



UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE PARÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO
TECNOLÓGICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS

VICTOR HUGO RABELO DE AQUINO

DESENVOLVIMENTO DE GEL VAGINAL FITOTERÁPICO
BASEADO EM MANTEIGA DE *Astrocaryum murumuru* Mart
CONTENDO ÓLEORRESINA DE *Copaifera reticulata* Ducke
PARA O TRATAMENTO DE VAGINOSE

Santarém – PA
2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE PARÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO
TECNOLÓGICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS

VICTOR HUGO RABELO DE AQUINO

DESENVOLVIMENTO DE GEL VAGINAL FITOTERÁPICO
BASEADO EM MANTEIGA DE *Astrocaryum murumuru* Mart
CONTENDO ÓLEORRESINA DE *Copaifera reticulata* Ducke
PARA O TRATAMENTO DE VAGINOSE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia;
Universidade Federal do Oeste do Pará; Área de concentração:
Fisiologia Ambiental.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Kariane Mendes Nunes.

Co-orientador: Prof.^a Dr.^a Silvia Katrine Silva Escher.

Santarém – PA
2019

VICTOR HUGO RABELO DE AQUINO

**DESENVOLVIMENTO DE GEL VAGINAL FITOTERÁPICO
BASEADO EM MANTEIGA DE *Astrocaryum murumuru* Mart
CONTENDO ÓLEORRESINA DE *Copaifera reticulata* Ducke
PARA O TRATAMENTO DE VAGINOSE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências para obtenção do título de Mestre em Biociências; Universidade Federal do Oeste do Pará; Área de concentração: Fisiologia Ambiental.

Conceito:

Data de Aprovação ____/____/____

Prof.^a Dr.^a Kariane Mendes Nunes

Orientadora–Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA)

Prof.^a Dr.^a Silvia Katrine Silva Escher

Co-orientadora–Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA)

Prof.^a Dr.^a Gabriela Bianchi dos Santos

Membro Titular da Banca

Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA)

Prof.^a Dr.^a Edilene Gadelha de Oliveira

Membro Titular da Banca

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFOPA**

A657d Aquino, Victor Hugo Rabelo de
 Desenvolvimento de gel vaginal fitoterápico baseado em manteiga de *Astroca-
ryum murumuru* Mart contendo ólerresina de *Copaifera reticulata* Ducke para o tra-
tamento de vaginose / Victor Hugo Rabelo de Aquino. - Santarém, 2019.
 71 f.
 Inclui bibliografias.

 Orientadora: Dra. Karine Mendes Nunes; Coorientadora: Dra. Silvia Katrine
Silva Escher.

 Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Oeste do Pará, Programa de
Pós-graduação em Biociências.

 1. *Copaiba reticulata*. 2. *Artrocaryum murumuru*. 3. Cristal líquido. 4. Atividade
de antimicrobiana. 5. Gel vaginal. I. Nunes, Karine Mendes, orient. II. Escher, Sil-
via Katrine Silva, coorient. III. Título.

CDD: 23. ed. 615.321

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me dado forças, sabedoria, fé e luz para trilhar os caminhos da pós-graduação em todos os momentos.

A minha mãe e minha irmã, por todo amor, por todo apoio e por sempre acreditarem em mim, quando eu mesmo cheguei a não acreditar.

A minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Kariane Nunes, por ter estendido a mão e ter me recebido como aluno, agradeço de coração por todo ensinamento, pela oportunidade da realização da pesquisa, confiança, pela orientação no desenvolvimento deste trabalho.

A minha Co-orientadora, Prof.^a Dr.^a Katrine Escher, por todo apoio e orientação nas atividades e ensaios no Laboratório de Microbiologia da UFOPA, não tenho palavras para agradecer pela paciência, pela dedicação e por estar sempre à disposição nos momentos que precisei.

A minha namorada, que acompanhou de perto e ajudou nas batalhas e obstáculos que precisei vencer para concluir esta etapa. Agradeço grandemente por ter acreditado em mim, me dado apoio, carinho e incentivo para elaboração desse trabalho.

Aos amigos do Laboratório de farmacotécnica: Cássia Valéria, Jefferson Feitosa, Wendel Clei e Júnior Avelino por terem me ajudado nas atividades experimentais deste trabalho.

Agradeço ao Prof. Dr. Bernhard Peregovich e seus alunos, por disponibilizar o Laboratório Multidisciplinar de Geologia II da UFOPA, para as análises microscópicas.

Agradeço a Prof.^a Dr.^a Elaine Oliveira e a técnica Taiara Picanço do Laboratório de Biotecnologia Vegetal da UFOPA, por todo auxílio com as amostras do óleo-resina de copaíba.

Agradeço a Prof.^a Dr.^a Rosa Mourão e o técnico Adenilson Barroso por disponibilizar o Laboratório de Bioprospecção e Biologia Experimental da UFOPA, para realização da análise cromatográfica.

RESUMO

A copaíba é uma planta amplamente utilizada na medicina popular amazônica. Estudos têm evidenciado diversas atividades biológicas principalmente a antimicrobiana. Entretanto, ainda se faz necessário comprovações científicas acerca do seu uso em produtos fitoterápicos. Desta forma, o trabalho teve como objetivo desenvolver um gel vaginal fitoterápico do tipo líquido-cristalino baseado em manteiga extraída da espécie oleaginosa *Astrocaryum murumuru* Mart contendo óleo resina *Copaifera reticulata* Ducke, para o tratamento de vaginose bacteriana. O óleoresina de copaíba (ORCR) foi coletado na Floresta Nacional do Tapajós (FLONA) e sua constituição química foi analisada por Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM). Foi realizado a atividade antibacteriana do ORCR pela a técnica de difusão em disco e a concentração mínima inibitória (CMI) por microdiluição frente a cepas relacionadas a vaginose. Foram obtidas cinco formulações com quantidade fixa do tensoativo, e diferentes proporções de água, manteiga de murumuru e ORCR (50, 100, 250 e 500mg/g). Após 24 horas do preparo, todas as formulações foram submetidas a microscopia de luz polarizada a fim de caracterizar a fase líquido-cristalina. A atividade antimicrobiana das formulações foi avaliada pelo teste de perfuração em ágar. Posteriormente, foi realizado o estudo de estabilidade acelerada em diferentes condições de armazenamento (25 e 45°C ±2°C), no qual foi avaliado sua influência frente à atividade antimicrobiana e sobre suas propriedades óticas. Na composição química do ORCR foram determinados os seguintes majoritários, o β-Cariofileno 32,43%, β-Bisaboleno 11,28% e α-Humuleno 8,41%. No teste de difusão em disco as cepas de *Gardnerella vaginalis* e *Staphylococcus Epidermitidis* foram as mais sensíveis frente ao ORCR, apresentando uma CMI de 500 µg/mL, com atividade bacteriostática. Após 24h do preparo, apenas as formulações contendo 100 mg/g e 50 mg/g de ORCR apresentaram texturas em forma de estrias, característico de estrutura líquido-cristalina de fase hexagonal. As formulações contendo 50 mg/g e 100 mg/g de ORCR apresentaram atividade antimicrobiana frente a todas as cepas testadas, quanto maior a concentração de ORCR nas formulações, maiores foram os halos de inibição. Durante os 60 dias do estudo de estabilidade acelerada em diferentes condições de armazenamento não foi observado alterações significativas nas características físicas e organolépticas das formulações, além disso, não houve desestruturação da fase hexagonal. Entretanto, as formulações armazenadas a 45°C ±2°C apresentaram diminuição da atividade antimicrobiana a partir do 30º dia. Portanto, todos os resultados advogam a favor da formulação com 5% de água e 55% de manteiga de

Murumuru, contendo 100mg/g de ORCR como potencial candidata ao emprego clínico como um gel fitoterápico tópico do tipo líquido-cristalino para o tratamento de vaginose.

Palavras-chave: *Copaifera reticulata*, *Astrocaryum murumuru*, Cristal líquido, Atividade antimicrobiana, Gel vaginal.

ABSTRACT

Copaiba is a plant widely used in Amazonian folk medicine, studies have evidenced several biological activities, mainly antimicrobial. However, scientific evidence is still needed about the phytotherapeutic use. The aim of this work was to develop a liquid-crystalline phytotherapeutic vaginal gel based on butter extracted from the oleaginous species *Astrocaryum murumuru* Mart containing oil-resin of *Copaifera reticulata* Ducke, for the treatment of bacterial vaginosis. The copaiba oil-resin (ORCR) was collected in the Tapajós National Forest and its chemical composition was analyzed by Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS). The antibacterial activity of the ORCR was performed by the disc diffusion technique and the minimum inhibitory concentration (MIC) by microdilution against strains related to vaginosis. Five formulations with fixed amount of surfactant, and different proportions of water, murumuru butter and ORCR (50, 100, 250 and 500mg/g) were obtained. After 24 hours of preparation, all formulations were subjected to polarized light microscopy in order to characterize the liquid-crystalline phase. The antimicrobial activity of the formulations was evaluated by agar well diffusion test. Afterwards, the accelerated stability study was carried out under different storage conditions (25 and 45°C \pm 2°C), where the influence of antibacterial activity and the optical properties was evaluated. In the chemical composition of the ORCR, the following majorities were determined: β -Cariophyllene 32.43%, β -Bisabolene 11.28% and α -Humulene 8.41%. In the disc diffusion test the strains of *Gardnerella vaginalis* and *Staphylococcus Epidermitidis* were the most sensitive to the ORCR, presenting a MIC of 500 μ g/mL, with bacteriostatic activity. After 24 hours of preparation, only the formulations containing 100 mg/g and 50 mg/g of ORCR showed cylindrical textures, characteristic of liquid-crystal of hexagonal phase structure. The formulations containing 100 mg/g and 50 mg/g of ORCR showed antimicrobial activity against all tested strains, the higher the ORCR concentration in the formulations, the higher the inhibition halos. During the 60 days of the accelerated stability study in different storage conditions no significant changes in the organoleptic characteristics of the formulations were observed, in addition, there was no disintegration of the hexagonal phase. However, the formulations stored at 45°C \pm 2°C showed a decrease in antimicrobial activity from the 30th day. Therefore, all results showed the formulation F6-M55A05 containing 100mg /g of ORCR as a potential candidate for clinical use as a topical liquid-crystalline phytotherapeutic gel for the treatment of vaginosis.

Keywords: *Copaifera reticulata*, *Astrocaryum murumuru*, Liquid crystal, Antimicrobial activity, Vaginal gel.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	5
2 OBJETIVOS	8
2.1 GERAL.....	8
2.2 ESPECÍFICOS	8
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	9
3.1 GÊNERO <i>Copaifera</i>	9
3.2 MICROBIOTA VAGINAL.....	10
3.2.1 Microbiota vaginal normal	10
3.2.2 Vaginose bacteriana	11
3.3 RESISTÊNCIA BACTERIANA A ANTIMICROBIANOS	12
3.4 MURUMURU	13
3.5 CRISTAIS LÍQUIDOS	14
4 MATERIAL E MÉTODOS	17
4.1 COLETA DO ÓLEORRESINA DE <i>Copaifera reticulata</i>	17
4.1.1 Local de coleta.....	17
4.1.2 Extração do óleo-resina	18
4.2 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA	18
4.2.1 Esterificação do óleo-resina de <i>Copaifera reticulata</i>.....	18
4.2.2 Cromatografia gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM) do ORCR.....	18
4.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO ÓLEORRESINA DE <i>Copaifera reticulata</i>	19
4.4 DELINEAMENTO DAS FORMULAÇÕES FITOTERÁPICAS BASEADAS EM MANTEIGA DE <i>Astrocaryum murumuru</i> Mart CONTENDO ÓLEORRESINA DE <i>Copaifera reticulata</i> Ducke	20
4.5 MICROSCOPIA DE LUZ POLARIZADA	22
4.6 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DAS FORMULAÇÕES	22

4.6.1 Seleção das formulações	23
4.7 ESTUDO DE ESTABILIDADE ACELERADA	23
4.7.1 Avaliação das Características Organolépticas	23
4.8 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO ESTUDO DE ESTABILIDADE ACELERADA SOBRE POSSÍVEIS ALTERAÇÕES FÍSICAS NAS ESTRUTURAS LÍQUIDO- CRISTALINAS DAS FORMULAÇÕES	24
4.9 AVALIAÇÃO A INFLUÊNCIA DO ESTUDO ESTABILIDADE ACELERADA SOBRE A ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DAS FORMULAÇÕES	24
4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA	25
5 RESULTADOS	26
5.1 CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG-EM).....	26
5.2 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO ÓLEORRESINA DE <i>Copaifera reticulata</i> 28	
5.2.1 Teste de difusão em disco	28
5.2.2 Concentração mínima inibitória-CMI	29
5.3 DELINEAMENTO DAS FORMULAÇÕES FITOTERÁPICAS BASEADAS EM MANTEIGA DE <i>Astrocaryum murumuru</i> Mart CONTENDO ÓLEORRESINA DE <i>Copaifera reticulata</i> Ducke.	29
5.4 MICROSCOPIA DE LUZ POLARIZADA	30
5.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DAS FORMULAÇÕES	32
5.6 ESTUDO DE ESTABILIDADE ACELERADA	35
5.6.1 Avaliação das Características Organolépticas	35
5.7 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO ESTUDO DE ESTABILIDADE ACELERADA SOBRE POSSÍVEIS ALTERAÇÕES FÍSICAS NAS ESTRUTURAS LÍQUIDO- CRISTALINAS DAS FORMULAÇÕES	36
5.8 AVALIAÇÃO A INFLUÊNCIA DO ESTUDO ESTABILIDADE ACELERADA SOBRE A ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DAS FORMULAÇÕES	36
6 DISCUSSÃO	42
7 CONCLUSÃO	49

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50
APÊNDICE A- Avaliação da influência do estudo de estabilidade acelerada sobre possíveis alterações físicas nas estruturas líquido-cristalinas	63
ANEXO A- Patente das formulações testadas	65

1 INTRODUÇÃO

A vaginose é uma das principais infecções que acometem as mulheres, sendo uma das maiores causas de consultas ginecológicas. Estima-se que 75% das mulheres serão acometidas pelo menos uma vez durante a vida com episódio de infecção vaginal, e mais de 40% delas experimentarão infecção recorrentes (BATTAGLIA *et al.*, 2005; GIRALDO *et al.*, 2007; NUNES *et al.*, 2012).

Atualmente, os antibióticos são usualmente utilizados como primeira opção no tratamento de infecções vaginais, tanto pela administração por via oral ou de uso tópico. Apesar de serem eficazes na eliminação dos patógenos, podem desencadear reações adversas desagradáveis e concomitantemente erradicam a microbiota vaginal benéfica, que auxilia no equilíbrio do pH, imprescindíveis no mecanismo de defesa contra infecções, além de estimular o desenvolvimento de bactérias patogênicas resistentes (BROCKLEHURST *et al.*, 2002; EDWARDS, 2004; HAY, 2009).

Apesar da ampla variedade de antibióticos disponíveis no mercado, os micro-organismos desenvolveram mecanismos moleculares para resistir a ação dos antimicrobianos (ANTUNES *et al.*, 2013). O uso excessivo e não racional dos antibióticos foram os principais fatores que estimularam o surgimento de bactérias resistentes, se tornando-se um problema de saúde pública mundial, gerando altos custos aos sistemas de saúde, aumentando o tempo de permanência hospitalar e expondo os pacientes a fármacos que apresentam maior risco de reações adversas (PINTO *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2010).

A resistência bacteriana é também um fator que estimula a investigações de espécies vegetais com atividade antimicrobiana como alternativa terapêutica. Por isso, há a necessidade de se realizar estudos científicos que comprovem a segurança e eficácia dos medicamentos oriundos de plantas medicinais (BADKE *et al.*, 2012; RATES *et al.*, 2001; VEIGA JUNIOR *et al.*, 2005).

O Brasil possui uma vasta biodiversidade vegetal, com mais de 60.000 mil espécies de vegetais, com grande potencial para o desenvolvimento tecnológico de novos medicamentos. No entanto, existem poucos medicamentos fitoterápicos oriundos de plantas medicinais brasileiras, registrados na Agência Nacional de Vigilância Sanitária- Anvisa (HASENCLEVER *et al.*, 2017). Em 2011, havia 382 fitoterápicos registrados, obtidos de 98 espécies vegetais, e a maioria dos medicamentos são oriunda de espécies exóticas de amplo uso mundial, apenas 26% destas espécies são nativas da América do Sul. Deste total, a maioria encontra-se geograficamente localizada na região Sul e Sudeste do país, cerca de 84% (PERFEITO, 2012).

A Amazônia possui uma das maiores biodiversidades do mundo, possuindo diversas plantas nativas com reconhecido uso tradicional em terapias alternativas. O uso de plantas medicinais é comum na cultura amazônica, sendo a copaíba uma das mais utilizadas para combater diversas enfermidades. A principal matéria prima utilizada é o exsudato retirado por perfuração do seu tronco conhecido como óleoresina, o qual possui um aspecto viscoso, líquido transparente com coloração que varia entre o amarelo ao marrom, quimicamente constituído de uma complexa mistura de sesquiterpenos e diterpenos. (OLIVEIRA *et al.* 2006; SACHETTI *et al.*, 2009).

Estudos têm evidenciado diversas atividades biológicas como anti-edematogênicas, antitumorais, tripanossomicidas e anti-inflamatória (MENDONÇA; ONOFRE, 2009), destacando-se principalmente trabalhos relacionando a atividade antimicrobiana (GIESBRECHT, 2011; MONTES, *et al.* 2009). Em vista disso, o extenso uso tradicional da espécie *Copaifera* aliados a suas inúmeras propriedades terapêuticas, tem gerado grande interesse das indústrias farmacêuticas e cosméticas no desenvolvimento de produtos baseados no óleo de copaíba com diferentes aplicações (PIERRI *et al.* 2009).

O delineamento de formas farmacêuticas é uma etapa crucial para o desenvolvimento de um medicamento, desta forma, para garantir a eficácia de bioativos e/ou fármacos é necessário que se faça a escolha de um sistema de liberação de fármacos tecnicamente adequada para sua incorporação. Os sistemas líquido-cristalinos se destacam por formarem sistemas de liberação de fármacos altamente organizados, cuja características físicas estão entre um sólido e um líquido (FORMARIZ *et al.*, 2005). Apesar de serem constituídos apenas por tensoativo, água e óleo, quando esses componentes estão em proporções adequadas, permitem a formação de matrizes internas complexas com diferentes estruturas e propriedade físico-químicas (CARVALHO *et al.*, 2010).

Os sistemas líquido-cristalinos apresentam diversas vantagens tecnológicas em relação às formas farmacêuticas tradicionais, tais como maior estabilidade frente a fatores extrínsecos, são resistentes a erosão por fluidos orgânicos devido à sua capacidade de captação de água. Ademais, por ter viscosidade facilmente modulada permite a liberação sustentada de fármacos e/ou ativos. Portanto, o conjunto das vantagens supracitadas os tornam sistemas de liberação adequados para aplicação em pele e mucosas (AHMED, 2010; COSTA-BALOGH, 2010).

Em vista disso, o trabalho teve como objetivo desenvolver uma formulação fitoterápica do tipo líquido-cristalino baseada em manteiga extraída da espécie oleaginosa *Astrocaryum murumuru* Mart. contendo óleo resina *Copaifera reticulata* Ducke., para o

tratamento de vaginose bacteriana. Desta forma, acredita-se na hipótese de que o sistema supracitado seja capaz de promover uma maior estabilidade e proteção do óleo, assim como, permitir uma liberação sustentada dos bioativos contidos no óleo-resina de copaíba em mucosa vaginal. Ademais, esse trabalho de pesquisa é norteado por um viés sustentável a fim de agregar valor às matérias primas vegetais oriundas da Amazônia gerando benefícios econômicos e sociais a região do Oeste do Pará.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Desenvolver um gel vaginal fitoterápico antibacteriano baseado em manteiga de *Astrocaryum murumuru* Mart contendo óleorresina de *Copaifera reticulata* Ducke.

2.2 ESPECÍFICOS

- Analisar a constituição química do óleorresina de *Copaifera reticulata* Ducke por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM);
- Determinar a atividade antibacteriana do óleorresina de *Copaifera reticulata* pelo teste de difusão em disco e sua concentração mínima inibitória (CMI);
- Delinear formulações fitoterápicas baseadas em manteiga de *Astrocaryum murumuru* Mart contendo óleorresina de *Copaifera reticulata* Ducke;
- Avaliar se as condições experimentais possibilitam a formação de fase líquido-cristalina das formulações por microscopia de luz polarizada;
- Realizar a atividade antibacteriana das formulações selecionadas por perfuração em ágar;
- Realizar o estudo de estabilidade acelerada das formulações selecionadas;
- Avaliar a influência do estudo de estabilidade acelerada sobre possíveis alterações físicas nas estruturas líquido cristalinas das formulações;
- Avaliar a influência do estudo de estabilidade acelerada sobre a atividade antibacteriana das formulações.

3 REVISÃO DE LITERATURA

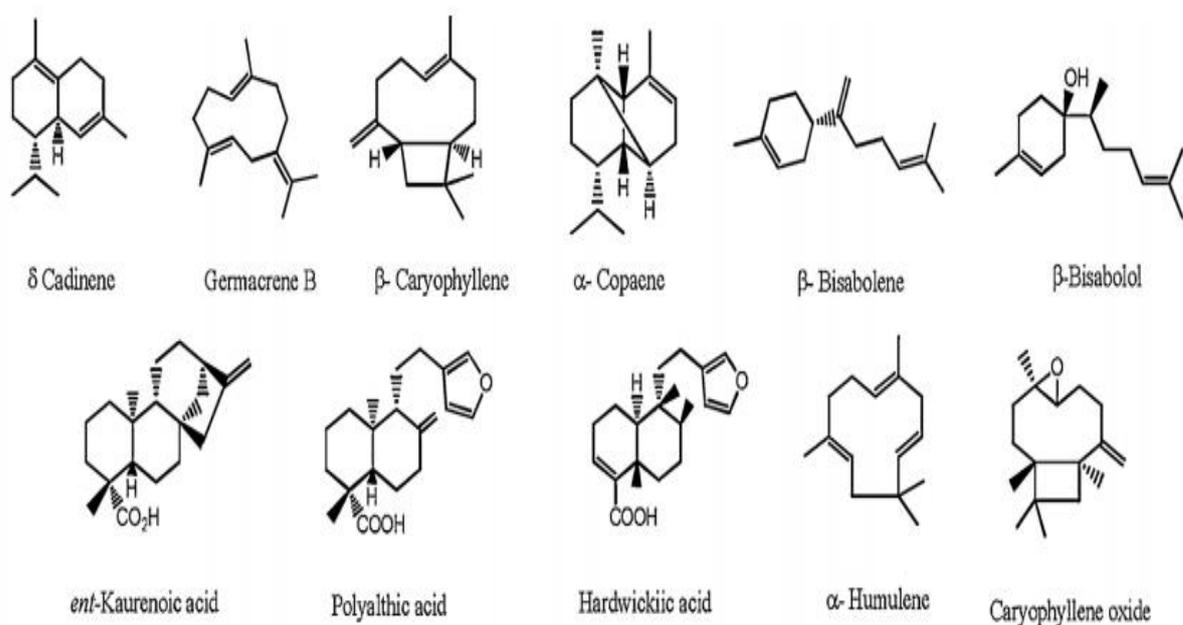
3.1 GÊNERO *Copaifera*

As copaibeiras são árvores comuns à América Latina e África Ocidental pertencente à família das *Leguminosae*, subfamília *Caesalpinoida*, gênero *Copaifera* que alcançam até 40 metros de altura, podendo viver por alguns séculos (PINTO *et al.*, 2000; VEIGA JÚNIOR *et al.*, 2005). Através perfuração do tronco dessas árvores é extraída a óleorresina de copaíba (PONTES *et al.*, 2003).

O óleorresina possui um aspecto viscoso, líquido transparente com coloração que varia entre o amarelo ao marrom, considerado uma solução que contém ácidos diterpênicos dissolvidos em uma fração volátil constituído majoritariamente por sesquiterpenos (CASCON e GILBERT, 2000; VEIGA JÚNIOR *et al.*, 1997).

O principal composto encontrado na fração sesquiterpênica é β -cariofileno, seguida de α -humuleno e α -bisaboleno. Enquanto a fração diterpênica é composta principalmente pelo ácido copálico, ácido agalático, ácido 11-hidroxicopálico, 11-acetoxi-copálico, ácido hardwickiico e o ácido carenóico, entre outros (PAIVA *et al.*, 2004; RAMOS, 2006).

Figura 1- Estrutura química de alguns compostos majoritariamente encontrados em espécies de *Copaifera*.



Fonte: (ARRUDA *et al.*, 2019).

O β -cariofileno é principal constituinte atribuído na literatura com atividades biológicas como a anti-inflamatória (CHAVAN *et al.*, 2010), inseticida (RODILLA *et al.*, 2008), anticancerígeno (DI SOTTO *et al.*, 2010; LEGAULT *et al.*, 2007) e anestésico local (GHELARDINI *et al.*, 2001). Em um estudo realizado foi verificado que o β -cariofileno demonstrou inibir significativamente a migração celular e o extravasamento protéico (RAMOS, 2006).

Na região amazônica a copaíba é amplamente utilizada na medicina popular, o óleo-resina é usado como um antimicrobiano tanto por via oral, para o tratamento de infecções da garganta, e aplicado por via tópica para tratar feridas, úlceras e mordidas de animais (MACIEL *et al.*, 2002; RIOS; PASTORE JUNIOR, 2011; SHANLEY *et al.*, 2004). O óleo de copaíba também é comercializado em farmácias e lojas de produtos naturais, em forma de cápsulas para uso em via oral e na forma de óvulos vaginais (CARVALHO *et al.*, 2005).

3.2 MICROBIOTA VAGINAL

3.2.1 Microbiota vaginal normal

A cavidade vaginal é um ecossistema complexo e dinâmico, onde centenas de espécies diferentes de bactérias convivem em uma relação mutualística bem alinhada com o hospedeiro, no entanto ao longo da vida da mulher, a microbiota vaginal sofre grandes variações em sua composição, associadas a diferentes períodos reprodutivos, como puberdade e menopausa (CHEN *et al.*, 2015; FARAGE; MAIBACH, 2005).

Essa natureza dinâmica demonstra estar associado ao hormônio estrógeno, devido ao seu papel na manutenção do pH ácido (3.8-4.4) ideal para microbiota vaginal saudável habitar, fornecendo a primeira linha de defesa contra a colonização por patógenos oportunistas (MILLER *et al.*, 2016).

O estrógeno atua na manutenção do pH vaginal por três principais vias: Através do metabolismo intracelular do glicogênio pelas células intermediárias, pela secreção de prótons das células epiteliais vaginais e indiretamente pela secreção extracelular do glicogênio para o metabolismo microbiano, onde produzem de ácido láctico (GODHA *et al.*, 2018).

Bactérias do gênero *Lactobacilli*, conhecido como lactobacilos, são microorganismos mais abundantes, cerca de 70%, sendo os principais responsáveis pela regulação do pH da vaginal humano através da produção de ácido láctico. Atualmente, mais de 120 espécies

de lactobacilos foram descritas, no entanto, as espécies mais frequentemente encontradas mucosa vaginal são *Lactobacilli crispatus*, *Lactobacilli gasseri*, *Lactobacilli jensenii* e *Lactobacilli iners* (VASQUEZ *et al.* 2002).

Vários desses lactobacilos são capazes de produzir bacteriocinas, biosurfactantes e moléculas de co-agregação para inibir a adesão de patógenos (REID, 2001). Quando ocorre mudanças no equilíbrio simbióticos dos lactobacilos no ambiente vaginal, pode contribuir para a alcalinização do pH vaginal, propiciando o crescimento de outras bactérias não nativas, que se proliferam em meios mais alcalinos, as quais podem colonizar o trato vaginal e causar doenças, como a vaginose (CONSOLARO; MARIA-ENGLER, 2012; ESCHENBACH *et al.*, 1989).

3.2.2 Vaginose bacteriana

A vaginose é uma das causas mais comuns de corrimento vaginal patológico de mulheres em idade reprodutiva, responsáveis por inúmeras consultas ginecológicas em todo o mundo, afetando todas as camadas sociais (SRINIVASAN *et al.*, 2012). Se caracteriza por se uma infecção bacteriana endógena pela mudança na microbiota vaginal normal, predominantemente de *Lactobacillus*, para uma microbiota com diversas bactérias não simbióticas (SIMÕES-BARBOSA *et al.*, 2002).

A sintomatologia é bastante incomoda, caracterizada por prurido, irritação local, com corrimento e odor desagradável, causado principalmente pelo o metabolismo protéico, formando poliaminas, como putrescina e cadaverina, comprometendo o equilíbrio biopsicossocial e a vida sexual (CHEN *et al.*, 1979; KLEBANOFF *et al.*, 2004).

As causas para desaparecimento dos lactobacilos ainda são desconhecidas, no entanto, alguns fatores estão fortemente relacionados, como o uso indiscriminado de antibióticos, o uso de dispositivos contraceptivos como o diafragma, anel vaginal, produtos espermicidas, entre outros (PATEL *et al.*, 2004; TANAKA *et al.*, 2007).

Descuidos na higiene pessoal também estão relacionados por facilitar a entrada de bactérias inespecíficas no canal vaginal, por exemplo *Escherichia coli*, bactéria encontrada normalmente no trato gastrointestinal, bactérias do gênero *Staphylococcus*, encontradas na pele humana (BROOKS *et al.*, 2012; LAMONT *et al.*, 2011; SILVA; NEUFELD, 2006).

No entanto, a *Gardnerella vaginalis*, uma das principais bactérias associadas a vaginose, encontrado em de 90% dos casos sintomáticos, sendo atribuído a este microrganismo o aparecimento do odor desagradável de “peixe podre” (OLIVEIRA *et al.*, 2007).

A principal técnica para diagnosticar a vaginose bacteriana foi proposta por AMSEL *et al.*, (1983) a qual se baseia em um conjunto de critérios clínicos, sendo eles: a) Corrimento vaginal homogêneo; b) $\text{pH} \geq 4,5$; c) teste de amina positivo (odor fétido das aminas com adição de hidróxido de potássio a 10%) e d) presença de *clue cells* a fresco. O diagnóstico é positivo quando de três dos quatro critérios propostos são constatados.

Os principais medicamentos de escolha utilizados para o tratamento de vaginose bacteriana consiste em metronidazol ou clindamicina, tanto por via oral ou tópica (WORKOWSKI, 2015). Outros antibióticos também podem ser empregados no tratamento de vaginose como a penicilina, ampicilina, eritromicina, clindamicina, vancomicina, ciprofloxacino e imipenem (MANDELL *et al.* 2015)

No entanto, o uso de antibióticos podem ser perigos, principalmente em mulheres grávidas, o metronidazol está associada com a ruptura de membrana placentária, podendo ocorrer parto prematuro com baixo peso, devendo ser evitada nos primeiros da gestação (BATES, 2003; SOBEL, 1997).

3.3 RESISTÊNCIA BACTERIANA A ANTIMICROBIANOS

O rápido aumento no número de cepas bacterianas resistentes é atualmente um dos problemas de saúde pública mais relevante a nível global, ameaçando a eficácia do tratamento e conseqüentemente a vida de pessoas e animais (WEESE, 2008; VENTOLA, 2015).

O principal fator associado problema da resistência aos antimicrobianos tem sido atribuído tanto pelo mau uso desses medicamentos quanto ao seu uso demasiado, assim como o baixo desenvolvimento de novos fármacos pela indústria farmacêutica devido aos desafios dos aspectos regulatórios de novas drogas e o baixo fomento econômico para este fim (GOULD; BAL, 2013; SPELLBERG; GILBERT, 2014; VENTOLA, 2015).

Nos hospitais, cerca de 25% a 35% dos pacientes internados recebem antimicrobianos tanto para fins terapêuticos como profilático. Estimativas apontam que mais de 50% das prescrições são inadequadas, tanto na via de administração, na dose e duração do tratamento, bem como na indicação do fármaco para combater o agente infeccioso (ONZI; HOFFMAN; CAMARGO, 2011).

O mecanismo de resistência bacteriana mais importante e conhecido é a degradação enzimática do antibiótico, como as β -lactamases. Estas hidrolisam a ligação amida do anel dos antibióticos das classes dos beta-lactâmicos, incapacitando a molécula de ligar-se proteínas de

ligação da penicilina (PBP), principal enzima envolvida na biossíntese da parede celular, através do qual exercem seu efeito antibacteriano (ANVISA, 2007).

A prescrição dos antibióticos deve ser de forma racional, embasados a partir de laudos laboratoriais, e não restrito apenas em sinais e sintomas clínicos de determinados agentes patogênicos, como ocorre regularmente, o qual acarreta um consumo ineficaz e excessivo, propiciando o desenvolvimento de resistência, e posteriormente, dificultando o tratamento de doenças infecciosas (DEL FIOLE *et al.*, 2010).

3.4 MURUMURU

O murumuruzeiro é uma palmeira típica encontrada na região amazônica, podendo alcançar uma altura de 15 m (MIRANDA *et al.*, 2001). Possui frutos de forma oval, com uma casca de cor avermelhada quando maduros, já sua polpa de cor amarelada, possuindo em seu interior uma semente dura, porém, comestível com gosto levemente adocicado (SILVA, 1996).

A espécie *Astrocaryum murumuru* é a mais encontrada, distribuído por toda a margem do Rio Amazonas e seus principais afluentes (ALTMAN, 1958; SILVA, 1996). A planta se desenvolve principalmente em áreas úmidas e temporariamente inundadas, próximas aos rios e igarapés (QUEIROZ *et al.*, 2007).

O fruto do murumuru é composto de 53% de polpa, com cerca de 12% de matéria seca, conforme o estágio de amadurecimento, sendo também observados valores de até 69% (QUEIROZ *et al.*, 2008). A semente contém cerca de 40 a 42% de óleo, com ponto de fusão (32,5°C), apresentando uma consistência semelhante a de uma manteiga na região amazônica, devido sua composição química ser composição química rica em ácidos graxos saturados, o ácido graxo mais abundante na manteiga do murumuru é do ácido láurico com 44%, seguido do ácido mirístico 27%, ácido oleico 11% e ácido palmítico 9% (SILVA *et al.*, 2010).

A qualidade desta gordura não é muito diferente da gordura de outras oleaginosas como o palmiste e o coco, no entanto, ela tem a vantagem de possuir uma consistência maior, devido ao seu ponto de fusão ser superior ao do palmiste 25°C, e do coco 22,7°C. Esta qualidade faz do Murumuru ser procurado para ser misturado em gorduras vegetais que fundem à temperatura mais baixa, podendo ser um substituto da manteiga de cacau na fabricação do chocolate. (PESCE *et al.*, 2009).

3.5 CRISTAIS LÍQUIDOS

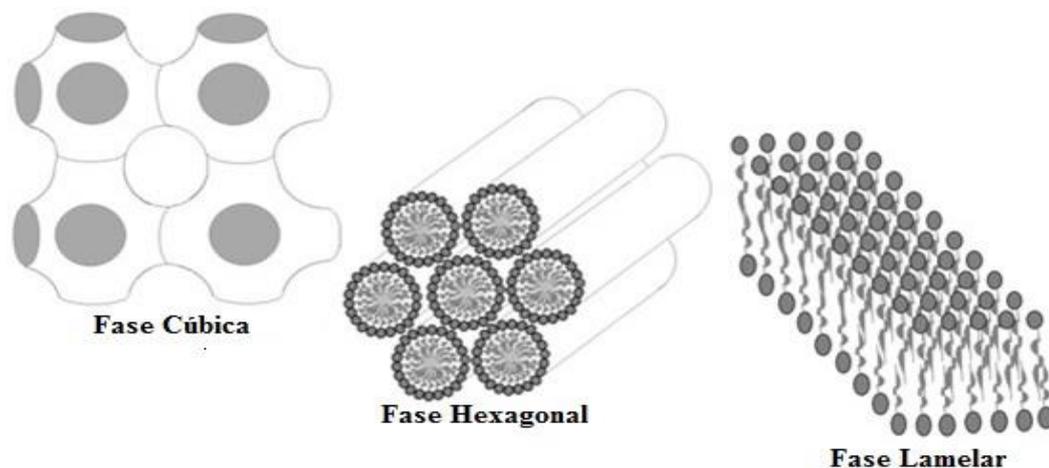
Os sistemas líquido-cristalino apresentam um estado intermediário entre sólidos e líquidos, conhecido como mesofase, possuindo alta ordenação estrutural, rigidez e fortes interações intermoleculares, semelhantemente aos sólidos e concomitantemente apresentam fluidez, como os líquidos (MORAIS, 2006).

Os cristais líquidos podem ser classificados em duas grandes categorias: os termotrópicos e os liotrópicos (TYLE, 1989). No entanto, estudos de aplicações cosméticas e farmacêuticas concentrando-se nos cristais líquidos liotrópicos (KLEIN, 2002) que são formados geralmente por substâncias anfifílicas ou tensoativos que ao entrar em contato com um solvente, como a exemplo, a água se auto-organizam em diferentes estruturas termodinamicamente estáveis composta de domínios lipídicos e aquosos denominadas mesofases liotrópicas, podendo gerar estruturas de grande complexidade (KULKARNI *et al.*, 2011; SAGALOWICZ *et al.*, 2006).

Dentre as mesofases liotrópicas, as mais importantes e usualmente observadas são: lamelar, hexagonal e fase cúbica. A formação de cada mesofase liotrópica é um processo espontâneo, que depende intrinsecamente da natureza hidrofílica ou lipofílica do tensoativo e pode ser classificada de acordo com suas propriedades ópticas e visco-elásticas. (TYLE, 1989).

A fase lamelar apresenta-se como líquido viscoso devido sua estrutura interna ser composta por camadas paralelas e planas de bicamadas de tensoativo separadas por solvente que formam uma rede unidimensional continua que permite escoamento e fluidez. A fase hexagonal possui alta viscosidade, semelhante à de um gel em detrimento do alto grau de empacotamento das moléculas lipídicas e solvente, a fase hexagonal aos as moléculas formam micelas cilíndricas circulares, que se agregam formando arranjos cilíndricos longos originando estruturas bidimensionais em forma de hexágono (FORMARIZ *et al.*, 2005).

Figura 2- Estrutura das fases líquido cristalinas: Fase hexagonal, Fase cúbica e Fase lamelar.



Fonte: (BERNEGOSSI *et al.*, 2015).

Nos últimos anos, foram realizados diversos estudos (AMSALEM *et al.*, 2010; CONHEN-AVRAHAMI *et al.*, 2012; GARTI *et al.*, 2012; LIBSTER *et al.*, 2011; YARIV *et al.*, 2010), fundamentados aplicação de sistemas líquidos cristalinos para a veiculação de fármacos anti-inflamatórios e cicatrizantes, com o objetivo de minimizar a toxicidade e aumentar sua eficácia clínica. Estes estudos abordam principalmente as características estruturais desses sistemas com os coeficientes de difusão, assim como os perfis de liberação e permeação “*in vitro*”.

Em relação à liberação prolongada, os cristais líquidos vêm sendo considerados excelentes sistemas de liberação, devido sua grande área interfacial interna, com características físico-químicas diferentes da área externa, formando microambientes distintos, com diferentes constantes dielétricas, permitindo compartimentalizar fármacos polares e apolares (BOYD *et al.*, 2006).

3.6 Estudo de estabilidade

Os estudos de estabilidade representa uma das etapas mais importantes na produção e desenvolvimento de produtos cosméticos e farmacêuticos, pois geram subsídios para o aperfeiçoamento das formulações, dos material a serem utilizados e do acondicionamento adequado, auxiliando na estimativa do prazo de validade e monitoramento da estabilidade organoléptica, físico-química e microbiológica, oferecendo informações a fim de garantir da segurança, eficácia e qualidade do produto (BRASIL, 2010).

Para avaliação dos estudos de estabilidade, são utilizados critérios e métodos estabelecidos por órgãos regulamentadores e fiscalizadores como a agência nacional de vigilância sanitária (ANVISA) no Brasil ou em diretrizes internacionais como os da *Food and Drug Administration* (FDA). De acordo com o guia para realização de estudos de estabilidades, publicada na Resolução nº 01/2005 da ANVISA, para que possa ocorrer a comercialização de produtos farmacêuticos é necessária uma avaliação técnica de estudos de estabilidade (BRASIL, 2005).

Em formulações farmacêuticas, vários fatores podem influenciar sua estabilidade, sendo estes classificados em extrínsecos e intrínsecos. Os fatores extrínsecos estão relacionados a interferências externas, como o tempo, a temperatura, a luz e o oxigênio, a umidade, o material de acondicionamento, os microrganismos e vibrações. Já os fatores intrínsecos estão relacionados a interferências internas, da própria formulação, como a incompatibilidade física e química, pH, reações de oxido-redução, reações de hidrólise, em alterações nas características organolépticas, separação de fases e redução do teor da substância ativa (BRASIL, 2005).

São descritos três tipos de estudos de estabilidade, sendo eles: Longa duração, de acompanhamento e acelerado. O estudo de longa duração é projetado para avaliação das características físicas, químicas, biológicas e microbiológicas de um produto farmacêutico durante e, opcionalmente, depois do prazo de validade esperado, utilizados principalmente para estabelecer ou confirmar o prazo de validade. O estudo de acompanhamento é utilizado para verificar se o produto farmacêutico mantém suas características físicas, químicas, biológicas, e microbiológicas conforme os resultados obtidos nos estudos de estabilidade de longa duração. O estudo de estabilidade acelerado é projetado para acelerar a degradação química e/ou mudanças físicas de um produto farmacêutico em condições forçadas de armazenamento. Os dados obtidos podem ser usados para avaliar efeitos químicos e físicos prolongados em condições não aceleradas (BRASIL, 2005).

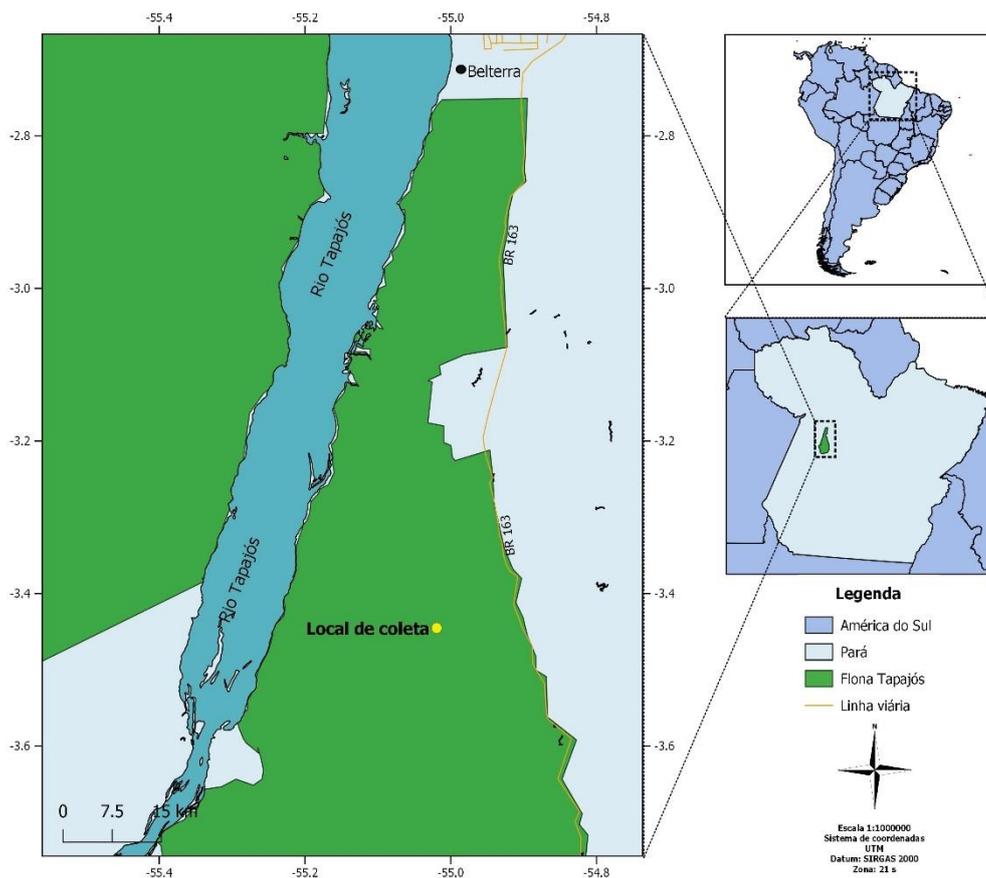
4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 COLETA DO ÓLEORRESINA DE *Copaifera reticulata*

4.1.1 Local de coleta

O óleo-resina de *Copaifera reticulata* (ORCR) foi coletado na Floresta Nacional do Tapajós (FLONA), em uma área de floresta ombrófila densa ($3^{\circ} 20' 43.5''\text{S } 55^{\circ} 01' 09.1''\text{O}$), localizada no município de Belterra-PA, no Km 83 da BR-163 (Figura 3). A coleta ocorreu no período de setembro de 2017, correspondendo ao período de seca na região amazônica. A identificação botânica foi realizada pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) Amazônia Oriental, sendo a exsicata depositada no herbário do Instituto Agrônomo do Norte (IAN), sobre registro NID: 58/2016.

Figura 3- Mapa de coordenadas geográficas do ponto de coleta do óleo-resina de *Copaifera reticulata*.



Fonte: O autor.

4.1.2 Extração do óleo-resina

O método de extração utilizado foi descrito por Alencar (1982). A árvore foi perfurada com o trado de 2 cm de diâmetro e 45 cm de comprimento, fazendo-se dois orifícios na altura de 1 metro acima do nível do solo. O orifício da árvore foi vedado com um cano do tipo PVC com $\frac{3}{4}$ de diâmetro e 10 cm de comprimento. O óleo coletado foi armazenado em recipientes âmbar (1000 mL), a fim de evitar a oxidação causada pela luz.

4.2 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

4.2.1 Esterificação do óleo-resina de *Copaifera reticulata*

Foi pesado 150 mg de ORCR e adicionou-se 5,0 mL de NaOMe ($0,25 \text{ mol.L}^{-1}$) em metanol: éter dietílico (1: 1) e agitou-se durante 2 minutos. Depois foi adicionado 3,0 mL de hexano, mais 15,0 mL de solução de cloreto de sódio saturado. Agitou-se vigorosamente a mistura durante 15 minutos. Após esse período foi feita a separação de fases em um funil de decantação e aliquoteado 1,0 mL da fase sobrenadante para a análise cromatográfica.

4.2.2 Cromatografia gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM) do ORCR

A análise química do ORCR foi realizada por Cromatografia de fase gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM) com a injeção de 1 μL (Auto injetor AOC-20i) em sistema Shimadzu QP 2010 ultra equipado com coluna capilar de sílica Rtx-5MS (Restek, EUA) de 30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno revestido com 5%-difenil/95%-dimetil-polisiloxano (0,25 μm de espessura do filme). A temperatura do forno do CG foi programada de 100°C (5 min) a 260°C (20 min) 4°C/min, as temperaturas do injetor (split 1:40), linha de transferência e câmara de ionização foram de 250, 250 e 200°C, respectivamente. Hélio foi usado como gás de arraste a um fluxo de 1 mL/minuto. Os espectros de massas foram obtidos por impacto eletrônico a 70 eV com scans automáticos (varredura) na faixa de 35 a 400 daltons a 0,30 scans/s. A identificação dos componentes foi baseada no tempo e índice de retenção linear (série de *n*-alcanos C8-C40), na interpretação e comparação dos espectros de massas obtidos com as bibliotecas ADAMS (2007).

4.3 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO ÓLEORRESINA DE *Copaifera reticulata*

4.3.1 Cepas Bacterianas

A atividade antimicrobiana foi realizada com cepas padrão ATCC (*American Type Culture Collection*), obtidas através do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). Foram selecionados microrganismos associados a vaginose bacteriana como: *Gardnerella vaginalis* ATCC-49154, *Staphylococcus aureus* ATCC-14458, *Staphylococcus epidermidis* ATCC-12228, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC-19429 e *Escherichia coli* ATCC-25922.

Foram preparadas suspensões com estes micro-organismos em tubos de ensaio com solução salina estéril para ajustada turbidez na escala 0,5 de McFarland, através de espectrofotometria em comprimento de onda de 530 nm, correspondente a $1,0 \times 10^8$ UFC/mL.

4.3.2 Teste de difusão em disco

A sensibilidade dos microrganismos ao ORCR foi avaliada pelo método de difusão em disco (BAUER *et al.*, 1966), onde uma alíquota de 100 μ L da suspensão bacteriana foi inoculada em placas de Petri contendo Ágar Mueller-Hinton (AMH) e Ágar Sangue (AS) para a cepa de *G. vaginalis*, e em seguida foram dispostos discos de papel filtro estéreis de 6 mm de diâmetro previamente embebidos com 10 μ L do óleo de copaíba. Adicionalmente, foram inseridos discos para adição da solução controle, utilizando o antibiótico ciprofloxacino na concentração 1250 μ g/mL, e como controle negativo foi utilizado solução salina estéril.

Os ensaios foram realizados em triplicata e as placas foram mantidas em estufa a $37^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ durante 24 h, exceto a placas inoculadas com *G. vaginalis*, armazenada em jarra de anaerobiose e mantidas a $37^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ durante 72 h. Após o período de incubação foram medidos os halos de inibição com o auxílio de paquímetro, para as cepas sensíveis ao óleo. Os resultados foram expressos em milímetro pela média aritmética e respectivo desvio padrão.

4.3.3 Determinação da Concentração Mínima Inibitória – CMI

Foi determinada a Concentração Mínima Inibitória através da técnica de microdiluição conforme o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2003) em triplicata, utilizando microplacas de 96 poços. Inicialmente os poços teste foram preenchidos com 100 µL de Caldo Mueller-Hinton e 100 µL de ORCR, diluídos com Tween 80 a 1% e realizado a diluição seriada para obtenção das concentrações entre 1000 a 7,8 µg/mL. Posteriormente, uma alíquota de 20 µL do inóculo bacteriano foi adicionada. Foram também preparados poços para determinação da esterilidade do meio (apenas o meio de cultura), da viabilidade do inóculo (meio de cultura e 20 µL de inóculo bacteriano) e o controle contendo o antibiótico (meio de cultura, o inóculo e a solução de Ciprofloxacino na concentração de 1250 µg/mL).

As microplacas foram mantidas em estufa por 24 h à 37°C±2°C, exceto a cepa de *Gardnerella vaginalis* que permaneceu por 72 h. Posteriormente foi adicionado 50µL de uma solução de Resazurina a 0,01%, que indicou a viabilidade do inóculo bacteriano. Para determinação da ação bactericida foi realizado a subcultura do volume contido nos poços da CMI em placas de Petri contendo ágar Müller-Hinton (AMH). As placas foram mantidas a 37°C±2°C por 24 h e o não aparecimento de colônias bacterianas indicou ação bactericida.

4.4 DELINEAMENTO DAS FORMULAÇÕES FITOTERÁPICAS BASEADAS EM MANTEIGA DE *Astrocaryum murumuru* Mart CONTENDO ÓLEORRESINA DE *Copaifera reticulata* Ducke

Para obtenção das formulações base foram testados 5 grupos de sistemas emulsionados do tipo líquido cristalino descritos no pedido de patente número BR 1020150308884 (Anexo A), com autorização prévia dos seus inventores. As formulações tiveram em suas composições quantidades fixas do tensoativo Procetyl® (40%) e diferentes concentrações de água (5-25%) e de manteiga de murumuru (35-55%).

O preparo das formulações base foi realizada por aquecimento da manteiga de murumuru e tensoativo a 45°C, seguida da adição da água à mesma temperatura com agitação constante, depois foi incorporado o óleorresina de copaíba, obtendo as concentrações de 500 mg/g, 250 mg/g, 100 mg/g e 50 mg/g. Em seguida, foram mantidas em repouso à temperatura ambiente (25°C±2°C) por 24 h (NUNES, 2012).

No total foram obtidas 20 formulações com diferentes quantidades de manteiga de murumuru, água e óleo de copaíba, as quais estão descritas nas Tabelas 1, 2, 3 e 4.

Tabela 1- Composição das formulações contendo ORCR na concentração de 50 mg/g

Formulação	Manteiga de Murumuru	Tensoativo (Procetyl®)	Água
F1-M55A05	55%	40%	5%
F2- M50A10	50%	40%	10%
F3- M45A15	45%	40%	15%
F4- M40A20	40%	40%	20%
F5- M35A25	35%	40%	25%

Tabela 2- Composição das formulações contendo ORCR na concentração de 100 mg/g

Formulação	Manteiga de Murumuru	Tensoativo (Procetyl®)	Água
F6-M55A05	55%	40%	5%
F7- M50A10	50%	40%	10%
F8- M45A15	45%	40%	15%
F9- M40A20	40%	40%	20%
F10- M35A25	35%	40%	25%

Tabela 3- Composição das formulações contendo ORCR na concentração de 250 mg/g

Formulação	Manteiga de Murumuru	Tensoativo (Procetyl®)	Água
F11-M55A05	55%	40%	5%
F12- M50A10	50%	40%	10%
F13- M45A15	45%	40%	15%
F14- M40A20	40%	40%	20%
F15- M35A25	35%	40%	25%

Tabela 4- Composição das formulações contendo ORCR na concentração de 500 mg/g

Formulação	Manteiga de Murumuru	Tensoativo (Procetyl®)	Água
F16-M55A05	55%	40%	5%
F17- M50A10	50%	40%	10%
F18- M45A15	45%	40%	15%
F19- M40A20	40%	40%	20%
F20- M35A25	35%	40%	25%

4.5 MICROSCOPIA DE LUZ POLARIZADA

A microscopia de luz polarizada permitiu visualizar estruturas anisotrópicas e birrefringentes. Após 24 horas do preparo, as formulações foram colocadas sobre lâmina de vidro, cobertas com lamínula e submetidas à microscopia de luz polarizada, para a identificação da fase mesomórfica (NUNES, 2012). Como critério de seleção, as amostras que não apresentaram birrefringência foram excluídas do experimento.

4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DAS FORMULAÇÕES

Esse teste foi realizado para avaliar a atividade antimicrobiana das formulações, além de verificar previamente se o sistema líquido-cristalino permite a difusão do ORCR para o meio, utilizando o método de perfuração em ágar (HUGO e RUSSELL, 1983).

Uma alíquota de 100 µL da suspensão bacteriana foi inoculada em placas de Petri contendo AMH e AS, apenas para a cepa de *Gardnerella vaginalis*. Posteriormente foram feitas perfurações nos meios, com o auxílio de uma ponteira de 1mL resultando em poços de 8mm de diâmetro, os quais foram preenchidos com 100 µL das formulações selecionadas. Foram preparados poços contendo as soluções controle do antibiótico ciprofloxacino na concentração de 1250 µg/mL, e a formulações sem o óleo incorporado.

Os ensaios foram realizados em triplicata e as placas foram mantidas a 37°C±2°C por 24 h em estufa, exceto as placas inoculadas com *G. vaginalis*, armazenadas em jarra de

anaerobiose e mantidas a $37^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 72 h. Foram então medidos os halos de inibição com o auxílio de paquímetro.

4.6.1 Seleção das formulações

Como critérios de seleção foram consideradas as formulações que apresentaram atividade antibacteriana igual ou maior que o ORCR. Foi realizada a análise de variância (ANOVA) para comparação das médias dos halos de inibição das formulações, seguida do teste de Dunnet com $p < 0,0001$. Também foram considerados os aspectos macroscópicos (homogeneidade) e aspectos físicos (sólido, líquido e viscosidade) para a seleção das formulações.

4.7 ESTUDO DE ESTABILIDADE ACELERADA

Foram testadas com as formulações anteriormente selecionadas. As amostras foram armazenadas em frascos de vidro âmbar, em triplicata e em duas temperaturas distintas (ambiente a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e estufa a $45 \pm 2^{\circ}\text{C}$) durante 60 dias, sendo periodicamente monitoradas (BRASIL, 2005).

As formulações à temperatura ambiente ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$) foram utilizadas como referência, onde são esperadas as menores alterações físico-químicas (BRASIL, 2005). Todas as amostras foram avaliadas durante os intervalos de 1, 15, 30, 60 dias para verificar possíveis alterações nas características organolépticas (aspecto, cor e odor) (BRASIL, 2005). Adicionalmente, foram avaliadas a influência de possíveis mudanças físicas nos sistemas líquidos cristalinos através da observação da sua birrefringência por microscopia de luz polarizada e possíveis alterações na difusão do ORCR das formulações por meio da atividade antimicrobiana.

4.7.1 Avaliação das Características Organolépticas

Para avaliar a estabilidade acelerada das formulações em estudo foram considerados as características organolépticas, por meio de observação, considerando modificações na coloração, odor ou sinal de separação de fases. Os critérios utilizados para avaliar estão descritos no Quadro 1.

Quadro 1- Avaliação das características organolépticas

N	Normal
LMA	Leve Modificação da Aparência
LMC	Leve Modificação da Cor
LMO	Leve Modificação do Odor
MA	Modificação da Aparência
MC	Modificação da Cor
MO	Modificação do Odor
IMA	Intensa Modificação da Aparência
IMC	Intensa Modificação da Cor
IMO	Intensa Modificação do Odor

Fonte: (BÜHLER e FERREIRA 2008)

4.8 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO ESTUDO DE ESTABILIDADE ACELERADA SOBRE POSSÍVEIS ALTERAÇÕES FÍSICAS NAS ESTRUTURAS LÍQUIDO-CRISTALINAS DAS FORMULAÇÕES

A cada intervalo do estudo de estabilidade foram realizadas microscopias das amostras em um microscópio de luz polarizada, a fim de verificar se as estruturas líquido cristalinas sofreram alterações durante o armazenamento em temperaturas extremas. Para isso, amostras das formulações foram colocadas sobre lâmina de vidro, cobertas com lamínula e visualizadas, para identificar possíveis alterações ópticas nas propriedades físicas de anisotropia e birrefringência.

4.9 AVALIAÇÃO A INFLUÊNCIA DO ESTUDO ESTABILIDADE ACELERADA SOBRE A ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DAS FORMULAÇÕES

A cada intervalo do estudo de estabilidade acelerada foram realizados ensaios para verificar a influência sobre a atividade antimicrobiana *in vitro* das formulações através do método de perfuração em ágar (HUGO e RUSSELL, 1983). O teste em questão, foi realizado a fim de obter parâmetros de armazenamento que possam garantir a eficácia do produto.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão e a análise estatística foi realizada pelo programa Graphpad Prism® utilizando análise de variância (ANOVA) para múltiplas comparações, seguida do teste de Tukey com $p < 0,05$ para indicar diferença estatística.

5 RESULTADOS

5.1 CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG-EM)

A composição química do óleo-resina de *Copaifera reticulata* está representada na Tabela 5 e o seu cromatograma pode ser observado na Figura 4. O cromatógrafo detectou no total 90 compostos, no entanto foram identificados 29 compostos, que correspondem a 92,47% do conteúdo do óleo-resina. Nesta amostra, os sesquiterpenos foram os compostos majoritários, principalmente o β -Cariofileno (32,43%), β -Bisaboleno (11,28%), α -Humuleno (8,41%), α -Bergamoteno (7,55%), Acetato de cedrila (6,58%), representando aproximadamente 66,25% da composição do óleo.

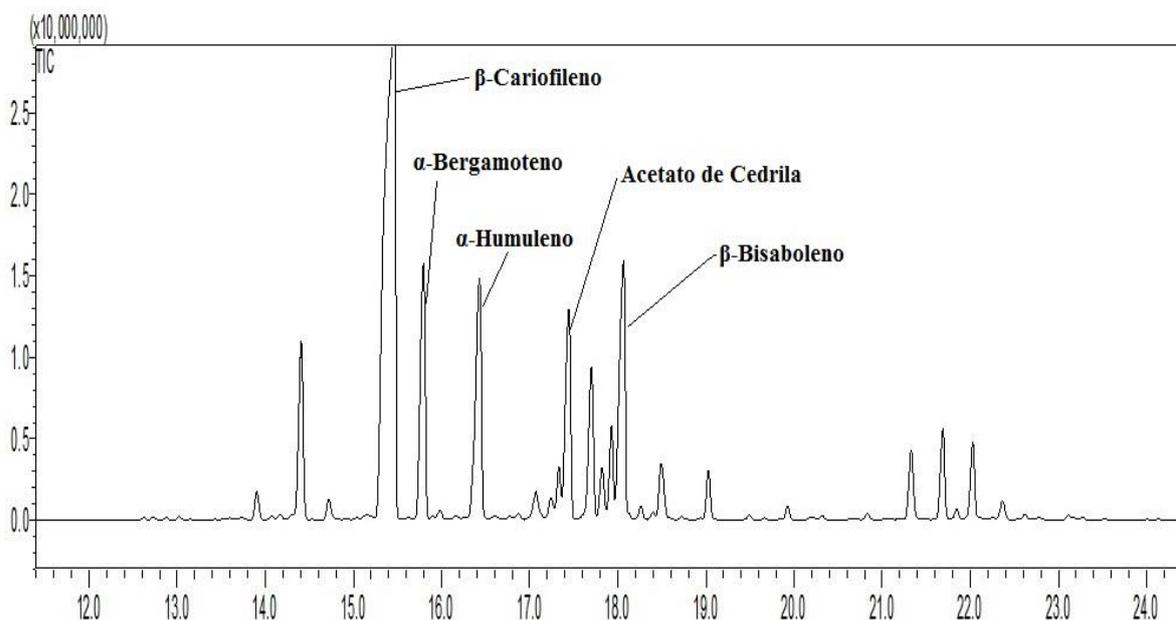
Tabela 5- Teores (%) dos compostos identificados do óleo-resina de *Copaifera reticulata* Ducke.

t_R (min)	IR	Identificação	Ref. Adams (2007)	% Rel.
3.470	960	Trans-2-Heptan-1-ol	958	0,01
12.615	1473	α -Macrocarpeno	1470	0,05
12.730	1483	Cis 4,10-epoxi-amorfano	1481	0,06
12.870	1494	Aristolóqueno	1490	0,05
13.020	1508	α -Muuroleno	1500	0,08
13.525	1558	α -Muurool-5-en-4-ol	1558	0,02
13.600	1565	Germacreno-B	1559	0,04
13.730	1578	Espatulénol	1576	0,08
13.905	1596	Guaiol	1600	0,68
14.165	1610	Khusimone	1610	0,15
14.305	1616	2-(7Z)-Bisaboladien-4-ol	1618	0,14
14.405	1621	Bisaboladien-4-ol	1618	4,84
14.720	1635	γ -Eudesmol	1630	0,58
15.150	1655	Himachalol	1552	0,26
15.460	1669	β -Cariofileno	1668	32,43
15.795	1685	α -Bergamoteno	1688	7,55
15.980	1693	cis,trans-Farnesol	1693	0,27
16.430	1714	α -Humuleno	1715	8,41

(Continuação)

t_R (min)	IR	Identificação	Ref. Adams (2007)	% Rel.
17.070	1745	Khusimol	1741	1,02
17.240	1753	NI		0,64
17.330	1757	Ciclocolorenona	1759	1,29
17.445	1763	Acetato de cedrila	1767	6,58
17.700	1775	Acetato de hinesol	1783	4,45
17.820	1781	Isobutirato nerolidol	1783	1,41
17.930	1786	β -Bisaboleno	1789	11,28
18.495	1792	β -Cedreno	1808	1,75
19.030	1813	Acetato de Farnesila	1845	1,18
19.930	1840	Farnesil acetona	1886	0,33
21.330	1884	NI		1,88
21.690	1956	NI		2,31
22.030	1974	Geranil linalol	1998	2,12
22.365	1992	Dolabradieno	2000	0,53
Total				92,47%

IR- Índice de Retenção, NI - Não Identificado

Figura 4- Perfil cromatográfico do óleo-resina de *Copaifera reticulata* Ducke.

5.2 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO ÓLEORRESINA DE *Copaifera reticulata*

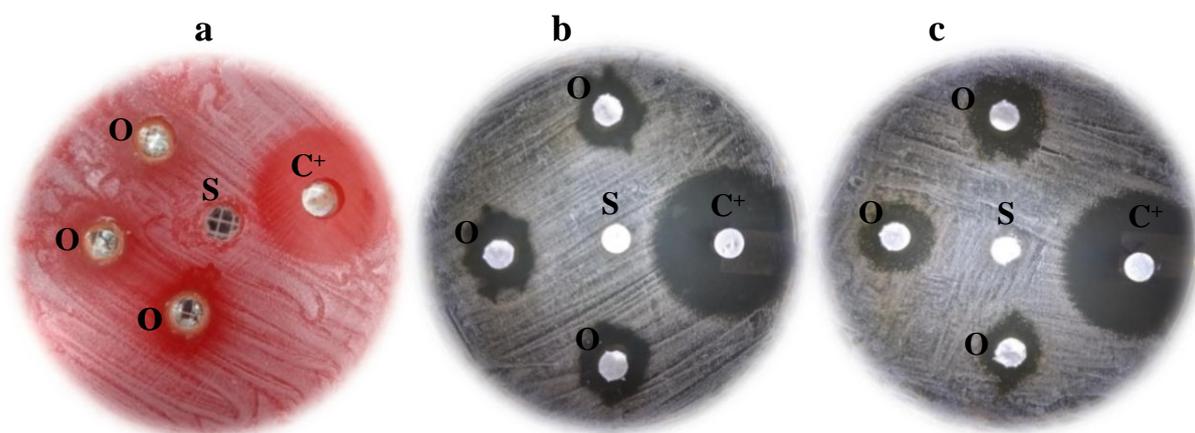
5.2.1 Teste de difusão em disco

Foi observado que o óleo-resina *Copaifera reticulata* foi capaz de inibir o crescimento de todos os microrganismos testados, entretanto, apresentou maior atividade contra as cepas de *Gardnerella vaginalis* e *Staphylococcus epidermidis*, com halos de inibição 13,33mm e 13 mm, respectivamente. As médias dos halos de inibição dos microrganismos são mostrados na Tabela 6 e o registro fotográfico das placas na Figura 5.

Tabela 6- Média e desvio padrão dos halos de inibição em (mm) do teste de difusão em disco com óleo-resina de *Copaifera reticulata* frente a patógeno relacionados a vaginoses.

Micro-organismos	Halos (mm)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	13±0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8,67±0,58
<i>Staphylococcus aureus</i>	11,33±0,58
<i>Escherichia coli</i>	9,33±0,58
<i>Gardnerella vaginalis</i>	13,33±0,58

Figura 5- Registro fotográfico das placas testadas com o ORCR pelo teste de difusão em disco. a) *Gardnerella vaginalis*; b) *Staphylococcus aureus*; c) *Escherichia coli*. O= (Óleo-resina), S= (Controle negativo); C+= (Controle positivo).



5.2.2 Concentração mínima inibitória-CMI

Após a adição da resazurina nos poços foi observado que as cepas de *Staphylococcus epidermidis*, *Gardnerella vaginalis* e *Pseudomonas aeruginosa* apresentaram CMI de 500 µg/mL do óleo-resina. Enquanto as cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, uma CMI de 1000 µg/mL. Foi realizado o subcultivo dos poços contendo da CMI e determinado sua ação bacteriostática frente ao óleo-resina de *Copaifera reticulata* (Tabela 7).

Tabela 7- Concentração mínima inibitória (CMI) do ORCR contra os micro-organismos testados.

Microorganismos	CMI (µg/mL)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	500
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	500
<i>Staphylococcus aureus</i>	1000
<i>Escherichia coli</i>	1000
<i>Gardnerella vaginalis</i>	500

5.3 DELINEAMENTO DAS FORMULAÇÕES FITOTERÁPICAS BASEADAS EM MANTEIGA DE *Astrocaryum murumuru* Mart CONTENDO ÓLEORRESINA DE *Copaifera reticulata* Ducke.

Após 24h do preparo, as formulações com concentrações de 250 mg/g e 500 mg/g do ORCR, apresentaram-se macroscopicamente líquidas, transparentes e homogêneas. Enquanto as formulações com concentrações inferiores as supracitadas, 50 mg/g e 100 mg/g de ORCR, apresentaram aspecto semissólido, opaco e homogêneo (Figura 6).

Figura 6– Registro fotográfico das formulações fitoterápicas com diferentes concentrações de ORCR, na mesma concentração de água e manteiga de Murumuru. a) F2-M50A10 (50mg/g); b) F7-M50A10 (100mg/g); c) F12-M50A10 (250mg/g).

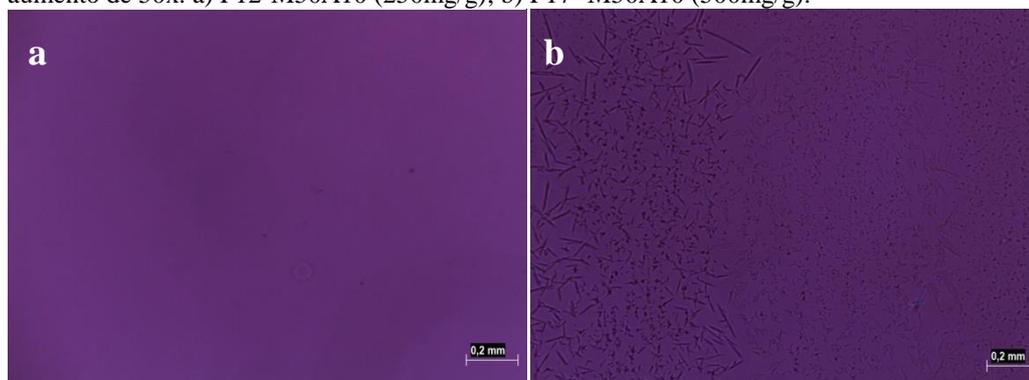


5.4 MICROSCOPIA DE LUZ POLARIZADA

Após 24 h do preparo das formulações, todas as formulações foram submetidas à luz polarizada, e as fotomicrografias estão apresentadas nas Figuras 7, 8 e 9.

A incorporação de diferentes concentrações de ORCR nas formulações influenciou a formação de estruturas líquido-cristalinas. As formulações com maior concentração de óleo, a exemplo de 250 mg/g e 500 mg/g, não apresentaram anisotropia, pois não houve desvio do plano da luz polarizada como demonstrado em suas fotomicrografias com campo escuro ou isotrópico (Figura 7).

Figura 7- Fotomicrografias das formulações nas concentrações de ORCR de 250 mg/g e 500 mg/g apresentando isotropia (campo escuro), observadas ao microscópio de luz polarizada, com aumento de 50x. a) F12-M50A10 (250mg/g); b) F17- M50A10 (500mg/g).



Formulações com menores concentrações de ORCR, a exemplo de 50 mg/g e 100 mg/g, independente dos conteúdos de água, mostraram-se anisotrópicas e com birrefringência, apresentando texturas em forma de estrias, característico de estrutura líquido-cristalina de fase hexagonal (Figuras 8 e 9).

Figura 8- Fotomicrografias das formulações na concentração de 50 mg/g observadas ao microscópio de luz polarizada apresentando anisotropia, com estrias características de fase hexagonal, aumento 50x. a) F1-M55A05; b) F2-M50A10; c) F3-M45A15; d) F4-M40A20; e) F5-M35A25.

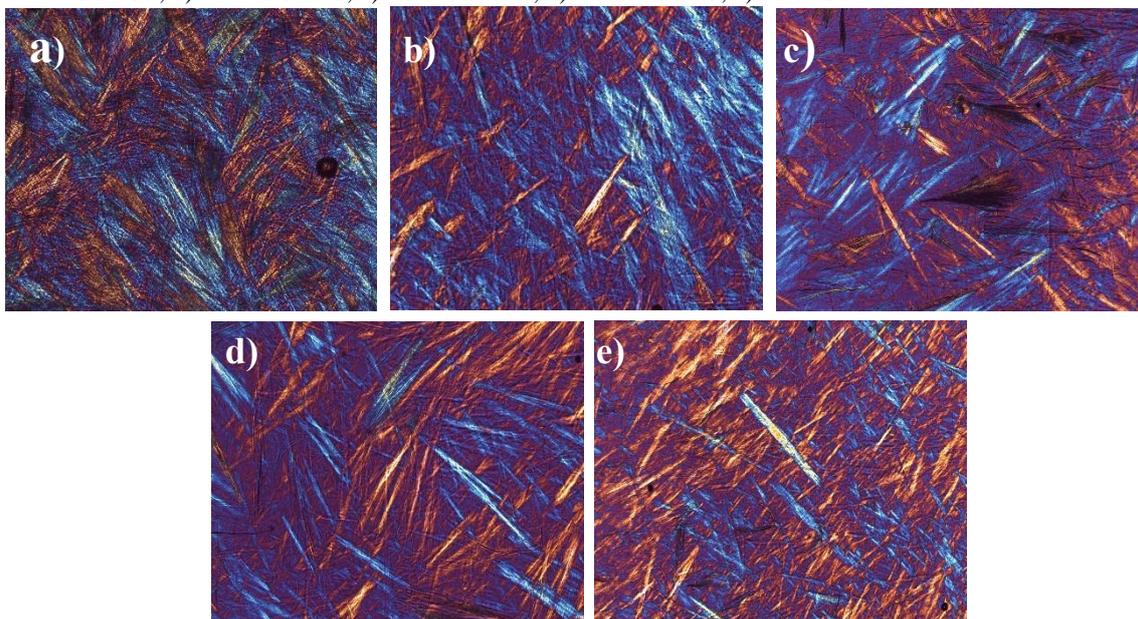
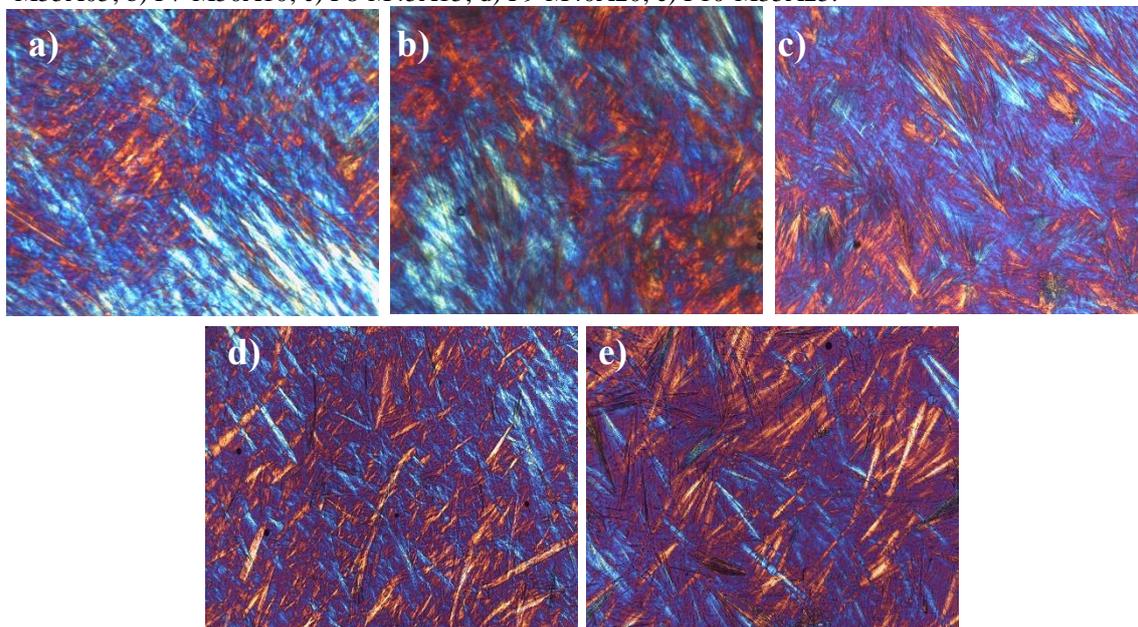


Figura 9- Fotomicrografias das formulações na concentração de 100 mg/g observadas ao microscópio de luz polarizada apresentando anisotropia, com estrias características de fase hexagonal, aumento 50x. a) F6-M55A05; b) F7-M50A10; c) F8-M45A15; d) F9-M40A20; e) F10-M35A25.



As formulações com concentrações de 250 mg/g e 500 mg/g de ORCR não se adequaram aos objetivos do estudo, pois não apresentaram fase líquido-cristalina e aspecto semissólido. Desta forma, as formulações com concentrações de 50mg/g e 100mg/g de ORCR, foram selecionadas como candidatas ao desenvolvimento do gel vaginal fitoterápico.

5.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DAS FORMULAÇÕES

Todas as formulações contendo ORCR apresentaram atividade antibacteriana. Ademais, as médias dos halos de inibição diminuíram a medida que houve redução da proporção da fase oleosa em detrimento da proporção da fase aquosa das formulações.

A formulação (F1-M55A05) apresentou maior atividade frente a cepa de *Gardnerella vaginalis*, com halo de inibição médio de 14,33 mm. Já as formulações contendo 100mg/g de ORCR, a exemplo das F7-M50A10 e F8-M45A15, apresentaram maior atividade frente as cepas de *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, ambas com halo de inibição médio de 16,33 mm (Tabelas 8 e 9). Ao comparar as médias dos halos de inibição das formulações com as do óleorresina, foi observado que a cepa de *Pseudomonas aeruginosa* foi a que demonstrou maior aumento no halo de inibição.

Tabela 8- Médias e desvio padrão dos halos de inibição em (mm) do teste de perfuração em ágar das formulações com ORCR na concentração de 50 mg/g frente a patógenos relacionados a vaginose.

Micro-organismos	Formulações com ORCR 50mg/g				
	F6-M55A05	F7-M50A10	F8-M45A15	F9-M40A20	F10-M35A25
<i>S. epidermidis</i>	11,67±0,58	11,33±0,58	11,00±0,00	10,33±0,58	9,33±0,58
<i>P. aeruginosa</i>	13,00±1,00	13,33±0,58	13,33±0,58	12,67±0,58	12,33±0,58
<i>S. aureus</i>	12,33±0,58	13,00±0,00	12,33±0,58	11,67±0,58	11,33±0,58
<i>E. coli</i>	12,67±0,58	12,67±0,58	12,00±0,00	11,67±0,58	11,33±0,58
<i>G. vaginalis</i>	14,33±0,58	14,00±1,00	13,33±0,58	13,00±0,00	12,00±0,00

Tabela 9- Médias e desvio padrão dos halos de inibição em (mm) do teste de perfuração em ágar das formulações com ORCR na concentração de 100 mg/g frente a patógenos relacionados a vaginose

Micro-organismos	Formulações com ORCR 100mg/g				
	F6-M55A05	F7-M50A10	F8-M45A15	F9-M40A20	F10-M35A25
<i>S. epidermidis</i>	15,67±0,58	14,67±0,58	13,67±0,58	12,67±0,58	12,00±0,00
<i>P. aeruginosa</i>	15,67±0,58	16,33±0,58	16,33±0,58	14,67±0,58	13,67±0,58
<i>S. aureus</i>	13,67±0,58	14,00±0,58	14,33±0,58	13,00±1,00	11,33±0,58
<i>E. coli</i>	15,33±0,58	16,33±0,58	16,33±0,58	14,67±0,58	13,67±0,58
<i>G. vaginalis</i>	15,67±0,58	14,67±0,58	13,67±0,58	12,67±0,58	12,00±0,00

Para a seleção das formulações com potencial aplicação no tratamento de vaginoses, foi realizado a comparação dos halos de inibição do óleo-resina de *Copaifera reticulata* frente aos micro-organismos testados.

As formulações com concentrações de 50mg/g e 100mg/g apresentaram halos de inibição superiores quando comparados com os halos de inibição do ORCR, exceto as formulações na concentração de 50mg/g testados com a cepa de *Staphylococcus epidermidis*.

Ao comparar as médias dos halos das formulações de 50mg/g com os halos do ORCR foi observado que para as cepas de *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* todas as amostras possuíam halos de inibição significativos ($p < 0,0001$). Apesar dos halos de inibição das formulações serem superiores para as cepas de *Staphylococcus aureus* e *Gardnerella vaginalis*, estes não demonstraram ser significativos ($p < 0,0001$), (Figura 10).

Por outro lado, ao comparar as médias dos halos das formulações de 100mg/g com os halos do ORCR, também foi observado que para as cepas de *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* todas as amostras possuíam halos de inibição significativos ($p < 0,0001$). No entanto, para a cepa de *Gardnerella vaginalis* todas as formulações foram ativas, apenas a formulação F10-M35A25 não foi estatisticamente significativa ($p < 0,0001$). Já para a cepa de *Staphylococcus epidermidis*, apenas as formulações F6-M55A05, F7-M50A10 e F8-M45A15 foram estatisticamente significativas. Para *Staphylococcus aureus* somente a amostra F6-M55A05 foi significativa ($p < 0,0001$), (Figura 11).

Figura 10- Gráfico das médias dos diâmetros dos halos inibição (mm) do grupo das formulações com 50mg/g de ORCR frente os micro-organismos testados através do método de perfuração em ágar. *p < 0,0001 em comparação aos valores obtidos do ORCR (ANOVA, seguida teste de Dunnet).

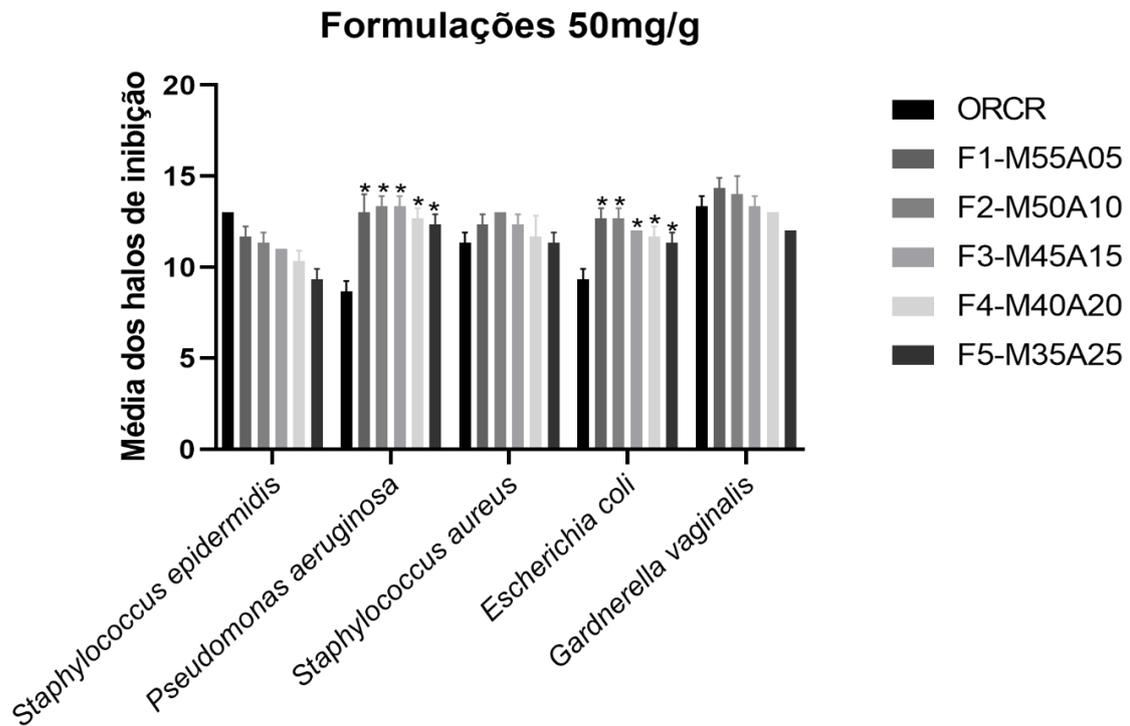
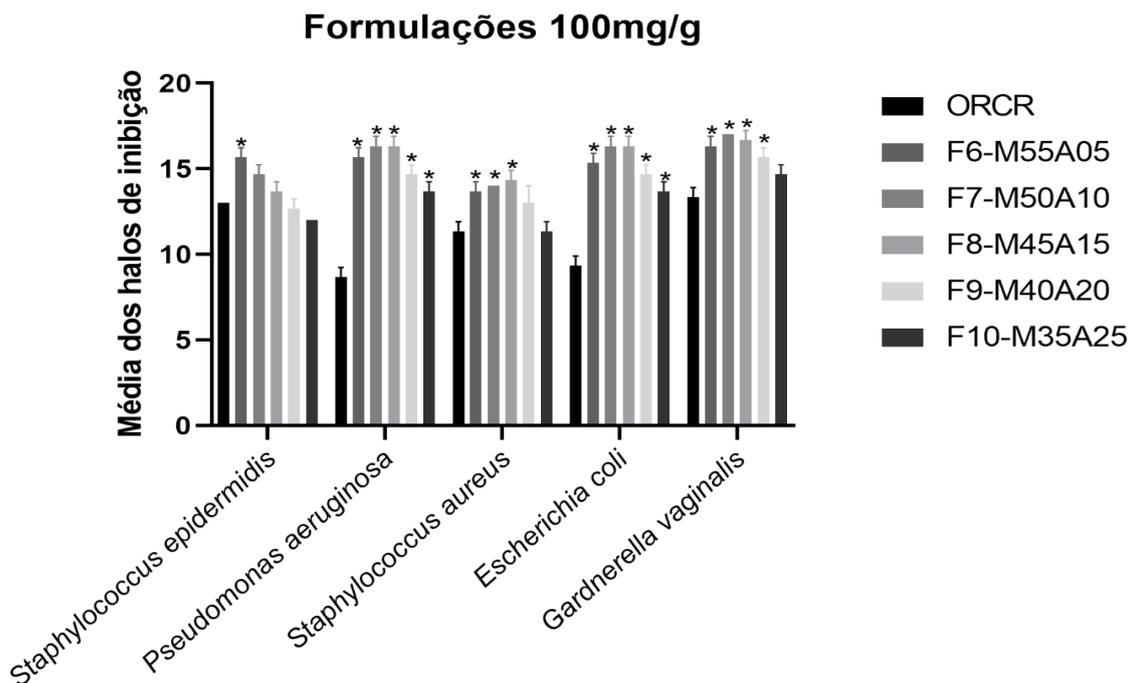


Figura 11- Gráfico das médias dos diâmetros dos halos inibição (mm) do grupo das formulações com 100mg/g de ORCR frente os micro-organismos testados através do método de perfuração em ágar. *p < 0,0001 em comparação aos valores obtidos do ORCR (ANOVA, seguida teste de Dunnet).



Desta forma, as formulações do grupo de 50mg/g de ORCR apresentaram significância estatística apenas para as cepas de *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, enquanto que as formulações contendo 100mg/g de óleo apresentaram halo de inibição superiores frente aos microrganismos testados, e na análise estatística foi observada maior significância em relação aos halos de inibição ORCR para a maioria dos patógenos.

Além disso, as formulações com maiores concentrações de fase aquosa, F4-M40A20, F5-M35A25, F9-M40A20 e F10-M35A25 apresentam os menores halos de inibição, além de apresentar elevada viscosidade e baixa espalhabilidade, o que as tornaram de difícil aspiração e extrusão pelas seringas utilizadas para aplicação das formulações nos poços, durante a perfuração em ágar. Os fatores supracitados também podem limitar a aplicação dessas formulações como sistema de liberação de fármacos em cavidades revestidas por mucosas, a exemplo da mucosa vaginal, por isso, essas formulações foram excluídas deste estudo.

Verificou-se que as formulações base, sem o ORCR incorporado (controle negativo), também apresentaram atividade antimicrobiana. Em vista disso, realizou-se a atividade antimicrobiana individualmente dos constituintes da formulação, e apenas o Procetyl® apresentou atividade para todos os micro-organismos.

Diante destes resultados, foram selecionadas as formulações F6-M55A05 F7-M50A10 F8-M45A15 para o ao estudo de estabilidade acelerada, pois dentre todas as formulações testadas, foram as que apresentaram os maiores halos de inibição e adequada viscosidade. Devido a influência da atividade antimicrobiana das formulações base, os valores dos halos de inibição passaram a ser registradas e comparadas a significância estatística dos halos de inibição destas formulações no estudo de estabilidade acelerada.

5.6 ESTUDO DE ESTABILIDADE ACELERADA

5.6.1 Avaliação das Características Organolépticas

As formulações pré-selecionadas, F6-M55A05, F7-M50A10 e F8-M45A15 e suas bases (sem ORCR incorporado), foram submetidas ao estudo de estabilidade acelerada monitoradas periodicamente durante 60 dias. Na tabela 10 estão descritos os resultados da caracterização organolépticas. Todas as formulações acondicionadas na temperatura ambiente (25°C) não sofreram modificações em relação à cor, odor ou aparência física. Porém, apenas as formulações com ORCR expostas à temperatura de estufa (45°C), apresentaram alterações no

odor a partir do 30º dia, ocorrendo perda do odor característico do óleo-resina de *Copaifera reticulata*, intensificando-se no 60º dia.

Tabela 10– Resultados da avaliação das características organolépticas (cor, odor, aparência) das formulações analisadas durante o período de 60 dias.

	Formulações	Dia 1	Dia 15	Dia 30	Dia 60
Ambiente (25±2°C)	F6-M55A05	N	N	N	N
	F7-M50A10	N	N	N	N
	F8-M45A15	N	N	N	N
	Base F6-M55A05	N	N	N	N
	Base F7-M50A10	N	N	N	N
	Base F8-M45A15	N	N	N	N
Estufa (45±2°C)	F6-M55A05	N	N	LMO	MO
	F7-M50A10	N	N	LMO	MO
	F8-M45A15	N	N	LMO	MO
	Base F6-M55A05	N	N	N	N
	Base F7-M50A10	N	N	N	N
	Base F8-M45A15	N	N	N	N

N = Normal, LMO = Leve Modificação do Odor, MO = Modificação no Odor

5.7 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO ESTUDO DE ESTABILIDADE ACELERADA SOBRE POSSÍVEIS ALTERAÇÕES FÍSICAS NAS ESTRUTURAS LÍQUIDO-CRISTALINAS DAS FORMULAÇÕES

Durante o estudo de estabilidade as formulações foram submetidas a microscopia de luz polarizada periodicamente, a fim de verificar possíveis alterações na fase líquido-cristalina das formulações armazenadas em diferentes temperaturas. De acordo com as fotomicrografias foi possível observar que apesar das formulações apresentarem leves mudanças microscópicas, como alterações em sua estrutura estriada, em ambas as temperaturas de armazenamento (25±2°C e 45±2°C) não ocorreu mudança de fase cristalina (Apêndice A).

5.8 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO ESTUDO DE ESTABILIDADE ACELERADA SOBRE A ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DAS FORMULAÇÕES

Todas as formulações base (sem ORCR) demonstraram atividade antimicrobiana e mantiveram halos de inibição estáveis, não apontando diferença estatística significantes entre si, em ambas as temperaturas de armazenamento durante os 60 dias. No entanto, todas as formulações a 100mg/g de ORCR apresentaram halos de inibição superiores, com significância estatística quando comparadas com os halos de inibição das bases.

Os halos de inibição variaram entre as formulações com ORCR submetidas em temperaturas ambiente ($25^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$) e estufa ($45^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$), porém, no geral os halos de inibição das amostras a temperatura de 25°C foram superiores aos das amostras na temperatura de 45°C .

Ao comparar os halos de inibição das formulações com a cepa de *Staphylococcus epidermidis*, foi observado que ambas as formulações F6-M55A05 e F7-M50A10 não demonstraram variação significativa nos halos de inibição para esta cepa durante os 60 dias na temperatura de 25°C , porém na temperatura de 45°C apresentaram variação significativa nos halos de inibição a partir do 30° dia. Enquanto a F8-M45A15 demonstrou variação significativa nos halos de inibição a partir do 60° dia na temperatura de 25°C , enquanto na temperatura de 45°C apresentou variação significativa nos halos de inibição a partir do 30° dia (Tabela 11).

Tabela 11- Média dos halos de inibição da cepa de *Staphylococcus epidermidis* sobre as formulações testadas em duas temperaturas de armazenamento durante 60 dias, para avaliar a influência da estabilidade acelerada sobre a capacidade de difusão das formulações.

		<i>Staphylococcus epidermidis</i>			
	Formulações	1° dia	15° dia	30° dia	60° dia
T°C	F6-M55A05	15,33±0,58 ^{Aa}	15,33±0,58 ^{Aa}	15,67±0,58 ^{Aa}	15±0,00 ^{Aa}
	F7-M50A10	14,67±0,58 ^{Aa}	14,67±0,58 ^{Aa}	14,33±1,00 ^{Ab}	14,33±0,58 ^{Aa}
	F8-M45A15	13,33±0,58 ^{Ab}	13,67±0,58 ^{Ab}	13,67±0,58 ^{Ab}	12,33±0,58 ^{Bb}
25°C±2°C	Base F6-M55A05	10,33±0,58 ^{Ac}	10,67±0,58 ^{Ac}	10,67±0,58 ^{Ac}	10,00±1,00 ^{Ac}
	Base F7-M50A10	10,67±1,00 ^{Ac}	10,33±0,58 ^{Ac}	11,00±1,00 ^{Ad}	10,67±0,58 ^{Ac}
	Base F8-M45A15	10,00±0,00 ^{Ac}	10,33±0,58 ^{Ac}	10,67±0,58 ^{Ad}	9,67±0,58 ^{Bd}
45°C±2°C	F6-M55A05	15,67±0,58 ^{Aa}	15,67±0,58 ^{Aa}	15,33±0,58 ^{Bb}	15±0,00 ^{Ba}
	F7-M50A10	14,67±0,58 ^{Aa}	14,67±0,58 ^{Aa}	13,33±0,58 ^{Bb}	12,33±0,58 ^{Ba}
	F8-M45A15	13,67±0,58 ^{Ab}	13,33±0,58 ^{Ab}	12,33±0,58 ^{Bc}	11,67±0,58 ^{Bb}
	Base F6-M55A05	10,33±0,58 ^{Bc}	11,67±0,58 ^{Ac}	10,33±0,58 ^{Bd}	9,67±0,58 ^{Cc}
	Base F7-M50A10	10,00±0,00 ^{Bc}	11,33±0,58 ^{Ac}	10,33±0,58 ^{Bd}	9,00±0,00 ^{Cd}
	Base F8-M45A15	10,00±0,00 ^{Bc}	11,33±0,58 ^{Ac}	10,00±0,00 ^{Be}	9,67±0,58 ^{Cd}

Médias com letras diferentes (Maiúscula na linha e minúscula na coluna) indicam diferença estatística ($P<0,05$) pelo teste de Tukey.

Quando a formulação F6-M55A05 foi testada frente à cepa de *Pseudomonas aeruginosa*, não houve variação significativa nos halos de inibição durante os 60 dias a temperatura de 25°C . Porém na temperatura de 45°C apresentou variação significativa nos halos a partir do 60° dia. Enquanto a F7-M50A10 apresentou variação significativa nos halos de inibição a partir do 60° dia na temperatura de 25°C , enquanto na temperatura de 45°C ,

apresentou variação significativa nos halos de inibição a partir do 15º dia. Já a formulação F8-M45A15 apresentou variação significativa nos halos de inibição a partir do 30º dia a temperatura de 25°C, enquanto na temperatura de 45°C começou a apresentar variação significativa nos halos a partir do 15º dia (Tabela 12).

Tabela 12- Média dos halos de inibição da cepa de *Pseudomonas aeruginosa* sobre as formulações testadas em duas temperaturas de armazenamento durante 60 dias, para avaliar a influência da estabilidade acelerada sobre a capacidade de difusão das formulações.

		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			
T°C	Formulações	1º dia	15º dia	30º dia	60º dia
25°C±2°C	F6-M55A05	16,67±0,58 ^{Aa}	16,00±0,00 ^{Aa}	15,67±0,58 ^{Aa}	15,33±0,58 ^{Ba}
	F7-M50A10	16,33±0,58 ^{Aa}	16,00±0,00 ^{Aa}	15,67±0,58 ^{Aa}	15,33±0,58 ^{Ba}
	F8-M45A15	16±1,00 ^{Aa}	15,67±0,58 ^{Aa}	15,33±0,58 ^{Ba}	14,67±0,58 ^{Ba}
	Base F6-M55A05	11±1,00 ^{Ab}	10,33±0,58 ^{Ac}	10,67±0,58 ^{Ad}	10,67±0,58 ^{Ac}
	Base F7-M50A10	10,33±0,58 ^{Ab}	10,67±0,58 ^{Ac}	10,33±0,58 ^{Ad}	10±0,00 ^{Ac}
	Base F8-M45A15	10±1,00 ^{Ac}	10,33±0,58 ^{Ac}	10,33±0,58 ^{Ad}	9±0,00 ^{Bd}
	45°C±2°C	F6-M55A05	16,67±0,58 ^{Aa}	15,33±0,58 ^{Ba}	15,67±0,58 ^{Aa}
F7-M50A10		15,67±0,58 ^{Aa}	15,33±0,58 ^{Aa}	13,67±0,58 ^{Cc}	13,67±0,58 ^{Cb}
F8-M45A15		16,33±0,58 ^{Aa}	15,00±0,00 ^{Bb}	14,67±0,58 ^{Bb}	14±0,00 ^{Cb}
Base F6-M55A05		10,67±0,58 ^{Ab}	10,67±0,58 ^{Ac}	11,00±0,00 ^{Ad}	11±0,58 ^{Ac}
Base F7-M50A10		10,33±0,58 ^{Ac}	11,00±0,00 ^{Ac}	10,67±0,58 ^{Ad}	10,33±0,58 ^{Ac}
Base F8-M45A15		10,33±0,58 ^{Ac}	10,67±0,58 ^{Ac}	10,00±1,00 ^{Ae}	10,67±0,58 ^{Ac}

Médias com letras diferentes (Maiúscula na linha e minúscula na coluna) indicam diferença estatística (P<0,05) pelo teste de Tukey.

Quando a formulação F6-M55A05 foi testada frente à cepa de *Staphylococcus aureus*, não houve variação significativa nos halos de inibição durante os 60 dias a temperatura de 25°C. Contudo, na temperatura de 45°C apresentou variação nos halos a partir do 30º dia. A formulação F7-M50A10 apresentou variação significativa nos halos de inibição a partir do 60º dia a temperatura de 25°C, enquanto na temperatura de 45°C começou a apresentar variação significativa nos halos a partir do 30º dia. Já a formulação F8-M45A15 também demonstrou variação significativa nos halos de inibição a partir do 60º dia a temperatura de 25°C, enquanto na temperatura de 25°C começou a apresentar variação nos halos de inibição a partir do 15º dia (Tabela 13).

Tabela 13- Média dos halos de inibição da cepa de *Staphylococcus aureus* sobre as formulações testadas em duas temperaturas de armazenamento durante 60 dias, para avaliar a influência da estabilidade acelerada sobre a capacidade de difusão das formulações.

<i>Staphylococcus aureus</i>					
T°C	Formulações	1º dia	15º dia	30º dia	60º dia
25°C±2°C	F6-M55A05	13,67±0,58 ^{Aa}	13,33±0,58 ^{Aa}	13,67±0,58 ^{Aa}	13±1,00 ^{Aa}
	F7-M50A10	14,33±0,58 ^{Aa}	14,00±0,00 ^{Aa}	13,67±0,58 ^{Aa}	13,33±0,58 ^{Ba}
	F8-M45A15	13,33±0,58 ^{Ab}	13,67±0,58 ^{Aa}	13,33±0,58 ^{Ab}	12±0,00 ^{Bb}
	Base F6-M55A05	10,33±0,58 ^{Ac}	10,67±0,58 ^{Ac}	10±0,00 ^{Ac}	9,67±0,58 ^{Bc}
	Base F7-M50A10	10,33±0,58 ^{Ac}	10,33±0,58 ^{Ac}	10,67±0,58 ^{Ac}	10,33±0,58 ^{Ad}
	Base F8-M45A15	10,33±0,58 ^{Ac}	10,33±0,58 ^{Ac}	10,67±0,58 ^{Ad}	10,67±0,58 ^{Ad}
45°C±2°C	F6-M55A05	14,33±0,58 ^{Aa}	13,67±0,58 ^{Aa}	13,33±0,58 ^{Ba}	12,67±0,58 ^{Ba}
	F7-M50A10	14,00±0,00 ^{Aa}	13,33±0,58 ^{Ab}	13,00±1,00 ^{Bb}	12,67±0,58 ^{Ba}
	F8-M45A15	14,33±0,58 ^{Aa}	13,00±1,00 ^{Bb}	12,33±0,58 ^{Bb}	11,67±0,58 ^{Cb}
	Base F6-M55A05	10±0,00 ^{Ac}	9,67±0,58 ^{Ad}	9,33±0,58 ^{Bd}	9,67±0,58 ^{Ad}
	Base F7-M50A10	10,33±0,58 ^{Ac}	10,33±0,58 ^{Ad}	10,00±0,00 ^{Ad}	10,33±0,58 ^{Ad}
	Base F8-M45A15	10,33±0,58 ^{Ac}	10,33±0,58 ^{Ad}	10,33±0,58 ^{Ad}	10±0,00 ^{Ad}

Médias com letras diferentes (Maiúscula na linha e minúscula na coluna) indicam diferença estatística (P<0,05) pelo teste de Tukey.

Testada frente à cepa de *Escherichia coli*, a formulação F6-M55A05 apresentou variação significativa nos halos de inibição a partir do 60º dia a temperatura de 25°C, enquanto na temperatura de 45°C houve variação nos halos a partir do 30º dia. A formulação F7-M50A10 apresentou variação significativa nos halos de inibição a partir do 60º dia a temperatura de 25°C, enquanto na temperatura de 45°C começou a apresentar variação nos halos a partir do 30º dia. E a formulação F8-M45A15 demonstrou variação significativa nos halos de inibição a partir do 60º dia a temperatura de 25°C, enquanto na temperatura de 45°C começou a apresentar variação nos halos a partir do 15º dia (Tabela 14).

Tabela 14- Média dos halos de inibição da cepa de *Escherichia coli* sobre as formulações testadas em duas temperaturas de armazenamento durante 60 dias, para avaliar a influência da estabilidade acelerada sobre a capacidade de difusão das formulações.

<i>Escherichia coli</i>					
T°C	Formulações	1º dia	15º dia	30º dia	60º dia
25°C±2°C	F6-M55A05	16,00±1,00 ^{Aa}	16,33±0,58 ^{Aa}	16,33±0,58 ^{Aa}	15,33±0,58 ^{Ba}
	F7-M50A10	16,33±0,58 ^{Aa}	16,33±0,58 ^{Aa}	15,67±0,58 ^{Aa}	14,67±0,58 ^{Ba}
	F8-M45A15	16,00±0,00 ^{Aa}	15,33±0,58 ^{Ab}	15,67±0,58 ^{Ab}	14,33±1,00 ^{Bb}
	Base F6-M55A05	10,67±0,58 ^{Bc}	10,33A±0,58 ^{Bc}	11,67±0,58 ^{Ad}	11,67±0,58 ^{Ad}
	Base F7-M50A10	10,33±0,58 ^{Ac}	10,67±0,58 ^{Ac}	10,33±0,58 ^{Ae}	10,00±0,00 ^{Ae}
	Base F8-M45A15	10,33±0,58 ^{Ac}	10,00±1,00 ^{Ac}	10,33±0,58 ^{Ae}	9,67±0,58 ^{Af}
45°C±2°C	F6-M55A05	16,33±0,58 ^{Aa}	16,67±0,58 ^{Aa}	15,33±0,58 ^{Bb}	14,67±0,58 ^{Bb}
	F7-M50A10	15,67±0,58 ^{Ab}	15,33±0,58 ^{Ab}	14,00±1,00 ^{Bc}	13,67±0,58 ^{Cc}
	F8-M45A15	16,33±0,58 ^{Aa}	15,33±0,58 ^{Bb}	14,33±0,58 ^{Cc}	13,33±0,58 ^{Dd}
	Base F6-M55A05	10,33±0,58 ^{Ac}	10,33±0,58 ^{Ac}	10,67±0,58 ^{Af}	10,00±0,00 ^{Ae}
	Base F7-M50A10	10,33±0,58 ^{Ac}	10,00±1,00 ^{Ac}	10,33±0,58 ^{Af}	9,67±0,58 ^{Af}
	Base F8-M45A15	10,33±0,58 ^{Ac}	10,67±0,58 ^{Ad}	9,33±0,58 ^{Bf}	9,33±0,58 ^{Bf}

Médias com letras diferentes (Maiúscula na linha e minúscula na coluna) indicam diferença estatística ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Testada frente à cepa de *Gardnerella vaginalis*, a formulação F6-M55A05 não demonstrou variação significativa nos halos de inibição durante os 60 dias em ambas as temperaturas de armazenamento, 25°C e 45°C. Enquanto as formulações F7-M50A10 e -M45A15 somente apresentaram variação significativa nos halos de inibição a partir do 60º dia nas temperatura de 25°C e 45°C (Tabela 15).

Tabela 15- Média dos halos de inibição da cepa de *Gardnerella vaginalis* sobre as formulações testadas em duas temperaturas de armazenamento durante 60 dias, para avaliar a influência da estabilidade acelerada sobre a capacidade de difusão das formulações.

<i>Gardnerella vaginalis</i>					
T°C	Formulações	1º dia	15º dia	30º dia	60º dia
25°C±2°C	F6-M55A05	17,00±1,00 ^{Aa}	16,67±0,58 ^{Aa}	16,67±0,58 ^{Aa}	16,33±0,58 ^{Aa}
	F7-M50A10	16,67±0,58 ^{Aa}	16,67±0,58 ^{Aa}	16,33±0,58 ^{Aa}	16±1,00 ^{Ba}
	F8-M45A15	16,67±0,58 ^{Aa}	16,67±0,58 ^{Aa}	16,33±1,00 ^{Aa}	15,67±0,58 ^{Ba}
	Base F6-M55A05	12,33±0,58 ^{Ab}	12,33±0,58 ^{Ac}	11,67±0,58 ^{Ac}	11,67±0,58 ^{Ab}
	Base F7-M50A10	12,00±1,00 ^{Ab}	12,33±0,58 ^{Ac}	11,67±0,58 ^{Ac}	11,33±0,58 ^{Bb}

(Continuação)

<i>Gardnerella vaginalis</i>					
T°C	Formulações	1º dia	15º dia	30º dia	60º dia
25°C±2°C	Base F8-M45A15	12,00±1,00 ^{Ab}	11,67±0,58 ^{Ac}	11,33±0,58 ^{Ac}	10,67±0,58 ^{Bb}
	F6-M55A05	16,67±0,58 ^{Aa}	16,33±0,58 ^{Aa}	16,33±0,58 ^{Aa}	16±1,00 ^{Aa}
	F7-M50A10	16,67±0,58 ^{Aa}	16,67±0,58 ^{Aa}	16,33±0,58 ^{Aa}	15,67±0,58 ^{Ba}
45°C±2°C	F8-M45A15	16,33±0,58 ^{Aa}	16,00±1,00 ^{Ab}	15,67±0,58 ^{Ab}	15,67±0,00 ^{Ba}
	Base F6-M55A05	11,33±0,58 ^{Ab}	11,00±0,00 ^{Ac}	11,67±0,58 ^{Ac}	11,67±0,58 ^{Ab}
	Base F7-M50A10	11,67±0,58 ^{Ab}	11,67±0,58 ^{Ac}	11,67±0,58 ^{Ac}	11,33±0,58 ^{Ab}
	Base F8-M45A15	11,67±0,58 ^{Ab}	11,33±0,58 ^{Ac}	11,33±0,58 ^{Ac}	11,33±0,58 ^{Ab}

Médias com letras diferentes (Maiúscula na linha e minúscula na coluna) indicam diferença estatística ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Diante dos resultados supracitados, foi possível verificar que, dentre as formulações testadas frente aos micro-organismos associados à vaginose, as formulações com a menor proporção de fase aquosa, F6-M55A05 e F7-M50A10, demonstraram melhores médias de halos de inibição para atividade antimicrobiana. Além disso, houve baixa variação nos halos de inibição na temperatura de 25°C durante os 60 dias. Quando armazenadas sob temperatura de 45°C, houve variação dos tamanhos dos halos de inibição entre o 30º e 60º dia.

No entanto, a formulação F6-M55A05 se destacou por exibir melhor estabilidade em ambas as temperaturas durante os 60 dias de armazenamento. Já a formulação F8-M45A15, com maior proporção de fase aquosa, apresentou menor atividade antibacteriana com tamanhos inferiores de halos de inibição, sendo a formulação menos estável. Desta forma, foi evidenciado que o aumento na concentração de água nas formulações influenciou negativamente a atividade antimicrobiana e na estabilidade das formulações.

6 DISCUSSÃO

No presente estudo, os compostos identificados no óleo-resina de copaíba estão de acordo com os descritos na literatura. Em comparação com o trabalho de HERRERO-JÁUREGUI *et al.* (2011), no qual se realizou a análise química de 31 amostras de óleo-resina de *Copaifera reticulata* coletadas em diferentes períodos, e verificou-se que os principais compostos encontrados eram sesquiterpenos, principalmente o β -Bisaboleno (30,92%), trans- α -Bergamoteno (21,8%) e o β -Cariofileno (17,42%).

VEIGA JUNIOR *et al.* (2007) analisou a constituição química de três espécies de copaíba, *Copaifera multijuga* Hayne, *Copaifera reticulata* Ducke e *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke. Todas as espécies estudadas apresentaram o β -Cariofileno como composto majoritário, com os valores de 57,5%, 19,7%, 40,9%, respectivamente.

Apesar das espécies de copaíba possuírem variações na composição química dos óleos-resinas, o β -Cariofileno e o α -Bergamoteno são considerados os principais marcadores químicos do óleo-resina do gênero *Copaifera*. Anteriormente, o ácido copálico era considerado o principal marcador químico (CASCON; GILBERT, 2000; LAMEIRA *et al.*, 2009; SANT'ANNA *et al.*, 2007; MARTINS DA SILVA *et al.*, 2008).

Neste trabalho o β -Cariofileno foi o composto majoritário, sendo geralmente encontrada a mistura de iso-Cariofileno, α -Humuleno e Germacreno D, apresentando um anel ciclobutano, sendo uma característica molecular raramente encontrada na natureza (SABULAL *et al.*, 2006). No entanto ele também é encontrado em outras espécies vegetais, como nas folhas de *Laurus novocanariensis* e *Cinnamomum osmophloeum* “Louro” e “Canela indígena”, respectivamente (RODILLA *et al.*, 2008).

O β -Cariofileno é considerado um dos compostos de maior relevância no óleo-resina de copaíba, sendo descritos na literatura diferentes atividades biológicas, como anti-inflamatória (CHAVAN *et al.*, 2010), inseticida (RODILLA *et al.*, 2008), anticancerígeno (DI SOTTO *et al.*, 2010; LEGAULT *et al.*, 2007), anestésico local (GHELARDINI *et al.*, 2001) e antimicrobiano (HUANG *et al.*, 2012). No estudo realizado por MENDONÇA e ONOFRE (2009), foi descrita a atividade do óleo-resina de *Copaifera multijuga* Hayne contra cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, registrando halos de inibição de 12 mm para *E. coli* e 13 mm para *S. aureus* e *P. aeruginosa*.

PEREIRA *et al.*, (2018) avaliaram a atividade antimicrobiana do óleo-resina de uma espécie de *Copaifera* sp. e compararam com a ação do óleo comercial de copaíba frente as cepas padrão de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, pelo método

de difusão em disco. Nesse estudo, foi verificado que ambos os óleos apresentam atividade antibacteriana, sendo que *Escherichia coli* foi o microrganismo mais sensível, apresentando halos de inibição de 17,6 mm e 17,8 mm, para o óleo obtido de fonte natural e o óleo comercial, respectivamente. A cepa *Staphylococcus aureus* também foi sensível aos óleos, apresentando halos de inibição de 11,7 mm e 11,5 mm para o óleo obtido de fonte natural e o óleo comercial. Os óleos testados não foram ativos contra a cepa de *Pseudomonas aeruginosa*.

Neste trabalho os micro-organismos apresentaram uma CMI entre 1000-500 µg/mL, porém na literatura não há um consenso em relação aos valores de referência para a CMI de amostras de produtos naturais. Alguns autores estabeleceram valores de referência para a CMI de produtos naturais, como ALIGIANNIS *et al.*, (2001), consideram a CMI com valores menores que 500 µg/mL como potentes inibidores, CMI entre 600 e 1500 µg/mL como inibidores moderados e CMI acima de 1600 µg/mL como fraco inibidor. Já WEBSTER *et al.*, (2008) estabeleceram uma CMI satisfatória com valores iguais ou menores que 1000 µg/mL.

Outros autores observaram valores superiores de CMI com a espécie de *Copaifera reticulata* e também com espécies diferentes de *Copaifera*. A exemplo, o estudo de SANTOS *et al.*, (2008), que avaliaram a atividade antimicrobiana do óleo-resina de três espécies diferentes de copaibeira, *C. martii*, *C. officinalis* e *C. reticulata*, coletadas no estado do Acre, apresentou atividade contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* e *Klebsiella pneumoniae*, com a CMI variando entre 62,5-125 µg/ml.

MASSON *et al.*, (2013) avaliaram a atividade antimicrobiana *in vitro* do óleo-resina da *Copaifera langsdorffii* frente a *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* relacionadas com infecções de úlceras cutâneas, obtendo valores de CIM de 200 µg/mL, 400 µg/mL e 1100 µg/mL para *S. aureus*, *S. pyogenes* e *E. faecalis*, respectivamente. No entanto, as cepas de *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* não foram sensíveis ao óleo-resina desta espécie.

BARDAJÍ *et al.* (2016) também avaliaram a atividade antimicrobiana do óleo-resina de *C. reticulata* testado contra patógenos orais como *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sanguinis* e *Fusobacterium nucleatum*, obtendo uma CMI superior, variando entre 25 µg/mL a 100 µg/mL, relativa a ação bactericida.

No estudo de ZIECH *et al.* (2013) o óleo-resina de *C. reticulata* demonstrou atividade bacteriostática na concentração de 164 µg/mL e bactericida a 1310 µg/mL frente a cepas multirresistentes de *Staphylococcus coagulase* positiva.

As diferenças entre os resultados dos halos de inibição e da CMI do óleo-resina de *Copaifera reticulata* com os resultados dos outros autores podem ser estar relacionados com a variação na composição química entre as copaibeiras, sendo comum até mesmo entre indivíduos da mesma espécie, sendo influenciado principalmente por fatores ambientais, como luminosidade, nutrientes do solo, sazonalidade, e também por fatores biológicos como a infecção por fitopatógenos (CASCON; GILBERT 2000; SANTOS *et al.*, 2008).

Os mecanismos de ação responsáveis pela atividade antimicrobiana do ORCR ainda não foram muito bem elucidados. De acordo com SANTOS *et al.*, (2008) e URZÚA *et al.*, (2008) o óleo-resina de copaíba é capaz de interferir na integridade da parede celular bacteriana, podendo ocasionar lise ou rompimento, liberando o material citoplasmático para o meio externo. De acordo com estes autores, as moléculas que promovem a atividade antibacteriana são capazes de atuar na parede celular interagindo com grupos fosforilados que regulam a manutenção deste compartimento celular.

HUANG *et al.*, (2012) e TOGASHI *et al.*, (2008) descreveram que os terpenóides podem atravessar a membrana plasmática e interferir na permeabilidade iônica da célula bacteriana, principalmente sobre a bomba de H⁺, prejudicando a produção de energia a nível de membrana, sendo este efeito atribuído principalmente ao β-Cariofileno.

Ainda são escassas as comprovações científicas acerca do potencial uso da copaíba para o tratamento de afecções do trato reprodutor feminino, bem como da sua atividade antimicrobiana frente à cepa de *Gardnerella vaginalis*. BRITO *et al.*, (2001), avaliaram os efeitos macro e microscópicos do óleo-resina de *Copaifera* sp. sobre a mucosa vaginal de ratas, em que foi observado baixa interação com a mucosa, promovendo a formação de grumos esbranquiçados aderidos à parede vaginal.

A incorporação do óleo-resina de *Copaifera reticulata* em sistema farmacêutico emulsionado do tipo líquido cristalino é vantajosa para a otimização da sua permeação em pele e mucosas. A estrutura de micelas organizadas das formulações líquido cristalinas favorece a proteção das substâncias ativas contidas em óleos, uma vez que, o empacotamento dentro de suas matrizes minimiza os processos de degradação como a oxidação (SABULAL *et al.*, 2006).

No delineamento farmacêutico, as formulações com 250mg/g e 500mg/g de ORCR, não apresentaram aspecto semissólido e microscopicamente apresentaram-se isotrópicas. Devido a alta concentração de óleo-resina de copaíba nas formulações supracitadas, não houve a gelificação fases líquido cristalinas, provavelmente, à natureza sesquiterpênica do óleo-resina com insaturações em sua cadeia carbônica dificultaram o empacotamento da fase oleosa. Compostos insaturados são capazes de influenciar fortemente a auto-organização molecular na

formação de géis, pois diminuem as interações intermoleculares dos constituintes, como as interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals, alterando o ponto de fusão do sistema. (JOHN *et al.*, 2004; JOHN; VEMULA, 2006).

As formulações contendo 50mg/g e 100mg/g de ORCR apresentam-se como sistemas líquido cristalinos de fase hexagonal, tanto pelas suas características macroscópicas, aparência de gel, quanto pelas suas características microscópicas, apresentando anisotropia e birrefringência, com arranjos angulares em forma de estrias. Cristais líquidos de fase hexagonal consistem de estruturas internas de micelas dispostas continuamente em formas cilíndricas organizadas como um hexágono (MÜLLER-GOYMANN, 2004; PHELPS *et al.*, 2011).

A alta viscosidade das formulações F4-M40A20, F5-M35A25, F9-M40A20 e F10-M35A25A, do grupo 50mg/g e 100mg/g, está relacionada à alta concentração da fase aquosa. A formação de cristais líquidos em altas concentrações de fase aquosa ocorre geralmente quando são adicionado no sistema tensoativos altamente hidrofílicos, como o Procetyl®, sendo o valor de seu EHL=16. O aumento da concentração de água promove uma maior interação em torno da extremidade polar do Procetyl®, promovendo maior número de ligações de hidrogênio com organizações mais complexas e rígidas, aumentando sua viscosidade, assemelhando-se aos cristais-líquidos de fase cúbica (ALAM *et al.*, 2010).

A viscosidade é uma propriedade física de suma importância para a escolha de formulações com aplicação em mucosas e pele (BRUSCHI; FREITAS, 2005). Desta forma, formulações mais fluidas e com viscosidades moderadas possuem mais vantagens técnicas para uma fácil aplicação dentro de cavidade de mucosas, a exemplo de géis vaginais (ANDREWS; JONES, 2006).

Em relação a atividade antimicrobiana, foi observado que ao incorporar o ORCR nas formulações líquido-cristalinas, ocorreu um aumento em sua atividade antibacteriana, principalmente das formulações do grupo de 100mg/g de ORCR. As formulações com menores concentração de fase aquosa demonstraram ser mais fluidas e apresentaram maior atividade antimicrobiana, enquanto as formulações com maior concentração de água demonstraram ser mais viscosas e com menores halos de inibição. Desta forma, o aumento da viscosidade pode estar atuando como um fator limitante na inibição do crescimento bacteriano. Por este motivo, foram selecionadas as formulações com menor concentração de água, F6-M55A05, F7-M50A10 e F8-M45A15 (5, 10 e 15%, respectivamente).

Os cristais-líquidos são capazes de potencializar a ação terapêutica antimicrobiana, pois promovem uma interação mais efetiva dos compostos ativos entre as membranas celulares bacterianas, facilitando sua entrada, otimizando o tempo de contato e conseqüentemente sua

ação biológica (HEGMANN, HAO; MARX, 2007; VAN DER LUBBEN *et al.*, 2001;). RAMOS *et al.*, (2016) avaliaram a atividade antifúngica do extrato de *Syngonanthus nitens* Bong. de um sistema precursor líquido-cristalino para o tratamento de vulvovaginite causada por *Candida krusei*. Os constituintes da formulação foram o Procetyl®, utilizado como surfactante, ácido oleico como fase oleosa e uma dispersão de 2,5% de Carbopol® 974P e 2,5% de Polycarbophil® como fase aquosa. Os autores realizaram a CMI da formulação contendo o extrato de *S.nitens* incorporado à formulação e somente o extrato, e verificaram que o extrato apresentou CMI nas concentrações entre 62,5 e 125µg/mL, enquanto que a formulação com o extrato apresentou uma CMI entre 31,25 e 62,5 µg/mL.

SALMAZI *et al.*, (2015) avaliou a atividade antifúngica de um sistema precursor líquido-cristalino com curcumina incorporada para o tratamento da candidíase vaginal. A formulação apresentava em sua composição Procetyl®, ácido oleico como fase oleosa e uma dispersão de quitosana a 0,5% como fase aquosa. Os autores também avaliaram a CMI da curcumina livre e da incorporada na formulação. A curcumina livre apresentou CMI de 1000 µg/mL para as cepas de *Candida albicans*, porém ao ser incorporada na formulação demonstrou uma CMI nas concentrações 62,5 e 500 µg/mL para as cepas *Candida albicans*.

As formulações base (sem ORCR) também apresentaram atividade antimicrobiana. Em vista disso, foi realizado o teste da atividade antibacteriana para cada constituinte, e foi observado que o responsável pela atividade antimicrobiana foi o Procetyl®. Os surfactantes são compostos que podem apresentar atividade antimicrobiana devido à sua ação solubilizante, os quais provocam alterações na fluidez e na permeabilidade da membrana citoplasmática, causando vazamento de constituintes celulares, como íons e macromoléculas (HAMOUDA; BAKER, 2000; KOFONOW; ADAPPA, 2012; VISCARDI *et al.*, 2000; WU *et al.*, 2011).

No estudo de estabilidade, ao avaliar as características organolépticas das formulações, foi notado que a partir do 30º dia o grupo das formulações com ORCR armazenados em temperatura de 45°C apresentaram alterações no odor, ocorrendo diminuição no odor característico do óleo-resina de copaíba. As alterações nas características organolépticas em altas temperaturas são esperadas, pois cada aumento de 10°C na temperatura pode acelerar entre duas a cinco vezes a degradação de fármacos, promovendo a perda de atividade biológica e/ou volatilização dos componentes das formulações (AULTON, 2005; PINTO *et al.*, 2003).

A avaliação da influência do estudo de estabilidade acelerada sobre possíveis alterações físicas nas estruturas líquido cristalinas das formulações foi adotado neste trabalho como parâmetro para avaliar a estabilidade das propriedades físicas e estruturais das

formulações. Todas as formulações mantiveram suas características físicas de fase hexagonal durante o período de 60 dias armazenadas nas temperaturas de 25 e 45°C. No entanto, foi observado que a partir do 30º dia na temperatura de 45°C as formulações começaram a apresentar um grau de desorganização, ocorrendo perda em sua estrutura estriada sugestivas de fase hexagonal. A principal hipótese para explicação da alteração da estrutura estriada é devido ao fato de ocorrido perda de pequenas quantidades de água por evaporação durante esse período.

A avaliação da influência do estudo de estabilidade acelerada sobre a atividade antimicrobiana foi adotada a fim de verificar a eficácia das formulações quando submetidas a temperaturas extremas. Foi observado que a formulação com maior concentração de água, F8-M45A15 (15%), apresentou variações significativas no decréscimo dos halos de inibição, principalmente na temperatura de 45°C, enquanto as formulações com menores concentrações de água, F6-M55A05 e F7-M50A10 (5% e 10%) respectivamente, apresentaram melhor atividade antimicrobiana. No entanto, a formulação F6-M55A05 se destacou por ser a mais estável em ambas temperaturas de armazenamento, apresentando pouca variação estatisticamente significativa dos halos de inibição durante os 60 dias.

Com base nestes resultados, à medida que a concentração de água nos sistemas líquido-cristalino aumentava, mais viscosa e conseqüentemente tornavam-se mais organizadas. Em vista disso, a principal hipótese para compreensão da diminuição dos halos de inibição das formulações é que a liberação de substâncias ativas dissolvidas na no interior da matriz poder ser mais lenta, explicando a diferença entre os halos de inibição da formulação, F8-M45A15 (15%) com F6-M55A05 e F7-M50A10 (5% e 10%), respectivamente. As alterações no odor das formulações apontam que a exposição em temperatura de estufa também pode ter contribuído para ocorrer processos de degradação ou perda de constituintes do ORCR, auxiliando na diminuição da atividade das formulações principalmente no 30º e 60º dia.

No entanto, apesar das formulações mais viscosas como F8-M45A15 e as outras formulações excluídas neste estudo por apresentarem resultados menos favoráveis em ação antimicrobiana, não significava que sejam irrelevantes, podendo ter outras aplicações. De acordo com OLIVEIRA *et al.*, (2004) e FORMARIZ *et al.*, (2004), os sistemas líquido cristalinos de liberação mais lenta atuam como um sistema reservatório, podendo promover um efeito prolongado, proporcionando liberação constante e regular numa faixa de tempo mais ampla, reduzindo a frequência de aplicações e minimizando reações adversas.

Outros estudos têm demonstrado a importância de utilizar formulações mais fluidas como a trabalho de BRUSCHI *et al.*, (2008) e CARVALHO *et al.*, (2010) que exploraram este

efeito no desenvolvimento de precursores de fases líquido-cristalina para administração nasal potencial de zidovudina e administração de própolis em bolsas periodontais, respectivamente.

A partir dos dados de atividade antibacteriana, foi verificado que o aumento da concentração da fase aquosa e diminuição da fase oleosa demonstraram modificar as propriedades físico-químicas das formulações, promovendo um aumento na viscosidade, e concomitantemente ocasionando redução da ação antibacteriana.

7 CONCLUSÃO

Portanto, durante a realização deste trabalho foi possível determinar o composto majoritário do óleo-resina de *Copaifera reticulata*, sendo o β -Cariofileno (32,43%), confirmando a hipótese de ser o principal composto relacionado à atividade antimicrobiana desta espécie. O ORCR foi ativo contra bactérias relacionadas a vaginose, apresentando uma CMI entre 1000-500 μ g/mL e com ação bacteriostática. Apenas as formulações contendo concentrações de 50mg/g e 100mg/g de ORCR apresentaram fase líquido-cristalina de fase hexagonal. Todas as formulações apresentaram atividade antibacteriana superior frente as cepas testadas. Além disso, durante o estudo de estabilidade acelerada as formulações mantiveram sua estabilidade durante os 60 dias quando armazenadas sob temperatura de (25°C), porém sob temperaturas extremas (45°C) as formulações tiveram as suas características físicas, organolépticas e atividade terapêutica afetadas. Portanto, todos os resultados advogam a favor da formulação F6-M55A05 contendo 100mg/g de ORCR como potencial candidata ao emprego clínico como um gel fitoterápico tópico do tipo líquido-cristalino para o tratamento de vaginose.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R.P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. Carol Stream, IL: Allured publishing corporation, 2007.

AHMED, A.R.; DASHEVSKY, A.; BODMEIER, R. Drug release from and sterilization of in situ cubic phase forming monoglyceride drug delivery systems. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. n. 75, v. 375-380, 2010.

ALAM, M. M.; SUGIYAMA, Y.; WATANABE, K.; ARAMAKI, K. Phase behavior and rheology of oil-swollen micellar cubic phase and gel emulsions in nonionic surfactant systems. **Journal of Colloid and Interface Science**, n. 341, p. 267–272, 2010.

ALIGIANNIS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINOU, I.B. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 49, n. 9, p. 4168-4170, 2001.

ALTMAN, R.F.A. **A exploração industrial de sementes oleaginosas amazônicas**. Rio de Janeiro: INPA, 1958. 24 p.

AMSALEM, O.; ASERIN, A.; GARTI, N. Phospholipids-embedded fully dilutable liquid nanostructures. Part 2: The role of sodium diclofenac. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 81, p. 422– 429, 2010.

AMSEL, R.; TOTTEN, P. A.; SPIEGEL, C. A.; CHEN, K. C.; ESCHENBACH, D.; HOLMES, K. K. Diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations. **The American journal of medicine**, v. 74, n. 1, p. 14-22, 1983.

ANDREWS, G.P; JONES, D.S. Rheological Characterization of Bioadhesive Binary Polymeric Systems Designed as Platforms for Drug Delivery Implants. **Biomacromolecules**. v. 7, n. 3, p. 899-906, 2006.

ANGEL, D. E.; LLOYD, P.; CARVILLE, K.; SANTAMARIA, N. The clinical efficacy of two semi-quantitative wound-swabbing techniques in identifying the causative organism(s) in infected cutaneous wounds. **International Wound Journal**, v. 8, n. 2, p. 176-185, 2011.

ANTUNES, T. C. Influência da fonte nutricional no crescimento ótimo e na produção de antimicrobianos produzidos por isolados de *Streptomyces* sp. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 11, n. 2, 2013.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Mecanismos de resistência bacteriana aos antimicrobianos**. 2007. Disponível em:
<http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo3/mec_enzimatico.htm > acesso em Julho de 2018.

ARRUDA, C., MEJÍA; J. A. A.; RIBEIRO, V. P.; BORGES, C. H. G.; MARTINS, C. H. G.; VENEZIANI, R. C. S.; AMBRÓSIO, S. R.; BASTOS, J. K. Occurrence, chemical composition, biological activities and analytical methods on *Copaifera* genus—A review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 109, p. 1-20, 2019.

BADKE, M. R.; BUDÓ, M. D. L. D.; ALVIM, N. A. T.; ZANETTI, G. D.; HEISLER, E. V. Saberes e práticas populares de cuidado em saúde com o uso de plantas medicinais. **Texto & contexto enfermagem**, v. 21, n. 2, 2012.

BATES, S. Vaginal discharge. **Curr. Obstet. Gynaecol.** v.13, p.218- 223, 2003.

BATTAGLIA F.; MARIANI L.; ANGLANA F.; MILITE V.; QUATTRINI M.; PLOTTI F.; TOMAO F.; PLOTTI G. Vulvovaginal candidiasis: a therapeutic approach. **Minerva Ginecol**, v.57, p. 131-139, 2005.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American journal of clinical pathology**, v. 45, n. 4, p. 493, 1966.

BERNEGOSSI, J.; CALIXTO, G.; SANCHES, P.; FONTANA, C.; CILLI, E.; GARRIDO, S.; CHORILLI, M. Peptide KSL-W-loaded mucoadhesive liquid crystalline vehicle as an alternative treatment for multispecies oral biofilm. **Molecules**, v. 21, n. 1, p. 37, 2015.

BONIFÁCIO, B. V.; DA SILVA, P. B.; DOS SANTOS RAMOS, M. A.; NEGRI, K. M. S.; BAUAB, T. M.; CHORILLI, M. Nanotechnology-based drug delivery systems and herbal medicines: a review. **International journal of nanomedicine**, v. 9, p. 1, 2014.

BOOCK, K. P.; SANTOS, O.D.H.; TAKEMOTO, S. A.; ROCHA-FILHO, P. A. Desenvolvimento de emulsões com cristais líquidos e ativos hidratantes e estudo da eficácia hidratante “in vivo”. I. **Cosm. & Toilett.**, v.18, n.02, p.49-50, 2006.

BOWLER, P. G.; DUERDEN, B. I.; ARMSTRONG, D. G. Wound microbiology and associated approaches to wound management. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 2, p. 244-269, 2001.

BOYD, B. J.; WHITTAKER, D. V.; KHOO, S – M.; DAVEY, G. Hexosomes formed from glycerate surfactants – Formulation as a colloidal carrier for irinotecan. **Int J Pharm**, v. 318, n.154-162, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução – RE n.º 01, de 29 de julho de 2005. Autoriza, ad referendum, a publicação do **Guia para Realização de Estudos de Estabilidade**. Brasília: Diário Oficial da União, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Farmacopeia Brasileira**. Brasília, 2010.

BROCKLEHURST, P.; HANNAH, M.; MCDONALD, H. Interventions for treating bacterial vaginosis in pregnancy. **The Cochrane database of systematic reviews**, n. 2, p. CD000262-CD000262, 2000.

BROOKS, G. F., BUTEL, J. S., ORNSTON, L. N., JAWETZ, E., ADELBERG, E. A., MELNICK, J. L. **Microbiologia médica**. Porto Alegre: Editora AMGH25, 2012.

BRUSCHI, M. L.; FREITAS, O. Oral bioadhesive drug delivery systems. **Drug Development and Industrial Pharmacy**. v. 31, p. 293-310, 2005.

BRUSCHI, M.L.; FREIRAS, O.; LARA, E.H.; PANZERI, H.; GREMIÃO, M.P.; JONES, D.S. Precursor system of liquid crystalline phase containing propolis microparticles for the treatment of periodontal disease: Development and characterization. **Drug Dev. Ind. Pharm.**, v.34, p.267-278, 2008.

BRINON, L.; GEIGER, S.; VALÉRIE, A.; DOUCET, J.; TRANCHANT, J. P.; COVARRAZE, G. Percutaneous absorption of sunscreens from liquid crystalline phases. **Journal Control Rel**, v. 60, p. 67-76, 1999.

BUHLER F.V.; FERREIRA J.R.N. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de formulações contendo extratos de *Ilex paraguariensis* St. Hil. a 5 e 10%. **Rev Perspect**. V.32, p.47-55, 2008.

CARVALHO, F.C.; SARMENTO, V.H.V.; CHIAVACCI, L.A.; BARBI, M.S.; GREMIÃO, M.P.D. Development and *in vitro* evaluation of surfactant systems for controlled release of zidovudine. **J. Pharm. Sci.**, v.99, p.2367-2374, 2010.

CARVALHO, J. C. T.; CASCON, V.; POSSEBON, L. S.; MORIMOTO, M. S. S.; CARDOSO, L. G. V.; KAPLAN, M. A. C.; GILBERT, B. Topical antiinflammatory and analgesic activities of *Copaifera duckei* Dwyer. **Phytotherapy Research**, v. 19, n. 11, p. 946-950, 2005.

CASCON, V.; GILBERT, B. Characterization of the chemical composition of oleoresins of *Copaifera guianensis* Desf. *Copaifera duckei* Dwyer and *Copaifera multijuga* Hayne. **Phytochemistry**. v.55, n.7, p.773-8, 2000.

CERA, R.F.L. **Estudo da incorporação do diclofenaco sódico com microemulsões lipídicas: Formulação e liberação “in vitro”**. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, 2001.

CHAVAN, M.J.; WAKTE, P.S.; SHINDE, D.B. Analgesic and anti-inflammatory activity of caryophyllene oxide from *Annona squamosa* L. bark. **Phytomedicine**, v.17, n.10, p.149–151, 2010.

CHEN, K. C.; FORSYTH, P. S.; BUCHANAN, T. M.; HOLMES, K. K. Amine content of vaginal fluid from untreated and treated patients with nonspecific vaginitis. **The Journal of clinical investigation**, v. 63, n. 5, p. 828-835, 1979.

CHEN, J.; LI, Y., TIAN, Y.; HUANG, C.; LI, D., ZHONG, Q.; MA, X. Interaction between microbes and host intestinal health: modulation by dietary nutrients and gut-brain-endocrine-immune axis. **Current Protein and Peptide Science**, v. 16, n. 7, p. 592-603, 2015.

CIOCA, G.; CALVO, L. Liquid crystal and cosmetic applications. **Cosm Toilet**, New York, v. 105, n. 5, p. 57-62, 1990.

CLSI-Committee for Clinical Laboratory Standards. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. CLSI, Wayne, USA, 2003.

- COGEN, A. L.; NIZET, V.; GALLO, R. L. Skin microbiota: a source of disease or defence? **The British Journal of Dermatology**, v. 158, n. 3, p. 442-455, 2008.
- CONHEN-AVRAHAMI, M.; LIBSTER, D.; ASERIN, A.; GARTI, N. Penetratin-induced transdermal delivery from HII mesophases of sodium diclofenac. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 159, p. 419– 428, 2012.
- CONSOLARO, M.E.L; MARIA-ENGLER, S.S. **Citologia Clínica Cérvico-vaginal: Texto e Atlas**. São Paulo: Roca, 2012.
- COSTA-BALOGH, F. O.; SPARR, E.; SOUSA, J. J. S.; PAIS, A. C. Drug release from lipid liquid crystalline phases: relation with phase behavior. **Drug development and industrial pharmacy**, v. 36, n. 4, p. 470-481, 2010.
- DAVIES, C. E.; WILSON, M. J.; HILL, K. E.; STEPHENS, P.; HILL, C. M.; HARDING, K. G.; THOMAS, D. W. Use of molecular techniques to study microbial diversity in the skin: chronic wounds reevaluated. **Wound Repair and Regeneration**, v. 9, n. 5, p. 332-340, 2001.
- DEKIO, I.; HAYASHI, H.; SAKAMOTO, M.; KITAHARA M, NISHIKAWA T, SUEMATSU M, BENNO Y. Detection of potentially novel bacterial components of the human skin microbiota using culture-independent molecular profiling. **Journal of Medical Microbiology**, v. 54, n. 12, p. 1231-1238, 2005.
- DEL FIOL, F. D. S.; LOPES, L. C.; TOLEDO, M. I. D.; BARBERATO-FILHO, S. Perfil de prescrições e uso de antibióticos em infecções comunitárias. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 1, p. 68-72, 2010.
- DI SOTTO, A.; MAZZANTI, G.; CARBONE, F.; HRELIA, P.; MAFFEI, F. Inhibition by β -caryophyllene of ethyl methanesulfonate-induced clastogenicity in cultured human lymphocytes. **Mutation Research**, v.699, n.1-2, p.23–28, 2010.
- DUERDEN, B. I. Virulence factors in anaerobes. **Clinical Infectious Diseases**, v. 18, suppl. 4, p. S253-S259, 1994.
- EDWARDS, L. The diagnosis and treatment of infectious vaginitis. **Dermatologic therapy**, v. 17, n. 1, p. 102-110, 2004.
- ESCHENBACH, D. A.; DAVICK, P. R.; WILLIAMS, B. L.; KLEBANOFF, S. J.; YOUNG-SMITH, K.; CRITCHLOW, C. M.; HOLMES, K. K. Prevalence of hydrogen peroxide-producing *Lactobacillus* species in normal women and women with bacterial vaginosis. **Journal of clinical microbiology**, v. 27, n. 2, p. 251-256, 1989.
- FARAGE, M.; MAIBACH, H. Lifetime changes in the vulva and vagina. **Archives of gynecology and obstetrics**, v. 273, n. 4, p. 195-202, 2006.
- FORMARIZ, T. P.; WANCZINSKI, B.J.; SILVA JR, A. A.; SCARPA, M. V.; OLIVEIRA, A.G. Biotecnologia de sistemas coloidais aplicados na otimização do efeito terapêutico de fármacos usados no tratamento de câncer. **Infarma**, v.16, n.1-2, 2004.

FORMARIZ, T. P.; URBAN, M. C. C.; A. A. SILVA-JUNIOR; GREMIÃO, M. D.; OLIVEIRA, A. G. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistema de liberação de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, p. 301- 313, 2005.

GAO, Z.; TSENG, C. H.; PEI, Z.; BLASER, M. J. Molecular analysis of human forearm superficial skin bacterial biota. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 8, p. 2927-2932, 2007.

GARTI, N.; HOSHEN, G.; ASERIN, A. Lipolysis and structure controlled drug release from reversed hexagonal mesophase. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 94, p. 36– 43, 2012.

GHELARDINI, C.; GALEOTTI, N.; MANNELLI, L.D.C.; MAZZANTI, G.; BARTOLINI, A. Local anaesthetic activity of β -caryophyllene. **Il Farmaco**, v.56, n.3, p.387–389, 2001.

GIESBRECHT, P. C. P. **Efeitos da pomada de óleo de copaíba em queimadura cutânea em rato**. Dissertação de Mestrado. Vila Velha: Universidade de Vila Velha, 2011.

GODHA, K.; TUCKER, K. M.; BIEHL, C.; ARCHER, D. F.; MIRKIN, S. Human vaginal pH and microbiota: an update. **Gynecological Endocrinology**, v. 34, n. 6, p. 451-455, 2018.

GOULD, I. M.; BAL, A. M. New antibiotic agents in the pipeline and how they can overcome microbial resistance. **Virulence**, v. 4, n. 2, p. 185-191, 2013.

GRICE, E. A.; SEGRE, J. A. The skin microbiome. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 9, n. 4, p. 244-253, 2011.

HAMOUDA, T.; BAKER JR, J. R. Antimicrobial mechanism of action of surfactant lipid preparations in enteric Gram-negative bacilli. **Journal of applied microbiology**, v. 89, n. 3, p. 397-403, 2000.

HARTMAN, L.; LAGO, R. C. A. Rapid preparation of fatty acid methyl from lipids. **Laboratory Practice**, London, v. 22, n. 3, p. 475-473, 1973.

HASENCLEVER, L.; PARANHOS, J.; COSTA, C. R.; CUNHA, G.; VIEIRA, D. A indústria de fitoterápicos brasileira: desafios e oportunidades. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 22, p. 2559-2569, 2017.

HAY, P. Recurrent bacterial vaginosis. **Current opinion in infectious diseases**, v. 22, n. 1, p. 506, 2009.

HEGGERS, P. Defining infection in chronic wounds: methodology. **Journal of Wound Care**, v. 7, n. 9, p. 452-456, 1998.

HEGMANN, T.; HAO, Q. I.; MARX, V. M. Nanoparticles in liquid crystals: synthesis, self-assembly, defect formation and potential applications. **Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials**, v. 17, n. 3, p. 483-508, 2007.

HERRERO-JÁUREGUI, C.; CASADO, M. A; ZOGHBI, M. B. G.; SILVA, R. C. M. Chemical variability of *Copaifera reticulata* Ducke oleoresin. **Chemistry & biodiversity**, v. 8, n. 4, p. 674-685, 2011.

HUANG, M.; SANCHEZ-MOREIRAS, A. M.; ABEL, C.; SOHRABI, R.; LEE, S.; GERSHENZON, J.; THOLL, D. The major volatile organic compound emitted from *Arabidopsis thaliana* flowers, the sesquiterpene (E)- β -caryophyllene, is a defense against a bacterial pathogen. **New Phytologist**, v. 193, n. 4, p. 997-1008, 2012.

HUGO, W. B.; RUSSEL, A. D. **Pharmaceutical microbiology**. 3.ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, p.167, 1983.

IWATSUKI, K.; YAMASAKI, O.; MORIZANE, S.; OONO, T. Staphylococcal cutaneous infections: invasion, evasion and aggression. **Journal of Dermatological Science**, v. 42, n. 3, p. 203-214, 2006.

JOHN, G.; VEMULA, P. K. Design and development of soft nanomaterials from biobased amphiphiles. **Soft Matter**, v. 2, n. 11, p. 909-914, 2006.

JOHN, G.; JUNG, J. H.; MASUDA, M.; SHIMIZU, T. Unsaturation effect on gelation behavior of aryl glycolipids. **Langmuir**, v. 20, n. 6, p. 2060-2065, 2004.

KINGSLEY, A. The wound infection continuum and its application to clinical practice. **Ostomy/Wound Management**, v. 49, n. 7, p. 1-7, 2003.

KLEBANOFF, M. A.; HILLIER, S. L.; NUGENT, R. P.; MACPHERSON, C. A.; HAUTH, J. C.; CAREY, J. C.; LEVENO, K. J. Is bacterial vaginosis a stronger risk factor for preterm birth when it is diagnosed earlier in gestation?. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 192, n. 2, p. 470-477, 2005.

KLEIN, K. Liquid Crystals and Emulsions: a wonderful marriage. **Cosm. & Toilet.**, New York, v.117, n.5, p.30-34, 2002.

KOFONOW, J. M.; ADAPPA, N. D. Nithin D. In vitro antimicrobial activity of SinuSurf™. **ORL**, v. 74, n. 4, p. 179-184, 2012.

KULKARNI, C. V.; WACHTER, W.; IGLESIAS-SALTO, G.; ENGELSKIRCHEN, S.; AHUALLI, S. Monoolein: a magic lipid?. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 13, n. 8, p. 3004-3021, 2011.

LEGAULT, J.; PICHETTE, A. Potentiating effect of β -caryophyllene on anticancer activity of α -humulene, isocaryophyllene and paclitaxel. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.59, n.12, p.1643–1647, 2007.

LIBSTER, D.; ASERIN, A.; GARTI, N. Interactions of biomacromolecules with reverse hexagonal liquid crystals: Drug delivery and crystallization applications. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 356, p. 375– 386, 2011.

LAMEIRA, O. A.; MARTINS-DA-SILVA, R. C.; ZOGHBI, M. D. G. B.; OLIVEIRA, E. C. P. Seasonal variation in the volatiles of *Copaifera duckei* Dwyer growing wild in the state of Pará—Brazil. **Journal of Essential Oil Research**, v. 21, n. 2, p. 105-107, 2009.

LAMONT, R. F.; SOBEL, J. D.; AKINS, R. A.; HASSAN, S. S.; CHAIWORAPONGSA, T., KUSANOVIC, J. P.; ROMERO, R. The vaginal microbiome: new information about genital tract flora using molecular based techniques. **BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology**, v. 118, n. 5, p. 533-549, 2011.

LOWY, F. D. *Staphylococcus aureus* infections. **The New England Journal of Medicine**, v. 339, n. 8, p. 520-532, 1998.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA, J. V.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MANDELL, G. L.; BENNET, J. E.; DOLIN, R. Principles and practices of infectious diseases. **Philadelphia, PA: Saunders**, v. 2858, 2015.

MARTINS DA SILVA, R.C.V; PEREIRA, J.F.; LIMA, H.C. O gênero *Copaifera* (Leguminosae—Caesalpinioideae) na Amazônia Brasileira. **Rodriguésia**, p. 455-476, 2008.

MASSON, D. S.; SALVADOR, S. L.; POLIZELLO, A. C. M.; FRADE, M. A. C. Atividade antimicrobiana do óleo-resina de copaíba (*Copaifera langsdorffii*) em bactérias de significância clínica em úlceras cutâneas. **Rev Bras Pl Med**, v. 15, p. 664-9, 2013.

MEYERS, B.; SCHOEMAN, J. P.; GODDARD, A.; PICARD J. The bacteriology and antimicrobial susceptibility of infected and non- infected dog bite wounds: fifty cases. **Veterinary Microbiology**, v. 127, n. 3-4, p. 360-368, 2008.

MILLER, E. A.; BEASLEY, D. E.; DUNN, R. R.; ARCHIE, E. A. *Lactobacilli* dominance and vaginal pH: why is the human vaginal microbiome unique?. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 1936, 2016.

MIRANDA, I. P. A.; RABELO, A.; BUENO, C. R.; BARBOSA, E. M.; RIBEIRO, M. N. S. **Frutos de palmeiras da Amazônia**. Manaus: INPA, 2001. p.118.

MONTES, L. V.; BROSEGHINI, L. P.; ANDREATTA, F. S.; SANT'ANNA, M. E. S.; NEVES, V. M.; SILVA, A. G. Evidências para o uso da óleo-resina de copaíba na cicatrização de ferida – uma revisão sistemática. **CEP**, v. 29, p. 770, 2009.

MORAIS, J. M.; SANTOS, O. D. H.; DELICATO, T.; GONÇALVES, R. A.; ROCHAFILHO, P. A. Physicochemical characterization of Canola oil/water nano-emulsion obtained by HLB number and Emulsion Phase Inversion Methods. **J. Disp. Sci. Tech.**, New York, v.27, p. 109-115, 2006.

MOURO, S.; VILELA, C. L.; NIZA, M. M. Clinical and bacteriological assessment of dog-to-dog bite wounds. **Veterinary Microbiology**, v. 144, n. 1-2, p. 127-132, 2010.

MÜLLER-GOYMANN, C. Physicochemical characterization of colloidal drug delivery systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and nanoparticles for topical administration. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, n. 2, p. 343-356, 2004.

NASCIMENTO, C. S.; NASCIMENTO, C. S.; ALVES, A. P. LEME. de A. Índices de acidez e de iodo na fração lipídica de *Astrocaryum murumuru* (murumuru). **Ciência e Tecnologia**, Jaboticabal, v. 1, 2010.

NUNES, K. M. **Desenvolvimento de sistemas precursores de fase cristalina para administração intrabolsa periodontal**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2012.

OH, J.; BYRD, A. L.; DEMING, C.; CONLAN, S.; KONG, H. H.; SEGRE, J. A. Biogeography and individuality shape function in the human skin metagenome. **Nature International Journal of Science**, v. 514, p. 59-64, 2014.

OLIVEIRA, A. G.; SCARPA, M. V.; CORREA, M. A.; CERA, L. F. R.; FORMARIZ, T. P. Microemulsões: estrutura e aplicação como sistema de liberação de fármacos. **Quím. Nova**, v. 27, n.1. p. 131-138, 2004.

OLIVEIRA, E. C. P.; LAMEIRA, O. A.; ZOGHBI, M. G. B. Identificação da época de coleta do óleo de copaíba (*Copaifera* sp.) no município de Moju-PA. **Revista Brasileira de Plantas medicinais**. v.8, n.3, p.14-23, 2006.

OLIVEIRA, A. B.; FRANÇA, C. A. D. S.; SANTOS, T. B. D.; GARCIA, M. A. F.; TSUTSUMI, M. Y.; BRITO JÚNIOR, L. C. D. Prevalência de *Gardnerella* e *Mobiluncus* em exames de colpocitologia em Tome-Açu, Pará. **Revista Paraense de Medicina**, v. 21, n. 4, p. 47-51, 2007.

ONZI, P. S.; HOFFMAN, S. P.; CAMARGO, A. L. Avaliação do consumo de antimicrobianos injetáveis de um hospital privado no ano de 2009. **Rev. Bras. Farm. Hosp. Serv. Saúde**, São Paulo, v. 2, n. 2, p. 20-25, 2011.

PAIVA, L. A. F.; GURGEL, L. A.; DE SOUSA, E. T.; SILVEIRA, E. R.; SILVA, R. M.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. N. Protective effect of *Copaifera langsdorffii* oleo-resin against acetic acid-induced colitis in rats. **Journal of ethnopharmacology**, v. 93, n. 1, p. 51-56, 2004.

PATEL, D. A.; GILLESPIE, B.; SOBEL, J. D.; LEAMAN, D.; NYIRJESY, P.; WEITZ, M. V.; FOXMAN, B. Risk factors for recurrent vulvovaginal candidiasis in women receiving maintenance antifungal therapy: results of a prospective cohort study. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 190, n. 3, p. 644-653, 2004.

PEREIRA, S.; BEZERRA, V.; FERREIRA, L.; LUCIEN, V.; CARIM, M.; GUEDES, M. Avaliações físico-químicas do fruto do urumuruzeiro (*Astrocaryum murumuru* Mart.). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PLANTAS OLEAGINOSAS, ÓLEOS, GORDURAS E BIODIESEL, 3., 2006, Varginha. **Artigos...** Lavras: UFLA, 2006. p. 576-580.

PEREIRA, N. C. M.; MARISCAL, A. G.; DE CARVALHO NEPOCENO, K. L. P.; SILVA, V. C. C. R.; FERNANDES, H. M.; VIVI, V. K. Atividade antimicrobiana do óleo/resina de copaíba natural/comercial contra cepas padrão. **Journal health npeps**, v. 3, n. 2, p. 527-539, 2018.

PERFEITO, J. P. S. **O registro sanitário de medicamentos fitoterápicos no Brasil: uma avaliação da situação atual e das razões de indeferimento.** Dissertação de mestrado. Universidade de Brasília, 2012.

PERIOLI, L.; AMBROGI, V.; RUBINI, D.; GIOVAGNOLI, S.; RICCI, M.; BLASI, P.; ROSSI, C. Novel mucoadhesive buccal formulation containing metronidazole for the treatment of periodontal disease. **Journal of Controlled Release**, v. 95, n. 3, p. 521-533, 2004.

PESCE, C. **Oleaginosas da Amazônia**, 2 ed., Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi, Núcleo de Estudos Agrários e Desenvolvimento Rural, 2009. 63 p.

PHELPS, J.; BENTLEY, M. V. L.; LOPES, L. B. In situ gelling hexagonal phases for sustained release of an anti-addiction drug. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 87, n. 2, p. 391-398, 2011.

PINTO A. C.; BRAGA W. F.; REZENDE C. M.; GARRIDO F. M. S.; VEIGA JÚNIOR V. F.; BERGTER L.; PATITUCCI M. L.; ANTUNES O. A. C. 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, n. 4, p. 355-360, 2000.

PINTO, A. C.; WITT, L. N. M.; SÁ, M. M. D.; VIANA, S. L. R. Atividade antimicrobiana “*in vitro*” de extrato alcóolico de própolis. **Ciência Rural**, v. 34, n. 1, p. 159-163, 2004.

QUEIROZ, J. A. L. de; BEZERRA, V. S.; MOCHIUTTI, S. A palmeira murumuru (*Astrocaryum murumuru* Mart.) no estuário do rio Amazonas no Estado do Amapá. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PLANTAS OLEAGINOSAS, ÓLEOS, GORDURAS E BIODIESEL, 5.; CLÍNICA TECNOLÓGICA EM BIODIESEL, 2., 2008, Lavras. Biodiesel: tecnologia limpa: **Anais completos**. Lavras: UFLA, 2008.

QUEIROZ, J. A. L. de; MACHADO, S. do A.; HOSOKAWA, R. T.; SILVA, I. C. da. Estrutura e dinâmica de floresta de várzea no estuário amazônico no Estado do Amapá. **Floresta**, Curitiba, v. 37, n. 3, p. 339-352, set./dez. 2007.

RAMOS, M. F. D. S. **Desenvolvimento de microcápsulas contendo a fração volátil de copaíba por'spray-drying: estudo de estabilidade e avaliação farmacológica.** Tese de doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. USP, 2006.

REID, G. Probiotic agents to protect the urogenital tract against infection. **The American journal of clinical nutrition**, v. 73, n. 2, p. 437s-443s, 2001.

REIS, J.; COSTA, L. C.; ROXA, T., WEIS, V. Avaliação da germinação de copaíba (*Copaifera longsdorffii*) em diferentes tipos de substrato. Disponível em:<<http://www.catolicato.edu.br/portal/portal/downloads/docsgestaoambiental/projetos2010-1/3>> Acesso em 05 dez. 2017.

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

- RODILLA, J.M.; TINOCO, M.T.; MORAIS, J.C.; GIMENEZ, C.; CABRERA, R.; MARTÍN-BENITO, D.; CASTILLO, L.; GONZALEZ-COLOMA, A. *Laurus novocanariensis* essential oil: Seasonal variation and valorization. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.36, n.3, p.167–176, 2008.
- SAAD, B.; AZAIZEH, H.; ABU-HIJLEH, G.; SAID, O. Safety of traditional Arab herbal medicine. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 3, n. 4, p. 433-439, 2006.
- SABULAL, B.; DAN, M.; JOHN J, A.; KURUP, R.; PRADEEP, N.S.; VALSAMMA, R.K.; GEORGE, V. Caryophyllene-rich rhizome oil of *Zingiber nimmonii* from South India: Chemical characterization and antimicrobial activity. **Phytochemistry**, v.67, n.22, p. 2469-2473, 2006.
- SACHETTI, C. G.; FASCINELI, M. L.; SAMPAIO, J. A.; LAMEIRA, O. A.; CALDAS, E. D. Avaliação da toxicidade aguda e potencial neurotóxico do óleo-resina de copaíba (*Copaifera reticulata* Ducke, Fabaceae). **Revista brasileira de farmacognosia**, João Pessoa, v. 19, n. 4, p. 937-941, 2009.
- SAGALOWICZ, L.; MEZZENGA, R.; LESER, M. E. Investigating reversed liquid crystalline mesophases. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 11, n. 4, p. 224-229, 2006.
- SALMAZI R.; CALIXTO G.; BERNEGOSI J.; RAMOS M. A.; BAUAB T. M.; CHORILLI M. A curcumin-loaded liquid crystal precursor mucoadhesive system for the treatment of vaginal candidiasis. **Int J Nanomedicine**. 2015; 10:4815–4824.
- SALYERS, A. A.; GUPTA, A.; WANG, Y. Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes. **Trends in Microbiology**, v. 12, n. 9, p. 412- 416, 2004.
- SANT'ANNA, B. M.; FONTES, S. P.; PINTO, A. C.; REZENDE, C. M. Characterization of woody odorant contributors in copaiba oil (*Copaifera multijuga* Hayne). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 5, p. 984-989, 2007.
- SANTOS, O. D. H.; MIOTTO, J. V.; OLIVEIRA, W. P.; ROCHA FILHO P. A. Attainment of emulsions with liquid crystals from marigold oil using the required HLB method. **J. Disp. Sci. Tech.**, v.26, n.2, p.243-9, 2005.
- SANTOS, O. D. H.; BOOCK, K. P.; CAMARGO, M. F. P.; ROCHA-FILHO, P. A. Estudo da alteração da fase cristalina durante o processo de evaporação em emulsões contendo diferentes fases oleosas In: XX Congresso Brasileiro de Cosmetologia, 2006, São Paulo/SP. **Cosm. & Toilet.**, v.18, n.02, p.50, 2006.
- SANTOS, A.O.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B.P.; VEIGA, V.F., JR.; PINTO, A.C.; NAKAMURA, C.V. Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.103, n.3, p.277–281, 2008.
- SCHOTT, H. Kinetics of swelling of polymers and their gels. **J. Pharm. Sci.** v. 81, p. 467–470, 1992.

SCHULTZ, G. S.; SIBBALD, R. G.; FALANGA, V.; AYELLO, E. A.; DOWSETT, C.; HARDING, K.; ROMANELLI, M.; STACEY, M. C.; TEOT, L.; VANSCHIEDT, W. Wound bed preparation: a systematic approach to wound management. **Wound Repair and Regeneration**, v. 11, suppl.1, p. S1-S28, 2003.

SHANLEY, P.; MEDINA, G. **Frutíferas e plantas úteis na vida amazônica**. Cifor, p.85-94, 2005.

SILVA, S. P. **Frutas no Brasil**. São Paulo: Empresa das Artes, 1996. p.233.

SILVA, C. H. P. M.; NEUFELD, P. M. **Bacteriologia e micologia para o laboratório clínico**. Rio de Janeiro: Editora Revinter, 2006.

SILVA, C. V. D.; REIS, A. L.; FERRER, S. R.; GUERREIRO, H.; BARROS, T. F.; VELOZO, E. D. S. Avaliação da atividade antimicrobiana de duas espécies de *Rutaceae* do Nordeste Brasileiro. **Braz J Pharmacogn.**, v.20, p.355-60, 2010.

SILVA, E. P. de O.; CASTRO, L. H.; BIAGGIO, R. M.; BELTRANE JÚNIOR, M. Estudo das características físico-químicas e classificação de fito-ingredientes na espécie *Astrocaryum murumuru* (murumuru). In: ENCONTRO LATINO AMERICANO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 12.; São José dos Campos. Biodiversidade: conservação, preservação e recuperação. **Anais.**, 8., 2010.

SIMÕES-BARBOSA, A.; FEIJÓ, G. C.; SILVA, J. X. D.; LEAL, I. I. R.; BARBOSA, T. W. P. A six-year follow-up survey of sexually transmitted diseases in Brasília, the capital of Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 6, n. 3, p. 110-117, 2002.

SOBEL, J. D. Vaginitis. **New England Journal of Medicine**. v. 337, n. 26, p. 1896-1903, 1997.

SORUM, H.; SUNDE, M. Resistance to antibiotics in the normal flora of animals. **Veterinary Research**, v. 32, n. 3-4, p. 227-241, 2001.

SPELLBERG, B.; GILBERT, D. N. The future of antibiotics and resistance: a tribute to a career of leadership by John Bartlett. **Clinical Infectious Diseases**, v. 59, suppl. 2, p. 71-75, 2014.

SRINIVASAN S.; HOFFMAN N.G.; MORGAN M.T.; MATSEN F.A.; FIEDLER T.L.; HALL R.W.; ROSS F.J.; MCCOY C.O.; BUMGARNER R.; MARRAZZO J.M.; FREDRICKS D.N. Bacterial communities in women with bacterial vaginosis: high resolution phylogenetic analyses reveal relationships of microbiota to clinical criteria. **PloS one**, v. 7, n. 6, p. e37818, 2012.

TANAKA, V.A.; FAGUNDE, L.J.; CATAPAN, A.; GOTLIEB, S.L.D.; JUNIOR, W.B.; ARNONE, M. Perfil epidemiológico de mulheres com vaginose bacteriana, atendidas em um ambulatório de doenças sexualmente transmissíveis, em São Paulo. **An Bras Dermatol**, v. 82, n. 1, p. 41-6, 2007.

TAUFNER, C. F.; FERRAÇO, E. B.; RIBEIRO, L. F. Uso de plantas medicinais como alternativa fitoterápica nas unidades de saúde pública de Santa Teresa e Marilândia Natureza On Line, v.4, p.30-39, 2006.

TOGASHI, N.; INOUE, Y.; HAMASHIMA, H.; TAKANO, A. Effects of two terpene alcohols on the antibacterial activity and the mode of action of farnesol against *Staphylococcus aureus*. *Molecules*, v. 13, n. 12, p. 3069-3076, 2008.

TYLE, P. Liquid crystal and their applications in drug delivery. In: ROSOFF, M. (ed.) *Controlled release of drugs: polymers and aggregate systems*, VCH, New York, cp.4, p. 125-162, 1989.

URZÚA, A.; REZENDE, M.; MASCAYANO, C.; VÁSQUEZ, L. A structure-activity study of antibacterial diterpenoids. *Molecules*, v. 13, n. 4, p. 882-891, 2008.

URUMOVA, V.; CHAPRAZOV, T. S.; LYUTSKANOV, M.; BORISOV, I. Microbiological analyses of canine infected wounds. *Revue de Médecine Vétérinaire*, v. 163, n. 4, p. 201-205, 2012.

VAN DER LUBBEN, I. M.; KONINGS, F. A. J.; BORCHARD, G.; VERHOEF, J. C.; JUNGINGER, H. E. *In vivo* uptake of chitosan microparticles by murine Peyer's patches: visualization studies using confocal laser scanning microscopy and immunohistochemistry. *Journal of drug targeting*, v. 9, n. 1, p. 39-47, 2001.

VÁSQUEZ, A.; JAKOBSSON, T.; AHRNÉ, S.; FORSUM, U.; MOLIN, G. Vaginal *Lactobacillus* flora of healthy Swedish women. *Journal of clinical microbiology*, v. 40, n. 8, p. 2746-2749, 2002.

VEIGA JÚNIOR, V. F.; PATITUCCI, MARIA LUCIA; PINTO, Angelo C. Controle de autenticidade de óleos de copaíba comerciais por cromatografia gasosa de alta resolução. *Química Nova*, v. 20, n. 6, p. 612-615, 1997.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, ANGELO C.; MACIEL, MARIA APARECIDA M. Plantas medicinais: cura segura. *Química nova*, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

VEIGA JUNIOR, V. F.; ROSAS, E. C.; CARVALHO, M. V. D.; HENRIQUES, M. G. M. O.; PINTO, A. C. Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne—A comparative study. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 112, n. 2, p. 248-254, 2007.

VENTOLA, C. L. The Antibiotic Resistance Crisis: Part 1: Causes and Threats. *Pharmacy and Therapeutics*, v. 40, n. 4, p. 277-283, 2015.

VISCARDI, G.; QUAGLIOTTO, P.; BAROLO, C.; SAVARINO, P.; BARNI, E.; FISICARO, E. Synthesis and surface and antimicrobial properties of novel cationic surfactants. *The Journal of organic chemistry*, v. 65, n. 24, p. 8197-8203, 2000.

WANKE, I.; STEFFEN, H.; CHRIST, C.; KRISMER, B.; GOTZ, F.; PESCHEL, A.; SCHALLER, M.; SCHITTEK, B. Skin commensals amplify the innate immune response to

pathogens by activation of distinct signaling pathways. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 131, n. 2, p. 382-390, 2011.

WEBSTER, D.; TASCHEREAU, P.; BELLAND, R.J.; SAND, C.; RENNIE, R.P. Antifungal activity of medicinal plant extracts; preliminary screening studies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 115, n. 1, p. 140-146, 2008.

WEESE, J. S. Antimicrobial resistance in companion animals. **Animal Health Research Reviews**, v. 9, n. 2, p. 169-176, 2008.

WORKOWSKI, K. A. Centers for Disease Control and Prevention sexually transmitted diseases treatment guidelines. **Clinical Infectious Diseases**, v. 61, n. suppl_8, p. S759-S762, 2015.

WU, T.; XIE, A. G.; TAN, S. Z.; CAI, X. Antimicrobial effects of quaternary phosphonium salt intercalated clay minerals on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 86, n. 1, p. 232-236, 2011.

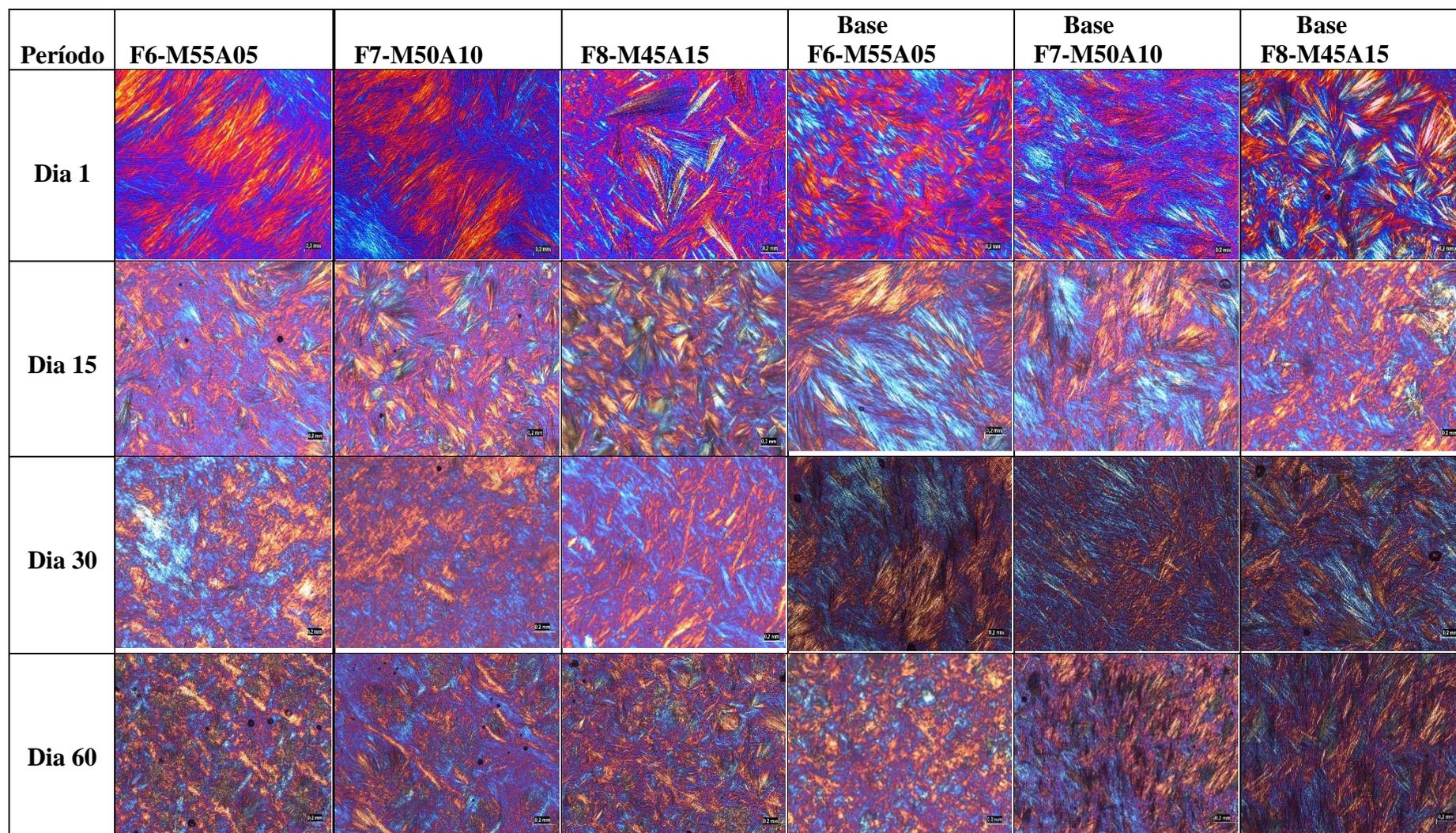
YAMAGUCHI, N.; SATOH-YAMAGUCHI, K.; ONO, M. In vitro evaluation of antibacterial, anticollagenase, and antioxidant activities of hop components (*Humulus lupulus*) addressing acne vulgaris. **Phytomedicine**, v. 16, n. 4, p. 369-376, 2009.

YARIV, D.; EFRAT, R.; LIBSTER, D.; ASERIN, A.; GARTI, N. “*in vitro*” permeation of diclofenac salts from lyotropic liquid crystalline systems. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 78, p. 185-192, 2010.

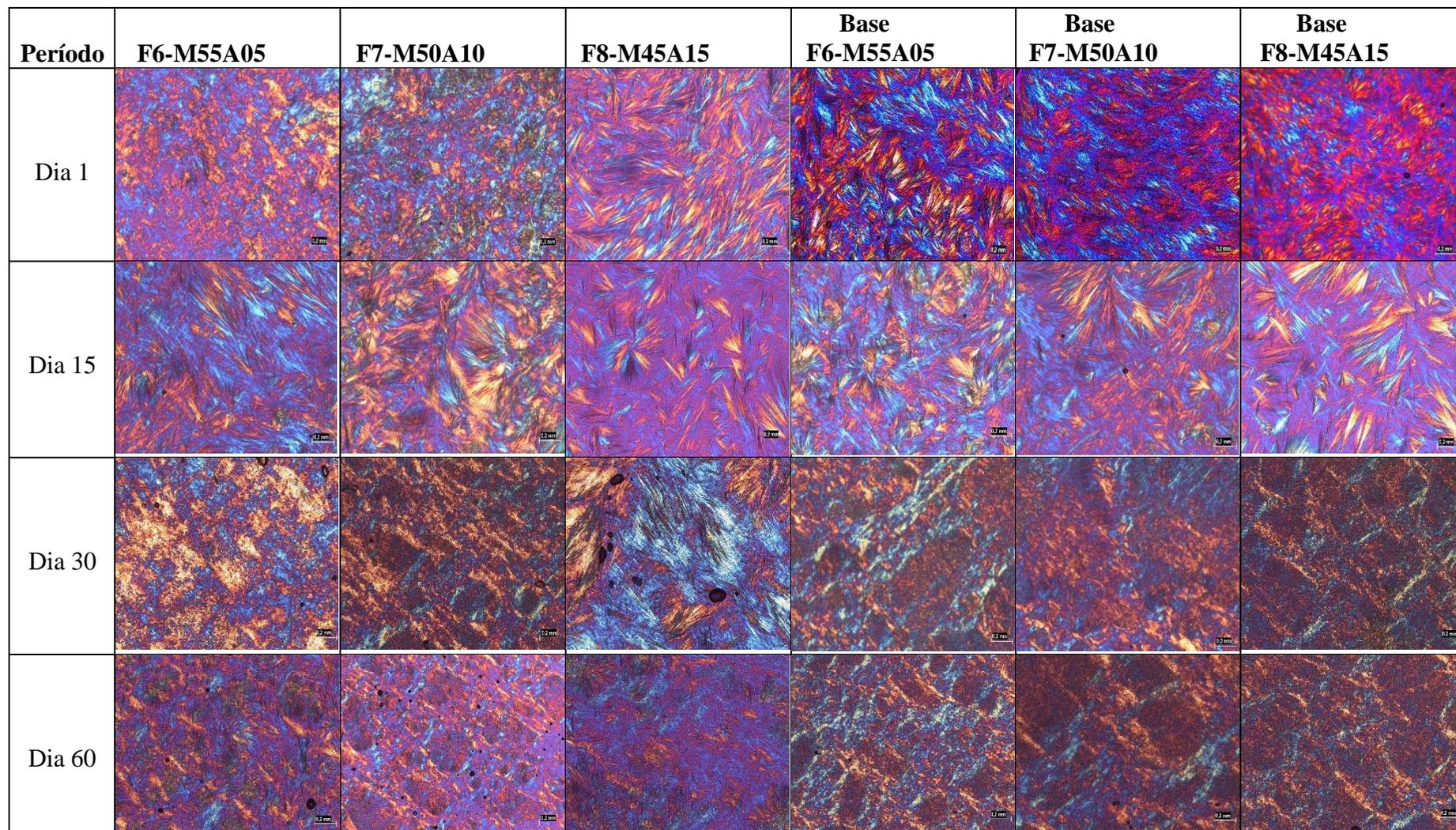
ZIECH, R. E.; FARIAS, L. D.; BALZAN, C.; ZIECH, M. F.; HEINZMANN, B. M.; LAMEIRA, O. A.; DE VARGAS, A. C. Atividade antimicrobiana do oleoresina de copaíba (*Copaifera reticulata*) frente a *Staphylococcus coagulase* positiva isolados de casos de otite em cães. **Pesq. Vet. Bras.** v.33, n.7, p. 909-913, 2013.

APÊNDICE A- Avaliação da influência do estudo de estabilidade acelerada sobre possíveis alterações físicas nas estruturas líquido-cristalinas

Formulações F6-M55A05, F7-M50A10 e F8-M45A15 com 100mg/g de ORCR e suas bases (Sem ORCR) observadas ao microscópio de luz polarizada em cada período teste de estabilidade acelerada sob temperatura ambiente (25°C).



Formulações F6-M55A05, F7-M50A10 e F8-M45A15 com 100mg/g de ORCR e suas bases (Sem ORCR) observadas ao microscópio de luz polarizada em cada período teste de estabilidade acelerada sob temperatura ambiente (45°C).



ANEXO A- Patente das formulações testadas



República Federativa do Brasil
Ministério da Indústria, Comércio Exterior
e Serviços
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102015030888-4 A2

(22) Data do Depósito: 10/12/2015

(43) Data da Publicação: 13/06/2017



(54) Título: SISTEMAS LÍQUIDOS CRISTALINOS BASEADOS EM GORDURA VEGETAL DE MURUMURU (ASTROCARYUM MURUMURU MART.) PARA LIBERAÇÃO SUSTENTADA DE FÁRMACOS EM PELE E CAVIDADES REVESTIDAS POR MUCOSA.

(51) Int. Cl.: A61K 36/889; A61K 31/20; A61K 31/201; A61K 9/107

(73) Titular(es): UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ

(72) Inventor(es): KARIANE MENDES NUNES; JOSÉ OTÁVIO CARRÉRA SILVA JÚNIOR; RENATA CRISTINA KIATKOSKI KAMINSKI; SILVIA KATRINE SILVA ESCHER; JUNIOR AVELINO DE ARAÚJO

(57) Resumo: SISTEMAS LÍQUIDOS CRISTALINOS BASEADOS EM GORDURA VEGETAL DE MURUMURU (ASTROCARYUM MURUMURU MART.) PARA LIBERAÇÃO SUSTENTADA DE FÁRMACOS EM PELE E CAVIDADES REVESTIDAS POR MUCOSA. A presente invenção descreve a composição de um novo sistema líquido cristalino para a liberação sustentada de substâncias ativas de caráter hidrofílico e/ou lipofílico na pele e em cavidades revestidas por mucosas, caracterizado por conter como ingrediente majoritário a gordura vegetal de Murumuru (Astrocaryum murumuru Mart.). As formas farmacêuticas semissólidas convencionais como cremes, pomadas, géis e loções são propensas à rápida erosão e desestruturação física devido ao constante fluxo de fluidos no local de aplicação promovendo baixa biodisponibilidade da substância ativa com consequente ineficácia terapêutica. Os novos sistemas de liberação modificada, a exemplos dos cristais líquidos, podem aumentar biodisponibilidade das substâncias ativas, devido suas propriedades físicas apropriadas corroborando com a redução de efeitos adversos e frequência de uso de medicamentos. Em vista(...)