; DE OLIVEIRA, E. C. P.; ZOGHBI, M. Identificação da época de coleta do óleo de copaíba (*Copaifera* sp.) no município de Moju-PA. 2005.

LANÇAS, Fernando M. *Cromatografia Gasosa*. São Carlos: Acta, 1993. 254p.

LEITE, Viviane Vasconcelos et al. Tratamento de feridas crônicas com oleorresina de copaíba. 2022.

LIMA, Carla Aparecida Silva et al. Atualizações Sobre as Propriedades Mediciniais do

Óleo de Copaíba (Copaifera spp.): uma Revisão Bibliográfica. **UNICIÊNCIAS**, v. 25, n. 2, p. 100-106, 2021.

LIMA, M.C.F. de et al. Caracterização e controle de qualidade de óleos de copaíba (Copaifera sp.) utilizando detecção de marcadores por fator de retenção relativa em HPTLC. **Quím. Nova**, v.43, n.7, p.878-883, 2020.

LIMA-SILVA, J. J. de; GUIMARÃES, S. B.; DA SILVEIRA, E. R.; DE VASCONCELOS, P. R.; LIMA, G. G.; TORRES, S. M.; DE VASCONCELOS, R. C. Effects of *Copaifera langsdorffii* Desf. on ischemia-reperfusion of randomized skin flaps in rats. *Aesthetic Plastic Surgery*, v. 33, n. 1, p. 104-109, 2009.

LUCCA, Letícia G. et al. Determination of β -caryophyllene skin permeation/retention from crude copaiba oil (*Copaifera multijuga* Hayne) and respective oil-based nanoemulsion using a novel HS-GC/MS method. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, v. 104, p. 144-148, 2015.

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

MALYSA, K.; LUNKENHEIMER, Klaus. Foams under dynamic conditions. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 13, n. 3, p. 150-162, 2008.

MARTINS-DA-SILVA, Regina CV; PEREIRA, Jorge Fontella; LIMA, Haroldo Cavalcante de. O gênero *Copaifera* (Leguminosae-Caesalpinioideae) na Amazônia brasileira. **Rodriguésia**, v. 59, p. 455-476, 2008.

MASSON-MEYERS, D. S. et al. Cytotoxicity and wound healing properties of *Copaifera langsdorffii* oleoresin in rabbits. **Int. J. Nat. Prod. Sci**, v. 3, p. 10-20, 2013.

MIRTIČ, Janja et al. Development of medicated foams that combine incompatible hydrophilic and lipophilic drugs for psoriasis treatment. *International journal of pharmaceutics*, v. 524, n. 1-2, p. 65-76, 2017.

NEVES, Jamilly Kelly Oliveira et al. Desenvolvimento e caracterização de microemulsões antimicrobianas e anti-inflamatórias contendo óleo de copaíba (*Copaifera multijuga*). 2013.

NORCINO, L. B. et al. Pectin films loaded with copaiba oil nanoemulsions for potential use as bio-based active packaging. *Food Hydrocolloids*, v. 106, p. 105862, 2020.

PAIVA, L. A. F. et al. Gastroprotective effect of *Copaifera langsdorffii* oleo-resin on experimental gastric ulcer models in rats. **Journal of ethnopharmacology**, v. 62, n. 1, p. 73-78, 1998.

PARSA, Maryam, Trybala, Anna, Malik, Danish Javed, Starov, Victor, 2019. Foam in pharmaceutical and medical applications. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 44 (December), 153–167. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2019.10.007>.

PIERI, F. A. et al. Antimicrobial profile screening of two oils of *Copaifera* genus. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, p. 241-244, 2012.

PIERI, Fabio Alessandro; MUSSI, Maria Carolina; MOREIRA, Maria Aparecida S. Óleo de *Copaifera* sp.(*Copaifera* sp.sp.): histórico, extração, aplicações industriais e propriedades medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 4, p. 465-472, 2009.

PINTO, Angelo C. et al. Separation of acid diterpenes of *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke by flash chromatography using potassium hydroxide impregnated silica gel. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 11, p. 355-360, 2000.

Purifarma. Informação técnica D-pantenol. Disponível em: http://www.purifarma.com.br/Arquivos/Produto/DPANTENOL_NOVA%20LITERATURA.pdf. Acesso em 10 de março de 2023.

RAOOF, Tooraj Joseph et al. Efficacy and safety of a novel topical minocycline foam for the treatment of moderate to severe acne vulgaris: a phase 3 study. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 82, n. 4, p. 832-837, 2020.

REVISTA ANALYTICA ©. Ensaios de viscosidade no controle de qualidade, 2020. Disponível em: <https://revistaanalytica.com.br/ensaios-de-viscosidade-no-controlededequalidade/#:~:text=Uma%20viscosidade%20que%20n%C3%A3o%20acmpanha,SAC%20afetando%20negativamente%20nas%20vendas>. Acesso em 26 de junho de 2023.

RIGAMONTE AZEVEDO, O.C. et al. *Copaifera* sp.: ecologia e produção de óleo-resina. Rio Branco: EMBRAPA, MAPA, 28p. 2004.

RIGAMONTE-AZEVEDO, ONOFRA CLEUZA RIGAMONTE-AZEVEDO et al. Variabilidade química e física do óleo-resina de *Copaifera* spp. no sudoeste da Amazônia brasileira. **Revista brasileira de oleaginosas e fibrosas**, v. 8, n. 2-3, 2004.

RIOS, M.N.D.S.; Pastore Junior, F. *Plantas da Amazônia: 450 Espécies de Uso Geral*; Universidade de Brasília: Brasília, Brazil, 2011.

RODRIGUES, Escarleth da CR et al. Development of a larvicidal nanoemulsion with *Copaiba* (*Copaifera duckei*) oleoresin. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 24, p. 699-705, 2014.

ROWE, Raymond C. et al. **Handbook of pharmaceutical excipients 9th Edition**. Pharmaceutical press, 2020.

SHANLEY, P.; Leite, A.; Alechandre, A.; Azevedo, C. *Copaíba: Copaifera* spp. In *Frutíferas e Plantas Úteis na Vida Amazônica*; Shanley, P., Medina, G., Eds.; CIFOR and IMAZON: Belém, Brazil, 2005; pp. 85–94.

SILVA, Ederly Santos et al. Análise físico-química do óleo-resina e variabilidade genética de *Copaifera* sp. na Floresta Nacional do Tapajós. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, n. 11, p. 1621-1628, 2012.

SILVA, Rosaly S. et al. Óleo essencial de limão no ensino da cromatografia em camada delgada. *Química Nova*, v. 32, p. 2234-2237, 2009.

SOUSA, João Paulo B. et al. Validation of a gas chromatographic method to quantify sesquiterpenes in copaiba oils. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 54, n. 4, p. 653-659, 2011.

SOUZA BARBOSA, Paula Cristina et al. Phytochemical fingerprints of copaiba oils (*Copaifera multijuga* Hayne) determined by multivariate analysis. **Chemistry & Biodiversity**, v. 10, n. 7, p. 1350-1360, 2013.

SOUZA, Carlos Adriano Santos et al. Controle de qualidade físico-químico e caracterização fitoquímica das principais plantas medicinais comercializadas na feira-livre de Lagarto-SE. **Scientia Plena**, v. 13, n. 9, 2017.

THE PHARMACOPOEIA OF THE UNITED STATES OF AMERICA (USP). 40^o ed. 2017.

The Plant List (2013). Version 1.1. Published on the Internet; <http://www.theplantlist.org/> (accessed 23^o January).

TOBOUTI, Priscila Lie et al. Antimicrobial activity of copaiba oil: A review and a call for further research. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 94, p. 93-99, 2017.

Tropicos.org. Jardim Botânico de Missouri. 23 de janeiro de 2023 <https://tropicos.org>
UGANDAR, R. E.; DEIVI, K. Sakthy. Formulation and evaluation of natural palm oil based vanishing cream. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, v. 4, n. 9, p. 3375, 2013.

USDA-NRCS, 2014. O banco de dados PLANTS. Baton Rouge, EUA: National Plant Data Center. <http://plants.usda.gov/>

VEIGA JR, Valdir F. et al. Phytochemical and antioedematogenic studies of commercial copaiba oils available in Brazil. *Phytotherapy Research*, v. 15, n. 6, p. 476-480, 2001.

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

VEIGA JUNIOR, Valdir F. et al. Constituintes das sementes de *Copaifera officinalis* L. **Acta Amazonica**, v. 37, p. 123-126, 2007.

VEIGA, V.F.F, Rosas, E.C.C., Carvalho, M.V.V., Henriques, M.G.M.O., Pinto, A.C. Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne—a comparative study, *J. Ethnopharmacol.* 112 (2007) 248–254.

VELASCO, M., Gonz´alez-Fern´andez, D., Rodriguez-Martín, M., S´anchez-Regaña, M., P´erez- Barrio, S., 2019. Patient and physician satisfaction with calcipotriol and betamethasone dipropionate aerosol foam in the treatment of plaque psoriasis on the body. *Actas Dermo-Sifiliogr.* 110 (9), 752–758.

WHO. WHO Definition of Palliative Care, 2020. Disponível em > <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/palliative-care> < Acesso em 06 de Fevereiro de 2023.

XAVIER-JUNIOR, Francisco Humberto et al. Development of a gas chromatography method for the analysis of copaiba oil. *Journal of chromatographic science*, v. 55, n. 10, p. 969-978, 2017

ZHAO, Yanjun; BROWN, Marc B.; JONES, Stuart A. Pharmaceutical foams: are they the answer to the dilemma of topical nanoparticles? *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, v. 6, n. 2, p. 227-236, 2010.