

UFRRJ

INSTITUTO DE BIOLOGIA

**PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

DISSERTAÇÃO

**ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E ANTI-
INFLAMATÓRIA DA ÓLEO-RESINA DA *COPAIFERA*
GLYCYCARPA (DUCKE)**

Marissa Figueiredo Carvalho

2012



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DA
ÓLEO-RESINA DA *COPAIFERA GLYCYCARPA* (DUCKE)

Marissa Figueiredo Carvalho

Sob orientação do Professor

Wellington da Silva Côrtes

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas, no Curso de Pós-Graduação do Programa Multicêntrico, Área de concentração em Farmacologia

Seropédica, RJ

Agosto de 2012

665.3
C331a

T

Carvalho, Marissa Figueiredo, 1981-

Atividade antinociceptiva e anti-inflamatória da óleo-resina da *Copaifera Glycyarpa* (Ducke) / Marissa Figueiredo Carvalho - 2012.

86 f. : il.

Orientador: Wellington da Silva Côrtes.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas.

Bibliografia: f. 72-86.

1. Óleos vegetais - Teses. 2. Agentes antiinflamatórios - Teses. 3. Terpenos - Teses. 4. Diterpenos - Teses. I. Côrtes, Wellington da Silva, 1964-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS

MARISSA FIGUEIREDO CARVALHO .

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas, curso multicêntrico de pós-graduação em ciências fisiológicas.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 20/08/2012



Prof. Dr. Wellington da Silva Côrtes - UFRRJ
(Orientador)



Prof. Dr. Maria Elipé Matheus - UFRJ



Prof. Dr. Bruno Guimarães Marinho - UFRRJ

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha família, meu pai Luiz Fernando de França Carvalho, minha mãe Maria Christina Figueiredo Carvalho, irmão e amigo Marcio Figueiredo Carvalho e orientador Wellington da Silva Côrtes, pelo incentivo à busca constante do saber, e pela compreensão em vários momentos durante o andamento deste curso e a todos do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFRRJ com quem tive o grande prazer e privilégio de trabalhar durante este período.

RESUMO

A *copaifera glycyarpa* (Fabaceae-Caesapinioideaea), popularmente conhecida como copaíba cuiarana tem seu óleo utilizado por populações indígenas da região do Xingu para amenizar inflamações e infecções principalmente de pele e garganta. A atividade farmacológica do óleo Bruto (OR) de algumas espécies do gênero *copaifera* já demonstraram ter atividades anti-inflamatória, antinociceptiva, gastroprotetora, antimicrobiana entre outras, bem como foram isolados sesquiterpenos como cariofilenos e humulenos e diterpenos como copaenos, ácidos caurenóicos e poliáticos com atividade anti-inflamatória e gastroprotetora. Considerando estes indicativos, este trabalho objetivou avaliar o potencial antinociceptivo e anti-inflamatório da óleo-resina (OR) extraído do tronco de árvores de *C.glycyarpa* e de seus isolados ácido caurenóico e ácido poliáltico em modelos farmacológicos *in vivo*, administrados por via oral em camundongos machos adultos pesando entre 25-35g. Na avaliação antinociceptiva pelo teste das contorções abdominais, a OR (10-1000mg/kg) reduziu de maneira dose dependente as contorções ($DI_{50\%}=145,24\text{mg/kg}$). A OR reduziu ambas fases no teste da formalina, a dor neurogênica em 42,30% e a dor de origem inflamatória 69,01% sendo mais eficiente na segunda fase na menor dose em 33,70%. Ainda no teste da formalina, a OR 300mg/kg reduziu o tempo de reatividade dos animais em ambas fases sendo mais eficiente na segunda fase 84,78%, sendo este efeito parcialmente revertido pela naloxona. No teste da retirada de cauda utilizado um agonista opióide e OR 30-1000mg/kg *v.o*), apenas a dose mais alta de 1g/kg (8.100 ± 0.5489) aumentou o tempo de retirada da cauda significativamente frente ao estímulo em relação aos seus controles veículo (5.300 ± 0.3697) e fentanil (17.80 ± 2.023) no mesmo tempo de avaliação no entanto não tanto quanto a droga de referência. A OR 300mg/kg mostrou ter efeito antinociceptivo aumentando o tempo de retirada da cauda e quando administrada aos grupo pré tratado com PCPA (100mg/Kg *i.p*), reverteu o efeito hiperalgésico. Na avaliação anti-inflamatória, o pré-tratamento com doses crescentes da OR (10-1000mg/kg) inibiu de forma dose-dependente e significativamente a formação do edema de orelha induzida por óleo de Croton em 79,95% sendo a $DI_{50\%}$ de 321,34mg/kg, sendo esta atividade antiedematogênica mais um efeito que evidencia uma propriedade anti-inflamatória desta OR. No teste da pleurisia, o pré-tratamento com a OR (1000mg/kg, ácido caurenóico 10mg/Kg e ácido polialtico 20mg/kg, *v.o*), foi capaz de reduzir o número de leucócitos migrados para a cavidade pleural em 59,80%; 49,13% e 54,34% respectivamente enquanto a dexametasona inibiu 66,64% em relação aos controles, reforçando com estes resultados, as propriedades anti-inflamatórias da OR e esta inibição pode ser pelo menos em parte atribuída a atividade destes dois ácidos diterpenos contidos na OR. Avaliando a ação da OR sobre a atividade motora e Sistema Nervoso Central foi observado que a OR 300mg/kg teve efeito similar ao da droga de referência diazepam diminuindo a distância percorrida, o tempo de grooming e rearing e aumentando o tempo na zona central e de imobilidade no teste do campo aberto caracterizando um possível mecanismo anselítico e sedativo. Além disso, no teste da suspensão pela cauda nos animais pré-tratados com P-clorofenilalanina (PCPA 100mg/kg, *i.p*), Inibidor da enzima triptofano hidroxilases, o tempo de imobilidade foi significativamente maior que nos grupos controles e quando receberam tratamento com a OR o tempo de imobilidade dos animais retornaram ao nível dos controles mostrando uma possível atividade antidepressiva dessa mistura.

Palavras-chaves : *Copaifera glycyarpa* , antinociceptivo, anti-inflamatório, diterpenos

ABSTRACT

The *Copaifera glycyarpa* (Fabaceae-Caesapinioideaea), popularly known as copaiba cuiarana has its oil used by indigenous peoples in the Xingu region to ease inflammation and infection mainly of skin and throat. The pharmacological activity of Crude Oil (OR) of some species of the genus *Copaifera* activities were shown to have an anti-inflammatory, antinociceptive, gastroprotective, and other antimicrobial and were isolated as cariofilenos and sesquiterpenes and diterpenes as humulenos copaenos, acids and caurenóicos poliáticos with anti-inflammatory activity and gastroprotective. Considering these indicators, this study aimed to evaluate the potential antinociceptive and anti-inflammatory oleoresin (OR) extracted from the trunk of trees and their isolated *C.glycyarpa*, kaurenoic acid and acid poliáltico in pharmacological models *in vivo*, orally administered in adult male mice weighing 25-35g. In the evaluation of the test antinociceptive, OR (10-1000mg/Kg) decreased in a dose dependent manner the writhings ($ID_{50} = 145.24 \text{ mg / kg}$). The OR decreased both phases in the formalin test, neurogenic pain in 42.30% and pain of inflammatory origin and 69.01% was more efficient in the second phase at the lowest dose at 33.70%. Even in the formalin test, the OR300mg/Kg reduced the reactivity of animals in both phases being more efficient in the second stage 84.78%, the effect being partially reversed by naloxone. In the tail flick test used an opioid agonist and OR30-1000mg/Kg *v.o*), only the highest dose of 1g/kg (8100 ± 0.5489) increased the time of withdrawal of the tail significantly the stimulus in relation to their vehicle controls (5300 ± 0.3697) and fentanyl (17.80 ± 2023) at the time of evaluation, however not as much as the reference drug. The OR 300mg/kg was shown to have antinociceptive effect by increasing the time to remove the tail and when administered to group pre-treated with p-clorophenilalanina (PCPA100mg/kg ip), reversed the hyperalgesic effect. In assessing anti-inflammatory, pretreatment with increasing doses of OR (10-1000mg/Kg) inhibited dose-dependently and significantly the formation of ear edema induced by croton oil in 79.95%, ID_{50} calculated 321,34mg/kg, and this activity antiedematogenic shows one more anti-inflammatory property of this OR. In pleurisy test, the pre-treatment with OR (1000mg/Kg acid, and acid kaurenoic 10mg/Kg poliáltico 20mg/kg, *vo*), was able to reduce the number of leukocytes migrate into the pleural cavity at 59.80%, 49.13% and 54.34% respectively, while dexamethasone inhibited 66.64% compared to controls, thereby enhancing these results, anti-inflammatory properties of OR and this inhibition can be at least partly attributed to the activity of these two acids diterpene contained in the OR. Evaluating the action of OR on motor activity and CNS was observed that the OR 300mg/kg had an effect similar to the reference drug diazepam reducing the distance traveled, time of grooming and rearing and

increased time in the central and immobility in open-field test a possible mechanism featuring anesthetic and sedative. In addition, the tail suspension test animals pretreated with PCPA, immobility time was significantly higher than in control groups and when received treatment with OR the immobility time of the animal returned to the level of controls showing a possible antidepressant activity of this mixture.

Keywords: *Copaifera glycyarpa*, antinociceptive, anti-inflammatory diterpenes

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. *Transmissão e processamento da dor.* Adaptado de <http://www.fisiosaude-ce.blogspot.com> acesso em 24/07/2012 20:23. p. 5

Figura 2. *Mecanismos moduladores da via nociceptiva.* (5-HT, 5-hidroxitriptamina ; NA, noradrenalina ; BK, bradicinina ; PGs, Prostaglandinas ; NGF, Fator de crescimento do nervo; SP, Substância P ; CGRP, Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina ; GABA, ácido gama-aminobutírico; NSAIDs, Fármacos antiinflamatórios não-esteroidais; NO, óxido nítrico. Extraído de Farmacologia (RANG, 2007 p.642). p. 8

Figura 3. *Cascata de alterações bioquímicas e celulares no processo inflamatório agudo.* Extraído de: Stefan Silbernagl and Florian Lang Fisiopatologia Texto e Atlas.p.49, 2006. p. 10

Figura 4. *Formação dos principais mediadores pró-inflamatórios através da conversão dos fosfolípidos de membrana em ácido araquidônico (AA), pelas ações das enzimas fosfolipase A₂ , ciclo-oxigenase (COX) e lipo-oxigenase (LOX) .* Extraída da fonte <http://www.misodor.com/QUEIMADURAS.html> acesso em 09/05/2012 14:47. p. 12

Figura 5. *Principais mediadores inflamatórios responsáveis pela dor e hiperalgesia* Extraída da fonte <http://www.dol.inf.br/Html/DorInflamatoria/DorInflamatoria-Titulo2.html> Acesso em 20/03/2012 17:03. p. 15

Figura 6. *Copaifera langsdorffii* (ITF – Índice terapêutico Fitoterápico p.29).p. 18

Figura 7. Foto ilustrando a forma de extração da óleo-resina do tronco de *Copaifera* (PIERI *et. al.*, 2009).p. 21

Figura 8. Distribuição geográfica de *C.glycyarpa* no Território Amazônico . p. 26

Figura 9. Detalhes da folha, folíolo, tricomas, brácteas, bractéolas e gineceu de *C.glycyarpa* g-l. *C.glycyarpa* – g.folha; h.detalhe do folíolo evidenciando venação congesta; i.detalhe do folíolo evidenciando tricomas na face abaxial da lâmina; j.bractéola; k.bráctea; l.gineceu - *Rodriguesia* 59(3) 455-476, 2008. p. 27

Figura 10. Camundongos (*Mus musculus*), linhagem SW55 (SwissWebster). Extraído de : acervo pessoal. p. 30

Figura 11. *Exsicata* de *C.glycyarpa*, espécie original depositada no herbário do Jardim Botânico do Rio de Janeiro. p. 31

Figura 12. Ilustração da estrutura química dos 2 diterpenos isolados da óleo-esina de *C.glycyarpa* 1. ácido caurenóico; 2. ácido poliáltico . Extraído de Souza *et.al.* 2010. p. 32

Figura 13. Efeitos da OR da *C. glycyarpa* sobre o número de contorções abdominais induzidas pó ácido acético acumuladas em 30 minutos. As barras verticais representam as médias \pm E.P.M. Os valores * $p<0,05$; ** $p<0,01$ e *** $p<0,001$ representam os níveis de significância estatística quando comparados os grupos indometacina e seus respectivos controles salina e tween 1% (ANOVA One-Way, com pós- teste de tukey). Os valores # $p<0,05$ e ### $p<0,001$ representam o nível de significância estatística quando a comparação foi feita entre as doses. p. 38

Figura 14. Curva dose-resposta para o efeito antinociceptivo da OR de *C.glycyarpa* em difeentes concentrações (10-1000mg/kg). O efeito está representado como % de inibição das contorções abdominais *versus* dose da OR em relação a média do grupo veículo tween 1%. Os valores estão expressos como média E.P.M.. curva em vermelho (---) representa a curva experimental enquanto que curva em azul (---) representa a curva teórica utilizada

para determinação da DI_{50} cujo valor determinado experimentalmente foi de 145,24mg/kg.
p. 39

Figura 15. *Efeito de diferentes doses da OR da C.glyycarpa sobre o tempo de reatividade (segundos) dos animais na 1 fase do teste da formalina.* Os valores *** $p < 0,001$ representam os níveis de significância estatística quando comparados os grupos indometacina e seus respectivos controles salina e tween 1% (ANOVA One-Way, com pós-teste de tukey). p. 40

Figura 16. *Tempo de reatividade (segundos) dos animais na segunda fase do teste da formalina.* As colunas e barras verticais representam as médias o erro padrão em grupos experimentais de 6 animais. *** $p < 0,001$; * $P < 0,05$; # $p < 0,01$. p. 42

Figura 17. *Curva dose resposta determinação da DI_{50} através da % de inibição versus log dose da óleo-resina da segunda fase no teste da formalina (n=6).* A DI_{50} determinada graficamente possui o valor de 260,01 mg/kg. p. 42

Figura 18. *Tempo de reatividade (segundos) dos animais na Fase 1 do método da formalina.* As colunas e barras verticais representam as médias \pm e.p.m. (n=6). O símbolo exprime o nível de significância estatística entre os grupos teste, sem pré-tratamento, em comparação com os seus controles *** $P < 0,001$ e o símbolo ### $P < 0,001$ exprime o nível de significância estatística entre os grupos pré-tratados precedidos ou não com naloxona. p. 44

Figura 19. *Tempo de reatividade (segundos) dos animais na Fase 2 do método da formalina.* As colunas e barras verticais representam as médias \pm E.P.M.. mbolo *** $P < 0,001$ exprime o nível de significância estatística entre os grupos OR e fentanil e seus respectivos controles negativos, tween 1 % e salina. Os símbolos # $P < 0,05$ e ### $P < 0,001$ exprimem os níveis de significância entre os grupos tratados e não tratados com naloxona antes do pré-tratamento (n=6/grupo). p. 45

Figura 20. *Influência do tratamento com OR (10-1000mg/Kg) sobre o tempo de retirada da cauda no teste de retirada da cauda* As barras verticais representam as médias E.P.M..

O valor de *** $p < 0,001$ representa o nível de significância estatística quando da comparação entre os grupos fentanil e OR e seus respectivos controles. p. 47

Figura 21. Avaliação da influência da via serotoninérgica no mecanismo antinociceptivo da OR na dose de 300mg/Kg v.o e fentanil 0,3mg/Kg (agonista opióide) quando foram camundongos pré-tratados com PCPA 100mg/Kg i.p por 3 dias consecutivos) no teste da retirada de cauda . O valor de *** $p < 0,001$ representa o nível de significância estatística quando da comparação entre os grupos fentanil e OR e seus respectivos controles. p. 49

Figura 22. Avaliação da formação do edema induzido por óleo de cróton 2,5% após tratamento com diferentes doses da óleo-resina. As barras verticais representam as médias \pm E.P.M. Os valores * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ representam os níveis de significância estatística quando comparados os grupos indometacina e seus respectivos controles salina e tween 1% (ANOVA One-Way, com pós- teste de tukey). Os valores # $p < 0,05$ e ### $p < 0,001$ representam o nível de significância estatística quando a comparação foi feita entre as doses. p. 50

Figura 23. Curva dose-resposta para o efeito anti-inflamatório da OR de *C.glycyarpa* em difeentes concentrações (10-1000mg/kg). O efeito está representado como % de inibição do edema versus dose da OR em relação a média do grupo veículo tween 1%. Os valores estão expressos como média E.P.M.. curva em vermelho (---) representa a curva experimental enquanto que curva em preto) representa a curva teórica utilizada para determinação da DI_{50} cujo valor determinado experimentalmente foi de 321,32 mg/kg. p. 51

Figura 24. Avaliação da migração leucocitária através da contagem de leucócitos totais no teste da pleurisia induzida por carragenina. As colunas e barras representam as médias e o E.P.M. dos grupos experimentais (n=6). Os asteriscos exprimem os valores de significância esatística dos grupos experimentais quando comparados aos seus controles negativos (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$). p. 52

Figura 25. Influência do pré-tratamento com OR 300mg/KG no número de bolos fecais no teste do campo aberto. As barras verticais representam as médias e E.P.M. e *** $p < 0,001$ representa o nível de significância estatística entre os grupos diazepam e OR e seus

respectivos controles negativos Salina e tween 1% (ANOVA-One-Way, com teste de Tukey) (n=6). p. 54

Figura 26. *Influência do pré-tratamento com OR 300mg/kg na distância total percorrida no teste do campo aberto.* As barras verticais representam as médias e E.P.M. e *** $p < 0,001$ representa o nível de significância estatística entre os grupos diazepam e OR e seus respectivos controles negativos Salina e tween 1% (ANOVA-One-Way, com teste de Tukey) (n=6). p. 55

Figura 27. *Influência do pré-tratamento com OR 300mg/kg no tempo total de permanência na zona central no teste do campo aberto.* As barras verticais representam as médias e E.P.M. e os valores de * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ representa o nível de significância estatística entre os grupos diazepam e OR e seus respectivos controles negativos Salina e tween 1% (ANOVA-One-Way, com teste de Tukey) (n=6). p. 55

Figura 28. *Influência do pré-tratamento com OR 300mg/kg no tempo de imobilidade no teste do campo aberto.* As barras verticais representam as médias e E.P.M. e * $p < 0,05$ representa o nível de significância estatística entre os grupos diazepam e OR e seus respectivos controles negativos Salina e tween 1% (ANOVA-One-Way, com teste de Tukey) (n=6). p. 56

Figura 29. *Influência do pré-tratamento com OR 300mg/kg no tempo total de rearing (apoiar-se nas paredes da caixa) no teste do campo aberto.* As barras verticais representam as médias e E.P.M. e *** $p < 0,001$ representa o nível de significância estatística entre os grupos diazepam e OR e seus respectivos controles negativos Salina e tween 1% (ANOVA-One-Way, com teste de Tukey) (n=6). p. 56

Figura 30. *Influência do pré-tratamento com OR 300mg/kg no tempo total de grooming (limpeza) no teste do campo aberto.* As barras verticais representam as médias e E.P.M. e os valores de ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,001$ representam o nível de significância estatística entre os grupos diazepam e OR e seus respectivos controles negativos Salina e tween 1% (ANOVA-One-Way, com teste de Tukey) (n=6). p. 57

Figura 31. Efeito da OR 300 mg/kg v.o após pré-tratamento com PCPA 100mg/kg i.p por 3 dias consecutivos no tempo de imobilidade no teste da suspensão pela cauda. As barras verticais representam as médias e E.P.M. e *** $p < 0,001$ representa o nível de significância estatística entre os grupos diazepam e OR e seus respectivos controles negativos Salina e tween 1% (ANOVA-One-Way, com teste de Tukey) (n=6). p. 58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista de plantas medicinais de interesse do SUS, p.20

Tabela 2. Composição Química da óleo-resina de *C. glycyarpa* (Ducke) por GC-MS (Gas Chromatography-Mass Spect (adaptado de Souza, *et. al.*, 2010). p. 28

Tabela 3. Influência do pré-tratamento com a OR nas doses de 10-1000 mg/kg sobre o número de contorções no teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético. Os valores * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ representam os níveis de significância estatística quando comparados os grupos indometacina e seus respectivos controles salina e tween 1%. p. 38

Tabela 4. Influência do pré-tratamento com a OR nas doses 100 -1000 mg/kg sobre o tempo de reatividade (segundos) dos animais, na primeira fase do teste da formalina. Os valores *** $p < 0,001$ representam os níveis de significância estatística quando comparados os grupos indometacina e OR com seus respectivos controles salina e tween 1%. p. 40

Tabela 5. Influência do pré-tratamento com a OR nas doses 100-1000 mg/kg sobre o tempo de reatividade (segundos) dos animais na segunda fase do teste da formalina. Os valores *** $p < 0,001$ representam os níveis de significância estatística quando comparados os grupos indometacina e seus respectivos controles salina e tween 1%. p. 41

Tabela 6. Influência do pré-tratamento com a OR na dose de 300mg/kg sobre o sistema opióide no tempo de reatividade (segundos) dos animais na primeira fase do teste da

formalina utilizando fentanil (agonista opióide 0,3mg/kg *s.c*) e reversão pela naloxona (antagonista opióide 1mg/kg *i.p*). O valor de *** $p<0,001$ representa o nível de significância estatística quando da comparação entre os grupos fentanil e OR e seus respectivos controles. p. 43

Tabela 7. *Influência do pré-tratamento com a OR na dose de 300mg/kg sobre o sistema opióide no tempo de reatividade (segundos) dos animais na segunda fase do teste da formalina utilizando fentanil (agonista opióide 0,3mg/kg *s.c*) e reversão pela naloxona (antagonista opióide 1mg/kg *i.p*). O valor de *** $p<0,001$ representa o nível de significância estatística quando da comparação entre os grupos fentanil e OR e seus respectivos controles. p. 44*

Tabela 8. *Influência do pré-tratamento com OR (30-1000mg/kg) o tempo de retirada da cauda no teste de retirada da cauda (hiperalgesia térmica) O valor de *** $p<0,001$ representa o nível de significância estatística quando da comparação entre os grupos fentanil e OR e seus respectivos controles. p. 46*

Tabela 9. *Influência do pré-tratamento com OR (30-1000mg/kg) o tempo de retirada da cauda no teste de retirada da cauda (hiperalgesia térmica) e influência do PCPA sobre o efeito hiperalgésico. O valor de *** $p<0,001$ representa o nível de significância estatística quando da comparação entre os grupos fentanil e OR e seus respectivos controles. p. 48*

Tabela 10. *Influência do pré-tratamento com OR nas doses 10-1000 mg/Kg (p.o) na formação do edema após aplicação tópica de óleo de cróton 2,5% na orelha de camundongos (n=6). Os valores * $p<0,05$; ** $p<0,01$ e *** $p<0,001$ representam os níveis de significância estatística quando comparados os grupos indometacina e seus respectivos controles salina e tween 1%. p. 50*

Tabela 11. *Influência do pré-tratamento com OR 300mg/Kg sobre a contagem total de leucócitos no teste da pleurisia induzida por carragenina . Os valores de 8 $p<0,05$; ** $p<0,01$ e *** $p<0,001$ representam o nível de significância estatística quando da comparação entre os grupos dexametasona e OR e seus respectivos controles. p. 52*

Tabela 12. *Influência do pré-tratamento com OR 300mg/Kg sobre o sistema nervoso central central no teste do campo aberto.* Os valores de $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ representam o nível de significância estatística entre os grupos diazepam e OR e seus respectivos controles negativos salina e tween 1%. p. 54

Tabela 13. *Resumo de algumas espécies do gênero Copaifera e contribuição farmacológica.* p. 70

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

°C : Graus Celsius

Δ : Variação

μL : Microlitro

μg : Micrograma

5-HT : 5-hidroxitriptamina (serotonina)

AA : Ácido Aracdônico

Ag : Antígeno

AMPC : Monofosfato de adenosina cíclico

A β : A beta

A δ : A delta

BK : Bradicinina

CCC : Cromatografia de contra-corrente

Cg : Carragenina

CGRP: Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina

CO₂ : Gás carbônico

COX : Cicloxigenase

COX-1 : Cicloxigenase-1

COX-2 : Cicloxigenase-2

DNA : Ácido desoxiribonucléico

E.P.M : Erro padrão da média

g : grama

h : hora

H₂O : Água

i.p : Intraperitonal

IASP : International Association for Study of Pain

CI₅₀ : Concentração Inibitória 50%

DI₅₀ : Dose Inibitória 50%

IFN : Interferon

IL : Interleucina

iNOS : Óxido nítrico sintase induzida

Ik β : Inibidor do Fator nuclear de transcrição da cadeia leve kappa de células ativadas

kg : kilograma

LC : *Locus Coeruleus*

LOX : Lipoxigenase

LPS : Lipopolissacarídeo Bacteriano

m/s : metros por segundo

mg : miligrama

min : minutos

mL : mililitro

mm : milímetro.

mm² : milímetro quadrado

NaCl : Cloreto de sódio

NFκβ : Fator nuclear de transcrição da cadeia leve kappa de células ativadas

NMR : Núcleo magno da rafe

NO : Óxido Nítrico

NOS : Enzima óxido nítrico sintase

PCPA : para-clorofenilalanina metilester

OR : Óleo-resina de *Copaifera glycyarpa*

p.o : Via oral

PGE₂ : Prostaglandina E₂

PGI : Prostaciclina

pH : Potencial de hidrogênio

PLA₂ : Fosfolipase A₂

SAL : Solução de NaCl 0,9%

SP : Substância P

TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa

TPA : 12-*O*-tetradecanoilforbol-13-acetato

TXA₂ : Tromboxano A₂

TXB₂ : Tromboxano B₂

U.I : Unidade internacional

U.V : Ultravioleta

v/v : Volume por volume

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 Sensibilidade Dolorosa	2
2.2 Inflamação	9
2.3 O gênero <i>Copaifera</i> e propriedades farmacológicas	18
2.4 A <i>Copaifera glycyarpa</i> Ducke (1930)	25
3. OBJETIVOS	28
3.1 Objetivo Geral	28
3.2 Objetivos Específicos	29
4. MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1. Animais	29
4.2 Material Botânico	30
4.3 Obtenção dos isolados	31
4.4 Fármacos, reagentes e Solventes	32
4.5 Métodos para Investigação de Atividade Antinociceptiva Periférica	33
4.5.1 Contorções Abdominais Induzidas por Ácido Acético 1,2%	33
4.5.2 Dor Induzida pela Formalina 2,5%	33
4.5.3 Teste da Retirada de Cauda	34
4.6 Métodos para Investigação de Atividade Anti-inflamatória	35
4.6.1 Edema de Orelha Induzido por Óleo de Cróton	35

4.6.2 Pleurisia Induzida por Carragenina 1%	35
4.7 Atividade Motora e Sobre o Sistema Nervoso Central	36
4.7.1 Teste do Campo Aberto	36
4.7.2 Teste da suspensão pela cauda	37
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	37
6. RESULTADOS	37
6.1 Métodos para Investigação de Atividade Antinociceptiva Periférica	37
6.1.1 Contorções abdominais induzida por ácido acético 1,2%	37
6.1.2 Dor Induzida pela Formalina 2,5%	39
6.1.3 Teste da Retirada da Cauda	45
6.2 Métodos para Investigação de Atividade Anti-inflamatória	49
6.2.1 Edema de Orelha Induzido por Óleo de Cróton	49
6.2.2 Pleurisia Induzida por Carragenina 1%	51
6.3 Atividade Motora e sobre o Sistema Nervoso Central	53
6.3.1 Campo Aberto	53
6.3.2 Teste da suspensão pela cauda	57
7. DISCUSSÕES	59
8. CONCLUSÕES	71
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

1. INTRODUÇÃO

Apesar do progresso nos estudos botânicos, fitoquímicos, farmacológicos de plantas é incontestável a importância dos conhecimentos populares de comunidades tradicionais isoladas que com base em observações durante milhares de anos da interação do comportamento animal com espécies vegetais com poderes curativos, forneceu à pesquisadores ao longo da história da farmacologia e da medicina o isolamento de compostos para síntese de substâncias ativas. Assim, foram descobertos produtos como a morfina, a reserpina, a digoxina, a atropina e inúmeros compostos que modificaram a história médica, alicerces da medicina moderna. No Brasil, onde parte da população de menor poder aquisitivo não possui acesso aos medicamentos oficiais, as plantas medicinais são muitas vezes a única alternativa terapêutica na cura e prevenção de doenças.

Na região amazônica devido a sua maior incidência ao longo do território brasileiro, as Copaibeiras (*Copaifera* spp.) pertencente a família das Leguminosas (Fabaceae) sub-família Caesalpinioideae representam um gênero dos mais amplamente utilizados sendo uma delas a *Copaifera glycyarpa* conhecida como “copaíba cuiarana” ou “copaíba branca”. Dentre as diversas espécies de *copaiferas* e utilizações medicinais de uso freqüente nesta região, a óleo-resina (OR) extraída diretamente do tronco de árvores do gênero, utilizada com fins medicinais a mais de 500 anos, destacam-se aquelas relacionadas a atividade anti-inflamatória e por isso, de fundamental importância para o entendimento deste processo o qual propõe-se a sua histórica utilização.

O processo que inicia-se após lesão tecidual com síntese e liberação de substâncias induzem a inflamação, formação de edema, vasodilatação e migração de células que fazem parte da resposta inflamatória e do processo de recuperação. Entretanto, estes mediadores também ativam e/ou sensibilizam os nociceptores e recrutam outros para exacerbar o sinal de dor. Tais mediadores químicos incluem aminoácidos excitatórios, óxido nítrico (NO), bradicinina, prostaglandinas (PG's), histamina, substância P e fator de crescimento neural (NGF). Também ocorre sensibilização dos nociceptores periféricos por início de uma cascata de eventos que muda as condutâncias iônicas da terminação das fibras sensoriais periféricas.

Nos estudos farmacológicos vários modelos são utilizados na investigação de atividades como a analgésica e a anti-inflamatória, avaliando sinais característicos do

processo inflamatório, tais como: a evolução do edema, permeabilidade capilar, migração celular, níveis de citocinas pró- e anti-inflamatórias, atividade de enzimas envolvidas e também o envolvimento deste processo na gênese da dor.

Portanto, utilizando métodos farmacológicos *in vivo*, o presente estudo tem como objetivos investigar as atividades antinociceptiva e anti-inflamatória da óleo-resina extraída de *Copaifera glycyarpa*, visando esclarecer os possíveis mecanismos de ação envolvidos com essas atividades, além disso, contribuir com a avaliação farmacológica de uma espécie vegetal não estudada.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Sensibilidade Dolorosa

A dor é definida como uma experiência emocional desagradável relacionada com lesão tecidual real ou potencial, apresentando dois componentes: nocicepção e percepção. A nocicepção resulta na ativação das sensações nociceptivas de determinadas subpopulações de neurônios primários sensoriais que transmitem à informação nociceptiva a medula espinhal de onde são retransmitidos para níveis supra espinhal e a percepção que é uma função integradora modulada pelas sensações emocionais e motivacionais. (MILLAN 1999; JULIUS & BASBAUM 2001). Pela sua natureza subjetiva, a sensibilidade dolorosa torna a investigação experimental complexa assim como a abordagem clínica (AIRES, 2008).

De forma simplificada, a condução do impulso doloroso, pode ser considerada como uma cadeia de três - neurônios, com o neurônio de primeira ordem originado na periferia e projetando-se para a medula espinhal, o neurônio de segunda ordem ascende pela medula espinhal e o neurônio de terceira ordem projetando-se para o córtex cerebral (MESSLINGER *et.al.*, 1997).

De acordo com a *International Association for the Study of Pain* (IASP), quanto ao aspecto sensorial, a dor pode ser dividida em quatro modalidades principais: dor

nociceptiva, dor inflamatória, dor neuropática e dor funcional (WOOLF, 2004). A dor nociceptiva resulta da ativação direta de nociceptores por estímulos mecânicos, térmicos e químicos supralimbiares e tem importante papel adaptativo, conferindo proteção aos organismos que a apresentam. A dor inflamatória está associada à lesão tecidual e conseqüente produção de mediadores inflamatórios que ativam ou sensibilizam os nociceptores. Na maioria das vezes, essas alterações fenotípicas dos nociceptores contribuem para o desenvolvimento de um comportamento de esquiva e, assim, facilitam a recuperação do tecido lesado. A dor neuropática é uma modalidade caracterizada por dor espontânea e intensa sem funções protetoras ou reparadoras aparentes e que resulta de lesões do sistema nervoso periférico ou central. A última modalidade, dor funcional, representa um conceito em evolução e não está associada a qualquer anormalidade periférica ou disfunção neurológica aparente (COSTA, 2004).

O aspecto da dor mais freqüentemente avaliado nos modelos experimentais é o sensorial e, portanto, usa-se o termo nocicepção ou resposta nociceptiva para se referir à habilidade para detectar e reagir a estímulos nocivos. Outros termos amplamente usados em estudos clínicos e experimentais para se referir à sensibilização dos nociceptores durante o processo inflamatório são hiperalgesia e alodínia (COSTA, 2004). De acordo com a IASP, hiperalgesia é uma resposta aumentada a um estímulo que normalmente é doloroso, enquanto alodínia é a dor induzida por um estímulo que normalmente não provoca dor. Uma adaptação dessas definições para os modelos experimentais permitiria afirmar que a hiperalgesia representa uma resposta nociceptiva aumentada a estímulos originalmente nocivos, enquanto a alodínia é caracterizada pela resposta nociceptiva induzida por estímulos originalmente inócuos.

De uma forma geral, a resposta nociceptiva se inicia com a ativação de um grupo especial de neurônios sensoriais por estímulos nocivos térmicos, mecânicos ou químicos. Esses neurônios, também chamados nociceptores, conduzem informações para centros localizados na medula espinhal ou no cérebro. Os corpos celulares desses neurônios estão localizados nos gânglios da raiz dorsal (GRD), nodosos ou trigeminais, dependendo da parte do corpo que inervam. Os nociceptores diferem de outros grupos de neurônios sensoriais, principalmente, em relação ao limiar para ativação. Em situações normais, nas

quais não há processo inflamatório associado, os nociceptores apresentam limiar de ativação bem mais elevado do que aquele dos demais neurônios sensoriais. Durante o processo inflamatório pode ocorrer diminuição do limiar para ativação dos nociceptores e o desenvolvimento de alodínia ou hiperalgesia (WOOLF, 2004; COSTA, 2004).

Os nociceptores polimodais quando estimulados geram potenciais de ação que são conduzidos por fibras A- δ e fibras C, as fibras C (**Figura 1**) não mielinizadas possuem terminações nas lâminas I, II, VI e X do corno dorsal, enquanto as fibras mielinizadas A- δ possuem terminações nas lâminas de Rexed I, II, III, IV e V do corno dorsal (MILLAN *et. al.*, 1999) (**Figura 1**). As fibras A β são fibras de diâmetro grande (maior que 10 μm), mielinizadas e de condução rápida, responsáveis por sensações inócuas, tais como tato, vibração e pressão (KLAUMAN *et. al.*, 2008).

O trato espino-talâmico lateral é a principal via que medeia a sensibilidade dolorosa e térmica e envolve uma cadeia de três neurônios. O neurônio de 1ª ordem penetra a medula onde realiza sinapse com o neurônio de 2ª ordem. Os neurônios de 2ª ordem cruzam o plano mediano pela comissura branca, ganham o funículo lateral do lado oposto e ascendem até o tálamo. Do tálamo, os neurônios de 3ª ordem (Núcleo ventral pósterolateral=VPL) partem para o córtex somestésico primário situado no giro póscentral e se dirigem para a área secundária Lóbulo Parietal Superior. Através desta via sensações térmicas e nociceptivas são trazidas dos membros e do tronco do lado oposto, sendo que esta via medeia a sensação de dor rápida e bem localizada (somatotopia) (AIRES, 2008) (**Figura 1**).

O trato espino-retículo-talâmico possui mais neurônios na cadeia, sendo que os neurônios periféricos penetram a medula do mesmo modo que a via anterior. Os neurônios de 2ª ordem estão localizados na coluna posterior da medula e seus axônios cruzam o plano mediano, ganham o funículo lateral do lado oposto, e projetam-se para vários pontos da formação reticular (neurônios de 3ª ordem), onde ocorrem várias sinapses antes dos neurônios reticulares projetarem-se para os núcleos intra laminares do tálamo. Os neurônios de 2ª ordem também sobem pelo funículo lateral do mesmo lado. Do tálamo, os neurônios

projetam-se para várias regiões corticais, sendo que a sensação dolorosa mediada por esta via se torna consciente já ao nível do tálamo. Esta via ao contrário da anterior, não estabelece somatotopia e a sensibilidade dolorosa mediada é a difusa e crônica (AIRES, 2008) (**Figura 1**).

Esses sinais periféricos levam a informação as fibras aferentes secundárias que ascendem e estimulam áreas como tálamo e córtex sensorial, bem como a formação reticular, sistema límbico e hipocampo, as quais estão relacionadas com a experiência de memória, cognição e emoção, que contribuem para a percepção global da dor (MILLAN *et.al.*, 1999) (**Figura 1**).

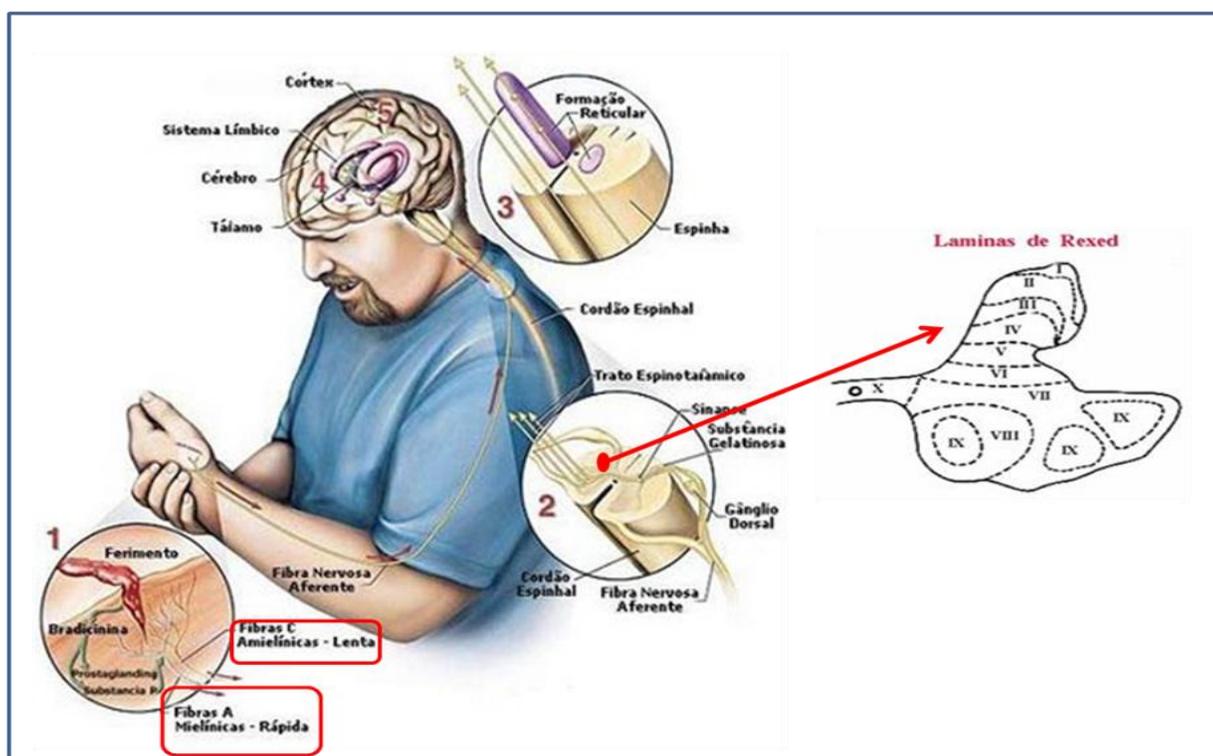


Figura 1. Transmissão e processamento da dor. Adaptado de <http://www.fisiosaude-ce.blogspot.com> acesso em 24/07/2012 20:23

Diversos neurotransmissores, aminoácidos e neuropeptídios são liberados pelos terminais dos aferentes primários no corno dorsal da medula, onde exercem importante papel na modulação da transmissão nociceptiva. Entre tais substâncias destacam-se os aminoácidos excitatórios glutamato e aspartato e diversos outros neurotransmissores e

neuropeptídios, incluindo as taquicininas como substância P (SP), neurocinina A (NKA) e neurocinina B (NKB); e outros mediadores como peptídio relacionado ao gene da calcitonina (Calcitonin Gene-Related Peptide- CGRP), colecistocinina (CCK), somatostatina, óxido nítrico e prostaglandinas, (CARVALHO & LEMÔNICA, 1998).

A informação nociceptiva do neurônio aferente primário é transferida para a matéria cinzenta do corno dorsal na medula espinhal e posteriormente esta informação é transmitida para centros supras-espinhas. No corno dorsal da medula, existem interneurônios inibitórios que modulam a condução do impulso nociceptivo, dificultando a sua propagação devido à redução da liberação de substâncias excitatórias, principalmente a substância P, glutamato e CGRP (KLAUMAN *et al.*, 2008). Portanto, esses interneurônios inibitórios funcionam como uma “comporta”, suprimindo ou permitindo a transmissão de dor ou de outras modalidades sensoriais ao cérebro (MELZACK & WALL, 1965). Estes interneurônios inibitórios podem liberar ácido gama-aminobutírico (GABA), o aminoácido glicina, opióides endógenos e canabinóides endógenos.

O neurotransmissor GABA tem ação em receptores pós-sinápticos GABA A (receptores ionotrópicos) nas fibras secundárias aferentes induzindo a abertura de canais de ânions cloreto (Cl⁻) com conseqüente hiperpolarização dificultando assim a transmissão do impulso nociceptivo. Quando o GABA estimula receptores pós-sinápticos GABA B (receptores metabotópicos) causará também uma hiperpolarização, porém mediada pelo efluxo de cátion potássio (K⁺) (GIORDANO *et.al.*, 2005).

O aminoácido glicina pode ser liberado sozinho ou em conjunto com outros neurotransmissores inibitórios, por exemplo, GABA e opióides endógenos atuam em receptores metabotrópicos, promovendo o influxo do ânion cloreto, promovendo a inibição pós-sináptica, devido à hiperpolarização na célula. Em condições de inflamação neurogênica a ação inibitória da glicina pode ser reduzida devido à presença de prostaglandinas nesse local, principalmente a PGE2, que pode antagonizar os receptores de glicina produzindo assim uma tendência de facilitação da dor (GIORDANO *et.al.*, 2005; WOOLF, 2004).

Interneurônios inibitórios opioidérgicos, também são responsáveis pela modulação do impulso doloroso, estes neurônios contém encefalinas e dinorfinas que desempenham sua função atuando em receptores opióides mu (μ), delta (δ) e kappa (κ) (COGGESHALL & CARLTON, 1997). A ativação destes receptores terá como consequência inibição da enzima adenilatociclase, reduzido a concentração intracelular de AMPc, provocando abertura de canais de potássio, hiperpolarização do neurônio nociceptivo, redução da excitabilidade e o bloqueio da abertura dos canais de cálcio voltagem-dependente (FERREIRA & FACCIONE, 2005).

O aminoácido glutamato promove a transmissão excitatória nociceptiva mais rápida no corno dorsal da medula agindo em receptores pós-sinápticos ionotrópicos. Existem três tipos de receptores ionotrópicos sensíveis ao glutamato: Ácido 2-Amino-3-(5-Metil-3-oxo-1,2-oxazol-4-il) Propanóico (AMPA); ácido N-Metil-D-Aspártico (NMDA e o ácido caínico(CAINATO)). A interação do glutamato com o receptor promoverá a abertura de canais de cálcio (NMDA), sódio (AMPA) ou cálcio e sódio no caso do receptor CAINATO causando influxo destes cátions e conseqüentemente despolarização do neurônio. (MILLAN *et. al.*, 1999)

O peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) é um neuropeptídeo que possui 37 aminoácidos sendo amplamente distribuído em todo o sistema nervoso central e periférico, incluindo neurônios sensoriais primários, assim como os motoneurônios na medula espinhal. Interagem com dois tipos de receptores (CGRP1 e CGRP2) ambos acoplados positivamente à adenilato ciclase (MILLAN *et. al.*, 1999). O CGRP está entre os principais mediadores da inflamação neurogênica, e após a estimulação de fibras nociceptivas aferentes primárias, ocorrerá a liberação de CGRP, além de taquicinas, que colaboram para a resposta nociceptiva e formação de edema (MAGGI *et. al.*, 1995).

As taquicinas que são representadas pela substância P (SP), neurocinina A (NKA) e neurocinina B (NKB) são neuropeptídeos envolvidos na modulação da dor. Eles estimulam predominantemente os receptores NK-1, NK-2 e NK-3 que são acoplados à proteína G, e podem ativar a fosfolipase C e esta é inicialmente responsável pela formação das prostaglandinas que estimulam e potencializam o sinal nos nociceptores. A substância P é liberada, juntamente com a NKA, na medula espinhal após estimulação nóxica. A

substância P produz uma despolarização de longa duração nos neurônios do corno dorsal, contribuindo para a transmissão facilitada conseqüente a estimulação continuada de neurônios nociceptivos periféricos. Além do fenômeno de facilitação central, a substância P tem várias outras funções centrais e periféricas, contribuindo para a inflamação, ativação de células imunes, atividade de células musculares lisas e secretórias em diferentes órgãos e a gênese da enxaqueca no SNC (CARVALHO & LEMÔNICA, 1998).

Vários estudos demonstraram que o sistema de neurotransmissores como oxidonitrérgico, GABAérgico, glutamatérgico, colinérgico, adrenérgico, dopaminérgico, canabinóide, serotoninérgico e outros que podem agir de diferentes maneiras, envolvendo um ou mais sistemas moduladores durante o processo doloroso (HESS *et. al.*, 2010) (Figura 2).

Os opiáceos excitam neurônios contendo 5-HT e encefalinas, que se projetam para o corno dorsal exercendo influência inibitória sobre a transmissão, também atuando sobre terminações periféricas de neurônios aferentes nociceptivos. (RANG, 2007)

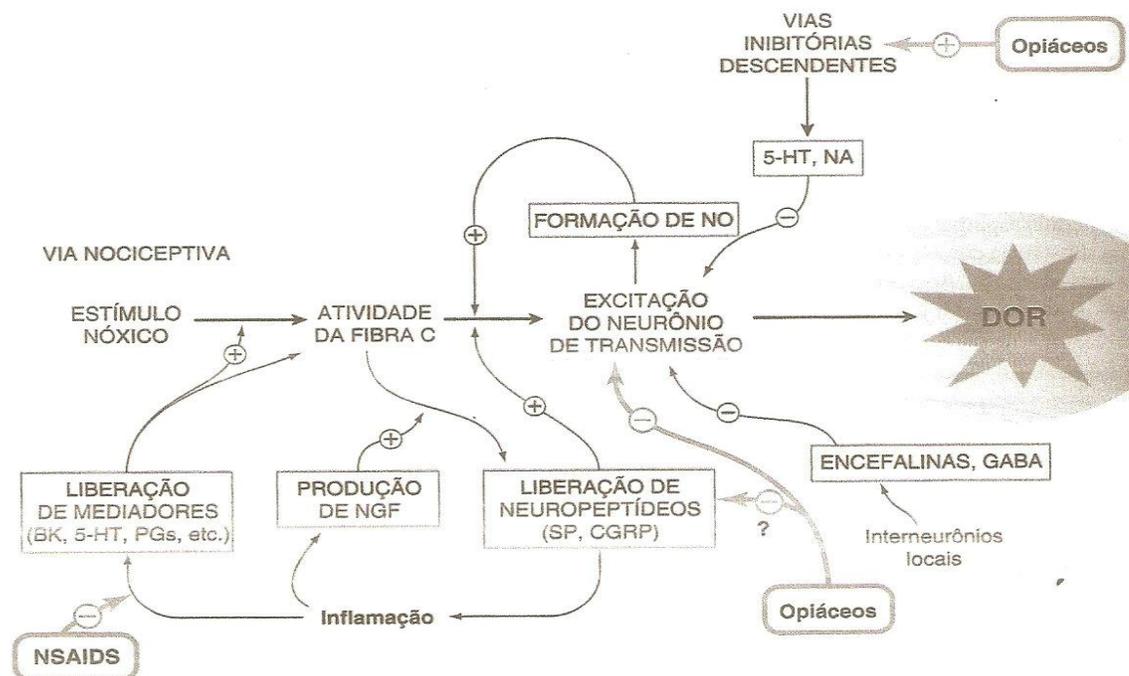


Figura 2. Mecanismos moduladores da via nociceptiva. (5-HT, 5 hidroxitriptamina ; NA, noradrenalina ;BK, bradicinina ;PGs, Prostaglandinas ;NGF, Fator de crescimento do nervo; SP, Substância P ; CGRP, Peptídeo relacionado ao gen da calcitonina ;GABA, ácido gama-aminobutírico; NSAIDs, Fármacos antiinflamatórios não-esteroidais; NO, óxido nítrico. Extraído de Farmacologia (RANG, 2007 p.642).

Ao nível supra-espinhal existem núcleos que projetam neurônios até o corno dorsal da medula, mais precisamente na lâmina II que é denominada de substância gelatinosa, liberando neurotransmissores nesta região. Estes neurotransmissores ativavam interneurônios inibitórios, citado anteriormente, diminuindo, assim, a transmissão da dor, este processo é conhecido como vias descendentes inibitórias da dor. Demonstrou-se que a via descendente da SCP projeta neurônios até o núcleo magno da rafe (NMR), estrutura ventromedial do tronco cerebral rica em serotonina. O NMR projeta neurônios serotoninérgicos, percorrendo o funículo dorsolateral, até a medula, onde a serotonina liberada irá estimular interneurônios inibitórios ricos em encefalina. Assim a encefalina liberada na SG interage com receptores opióides, dificultando o impulso doloroso, como dito anteriormente. Estudos posteriores confirmaram que a estimulação elétrica do NMR também produz analgesia e lesão do funículo dorsal (FD) abole os efeitos da estimulação elétrica tanto da SCP quanto do NMR. No entanto, a lesão do NMR reduz, mas não abole os efeitos da estimulação no SCP, sugerindo que a analgesia desta região possui mais vias inibitórias. Observando o FD, notaram que além das fibras do NMR, trafegam fibras oriundas de outras estruturas do tronco cerebral, estes núcleos são conhecidos como *lucus coeruleus* (LC) ricos em noradrenalina e núcleo paragigantocelular (NPGC) (MILLAN *et. al.*, 1999; MILLAN *et. al.*, 2002; GRAEFF & GUIMARÃES, 2005).

2.2 Inflamação

A inflamação pode ser definida como “reação de um tecido a um irritante” frequentemente observado em patologias do homem e animais domésticos sendo um processo complexo que ocorre comumente em processos degenerativos, neoplásicos, congênitos ou tóxicos. O processo inflamatório tem sido intensamente investigado desde o início da era cristã, quando Celsus (30 a.C.- a 36 d.C.) definiu os quatro sinais principais ou cardeais da inflamação (rubor, tumor, calor e dor). A estes sinais, Galeno, médico da antigüidade, segundo alguns autores, ou Virchow, segundo outros, no século XIX,

acrescentou um quinto sinal, a perda de função (*functio lesae*) da parte afetada (JONES, 2000)

Temporalmente, a inflamação é classificada como aguda e crônica, de acordo com a duração, características histopatológicas, severidade e natureza da resposta inflamatória e, apesar de parecerem fases isoladas, o processo inflamatório e a reparação de um tecido são fenômenos dinâmicos, constituídos de diversas etapas, sem limite muito bem definido, que se inter-relacionam no sentido de localizar, tentar eliminar o agente agressor e, por fim, ajudar a iniciar o reparo do dano tecidual (TIZARD, 1998).

A lesão tecidual inicia a síntese e liberação de substâncias que induzem a inflamação, a formação de edema, a vasodilatação e a migração de células como parte da resposta inflamatória e do processo de recuperação. Entretanto, estes mediadores também ativam e/ou sensibilizam os nociceptores e recrutam outros para exacerbar o sinal de dor. Tais mediadores químicos incluem aminoácidos excitatórios, NO, bradicinina, prostaglandinas, histamina, substância P e fator de crescimento neural (NGF). Também ocorre sensibilização dos nociceptores periféricos por início de uma cascata de eventos que mudam as condutâncias iônicas da terminação das fibras sensoriais periféricas (WINKELSTEIN, 2004) (**Figura 3**).

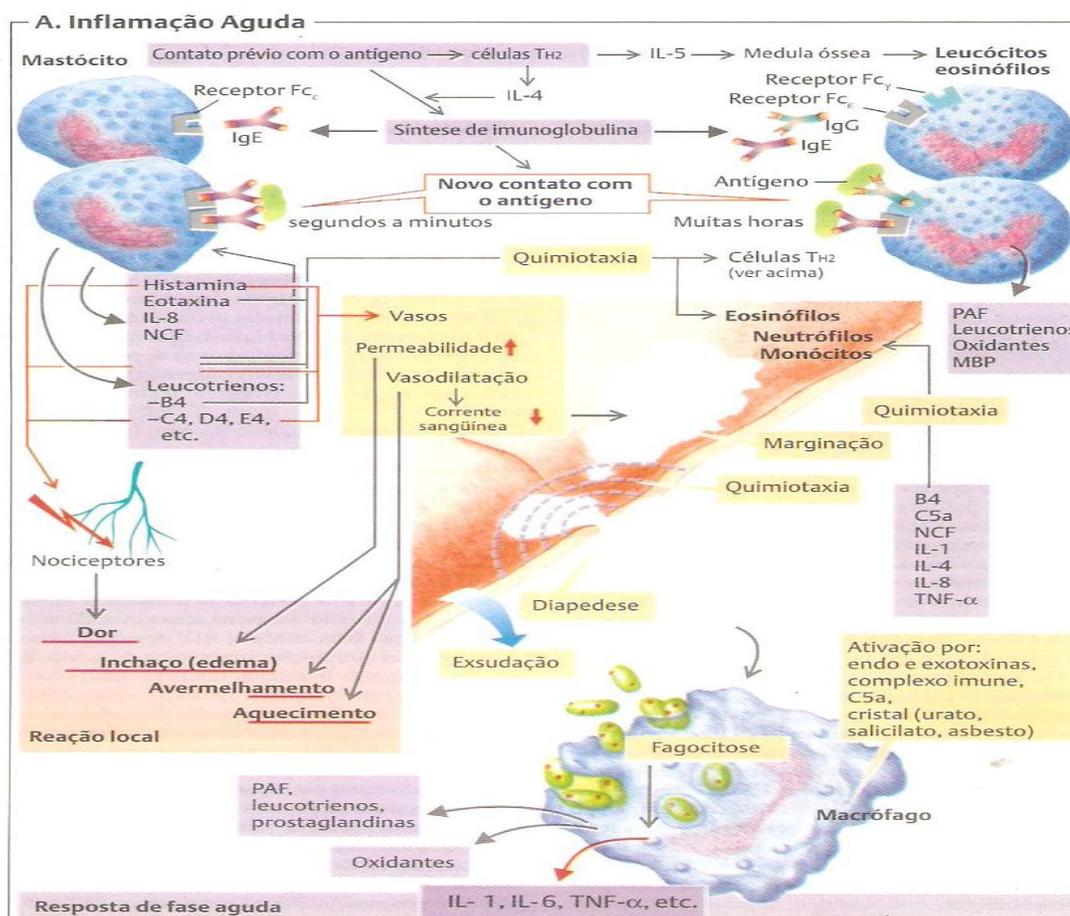


Figura 3. Cascata de alterações bioquímicas e celulares no processo inflamatório agudo. Extraído de: Stefan Silbernagl and Florian Lang Fisiopatologia Texto e Atlas.p.49, 2006

Nos estudos farmacológicos vários modelos são utilizados na pesquisa de atividade analgésica ou anti-inflamatória, avaliando sinais característicos do processo inflamatório, tais como: a evolução do edema, permeabilidade capilar, migração celular, níveis de citocinas pró-inflamatórias, atividades enzimáticas e dor.

A resposta inflamatória é um processo complexo mediado por uma variedade de moléculas sinalizadoras liberadas por: terminações nervosas, mastócitos, plaquetas e leucócitos. Algumas dessas moléculas e seus precursores são utilizados como marcadores do processo inflamatório em curso, como as enzimas adenosina deaminase e mieloperoxidase (MPO), prostaglandinas (PGs), óxido nítrico (NO) (KALKAN *et. al.*, 1999), neutrófilos presentes na circulação sanguínea alteram o seu metabolismo intermediário e, então, a célula é dita “ativada”, neste estado, a enzima mieloperoxidase

(MPO) que é uma peroxidase presente principalmente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos e também em monócitos, induz o metabolismo oxidativo caracterizado por um intenso consumo de oxigênio e produção de substâncias reativas (NEVE *et. al.*, 2001; BUT *et. al.*, 2002).

Contudo, sob certas circunstâncias a liberação excessiva dessas espécies oxidantes pode promover estresse oxidativo e lesão tecidual (GAUT *et. al.*, 2001). Portanto, a liberação de MPO a partir de células inflamatórias, ou seja, neutrófilos ativados é um parâmetro que pode ser utilizado para avaliar o grau de inflamação (ROSEN & MICHEL, 1997). Além de MPO, outras enzimas são importantes no processo inflamatório, como as ciclo-oxigenases(COX). Existem duas isoformas da enzima COX, a COX-1 que é constitutivamente expressa em muitos tecidos orgânicos e COX-2, que é rapidamente induzida por uma variedade de mitógenos e citocinas (HUSSAIN *et. al.*, 2003), além disso, a diminuição da expressão da COX-2 constitutiva nos rins resulta em uma redução do filtrado glomerular, conseqüentemente, haverá retenção de sais e água promovendo aumento da pressão arterial (CHENG & HARRIS, 2004). A oxidação de ácidos graxos catalisada pelas enzimas Lipo-oxigenase (LOX) e COX é altamente regioespecífica e estereoespecífica. Essas enzimas são conhecidas pela geração de mediadores inflamatórios conhecidos como eicosanóides (prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos) a partir do ácido araquidônico.

A COX-1 e COX-2 existem como homodímeros com uma massa molecular de aproximadamente 70 kilodaltons (kDa) por monômero. As estruturas terciárias e quaternárias das duas enzimas são praticamente idênticas. Cada subunidade é composta por três domínios estruturais distintos: um domínio curto N-terminal; um motivo α -helicoidal da membrana de ligação e um domínio catalítico C-terminal. As enzimas COX são proteínas de membrana e consistem de uma série de α -hélices anfipáticas, com vários aminoácidos hidrofóbicos expostos (PICOT *et. al.*, 1994). Porém a COX-2 apresenta um aminoácido menor na posição 523 em comparação ao que se observa na estrutura da COX-1 (COX-2; valina e COX-1; isoleucina), isto resulta em uma diferença em relação ao tamanho e forma desta enzima, assim a COX-2 possui uma bolsa lateral maior que a COX-

1. Isto tem implicações importantes para a o perfil de seletividade de algumas classes de anti-inflamatórios não esteróidais AINEs (KURUMBAIL *et. al.*, 1996).

Em meados do ano 2000 foi descrito em várias espécies de animais, dentre elas, humanos e roedores, uma enzima variante da COX-1, a ciclo-oxigenase-3 (COX-3) e a expressão de seu mRNA foi encontrado abundantemente em células do tecido cerebral (CHANDRASEKHARAN *et. al.*, 2002; KIS *et. al.*, 2003). Esta enzima possui mRNA idênticos aos da COX-1 exceto pelo fato de que possui 1 intron a mais. O paracetamol, fármaco analgésico e antipirético, possui seletividade para COX-3, em relação à COX-1 ou COX-2 (KIS *et. al.*, 2005).

As enzimas COX catalisam a conversão do ácido araquidônico (AA) à prostaglandina G2 (PGG2) e em seguida à prostaglandina H2 (PGH2), que é o precursor biossintético comuns das prostaglandinas e do tromboxano. Estes lipídios bioativos medeiam inúmeros efeitos fisiológicos e patológicos, incluindo dor, febre, inflamação, regulação da função renal e manutenção da integridade da mucosa do estômago (KURUMBAIL *et. al.*, 2001) **(Figura 4)**.

Cascata do Ác. Araquidônico

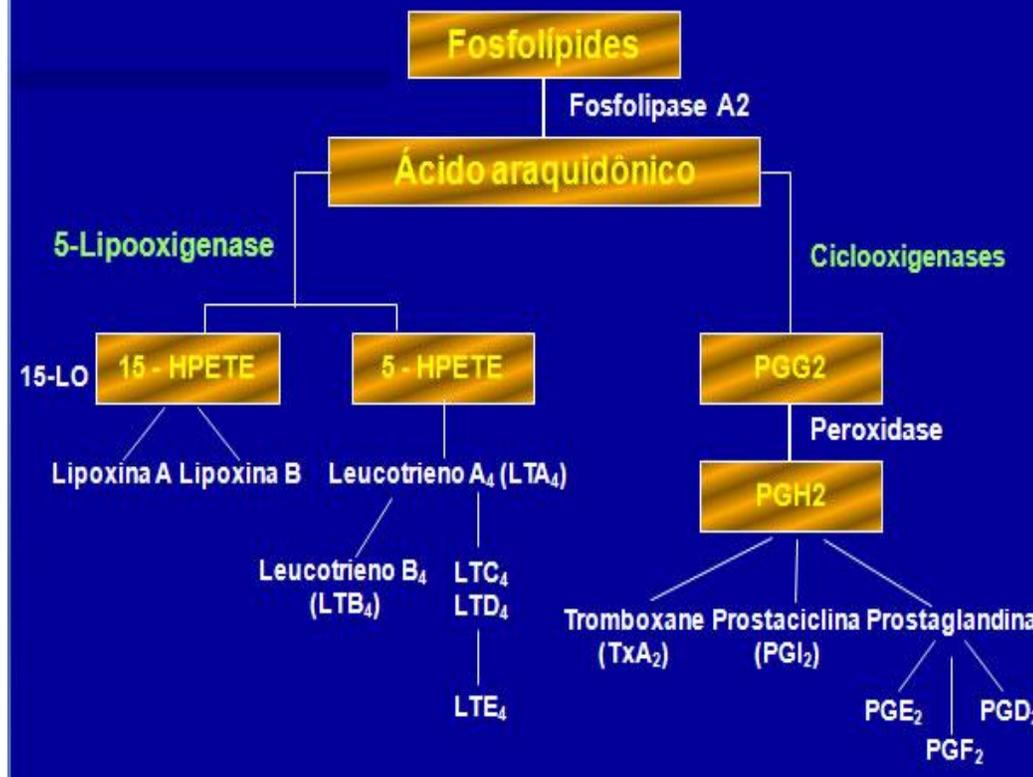


Figura 4. Formação dos principais mediadores pró-inflamatórios através da conversão dos fosfolípidos de membrana em ácido araquidônico (AA), pelas ações das enzimas fosfolipase A₂, ciclo-oxigenase (COX) e lipo-oxigenase (LOX). Extraída da fonte <http://www.misodor.com/QUEIMADURAS.html> acesso em 09/05/2012 14:47

As LOXs (enzima responsável pela produção de leucotrienos a partir do ácido araquidônico) são capazes de oxidar ácidos graxos essenciais como o ácido docohexaenóico (DHA) e o ácido eicosapentaenóico (EPA) gerando hidroperóxidos específicos da família dos mediadores lipídicos caracterizadas, sendo os compostos mais bioativos denominados de resolvinas (compostos capazes de promover a resolução da inflamação), e protectinas (compostos com alto potencial anti-inflamatório (SERHAN & SAVILL, 2005)).

O ácido acetilsalicílico além de ser um conhecido inibidor da formação de prostaglandinas pró-inflamatórias, induz a formação de mediadores lipídicos anti-inflamatórios, modifica covalentemente o resíduo de serina próximo ao sítio ativo da

enzima, através de uma reação de acetilação. A COX-1 perde a capacidade de oxidar o ácido araquidônico, ao passo que a COX-2 acetilada passa a converter o DHA em mediadores lipídicos, como resolvinas e protectinas (SERHAN, 2006)

Os anti-inflamatórios não-esteroidais como a indometacina e o piroxicam, inibidores não seletivos das ciclo-oxigenases são eficazes contra dor associada à inflamação ou lesão tecidual, diminuindo a produção de prostaglandinas que sensibilizam nociceptores a mediadores da inflamação como a bradicinina (RANG, 2007), mas que em contrapartida apresentam efeitos colaterais muitas vezes graves. Diversos AINEs inibem tanto a expressão constitutiva COX-1 como da COX-2 induzível, enquanto outros como o celecoxib têm-se mostrado mais seletivos em inibir a atividade da enzima COX-2 (KRISHNAN *et. al.*, 2009).

Os eicosanóides são importantes mediadores de processos fisiopatológicos, dentre eles, a prostaglandina E2 (PGE2) que é intensamente aumentada no processo inflamatório (APPLETON *et. al.*, 1996). As Prostaglandinas E2 sintase (PGES), que converte os produtos derivados da COX PGH2 a PGE2, ocorre em múltiplas formas quanto as propriedades enzimáticas, expressão e localização. A PGES citosólica (cPGES) é uma proteína constitutivamente expressa em uma variedade de células e tecidos e associada ao choque térmico . A PGES microssomal (mPGES), é uma proteína perinuclear e induzível tendo sua expressão reduzida pelos anti-inflamatórios esteroidais. A cPGES é predominantemente acoplada a COX-1 enquanto mPGES é preferencialmente ligada a COX-2(MURAKAMI *et. al.*, 2002) . Geralmente atua em conjunto com a COX-2 e é fortemente expressa por estímulos pró-inflamatórios, por exemplo, interleucina-1 β (IL-1 β) e LPS, bem como em diversas condições patológicas: inflamação crônica, dor, febre, arteriosclerose, acidente vascular cerebral e anorexia (GUAY *et. al.*, 2004)

A prostaglandina D2 (PGD2) é a mais abundante no SNC e o maior metabólito derivado da oxigenação do ácido araquidônico pela COX. A enzima HPGDS (PGD sintase hematopoiética) é expressa em células inflamatórias e imunológicas (KANAOKA *et. al.*, 2003), além disso, a PGD₂ é produzida pelos mastócitos em resposta a estímulos dependentes de IgE e pode desempenhar um proeminente papel pró-inflamatório em várias doenças como a rinite alérgica e asma brônquica, (CHARLESWORTH *et. al.*, 1991).

A prostaglandina I₂ (PGI₂), também conhecida como prostaciclina, é sintetizada no sistema endovascular e atua como um vasodilatador possui efeitos estimulatórios sobre a angiogênese, além de inibir a agregação plaquetária. O Tromboxano (TXA₂) é sintetizado por plaquetas, age como um vasoconstritor e induz a agregação plaquetária e ambos eicosanóides, PGI₂ e TXA₂, são sintetizados a partir do mesmo precursor, o ácido araquidônico (BUCHANAN *et. al.*, 2004; OKAWARA *et. al.*, 2009). A conversão de PGH₂ em prostaciclina é realizada pelas enzimas PGI sintases (PGIS) (SKILL *et. al.*, 2008).

As prostaglandinas (PGs) se ligam a receptores metabotrópicos acoplados à membrana, receptores prostanóides, que ativam diferentes vias de transdução de sinal gerando os diversos efeitos das PGs (BREYER *et. al.*, 2001). O óxido nítrico (NO), importante mediador do processo inflamatório, é um gás e um radical livre, atuantes em diversas condições, tanto fisiológicas (homeostasia) como patológicas (inflamação). O NO é sintetizado a partir do aminoácido L-arginina, o qual está presente em altas concentrações no sangue, no fluido extracelular e também em diferentes tipos de células. Esta síntese é promovida pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) que é responsável por promover a reação de catalise envolvida nesta conversão.

Sabe-se da existência de três isoformas de óxido nítrico sintase: NOS neuronal (nNOS), NOS endotelial (eNOS) e NOS induzida (iNOS). As duas primeiras enzimas são denominadas NOS I e NOS III, e são enzimas constitutivas, produzem NO em baixas concentrações e a sua ativação é cálcio-dependente (CIRINO *et. al.*, 2003). As iNOS estão presentes no local inflamado e liberam grandes quantidades de NO (cerca de 20 vezes mais do que a NOS constitutiva) e são ativadas por estímulos externos como lipopolissacarídeos bacterianos e por estímulos internos como, por exemplo, bradicinina, substância P, histamina e 5-hidroxitriptamina.

Outros importantes mediadores inflamatórios são as citocinas, que são proteínas secretadas pelas células que participam das reações de imunidade inata e adaptativa e por isto, responsáveis por mediar muitas das funções dessas células. As citocinas são conhecidas como mediadores solúveis da resposta imunológica e inflamatória. Como muitas citocinas são sintetizadas por leucócitos, elas também são chamadas de interleucinas

(IL) e freqüentemente suas ações não se limitam a atuarem somente nos leucócitos (ABBAS & LITCHMAN, 2005).

O dano tecidual causado pela inflamação, trauma, tumor ou isquemia, libera uma mistura de mediadores endógenos no espaço extracelular, tais mediadores inflamatórios, como a bradicinina (BK), prostaglandina E2 e 5-HT são responsáveis pela geração de dor e hiperalgisia (KRESS & REEH, 1996) (**Figura 5**).

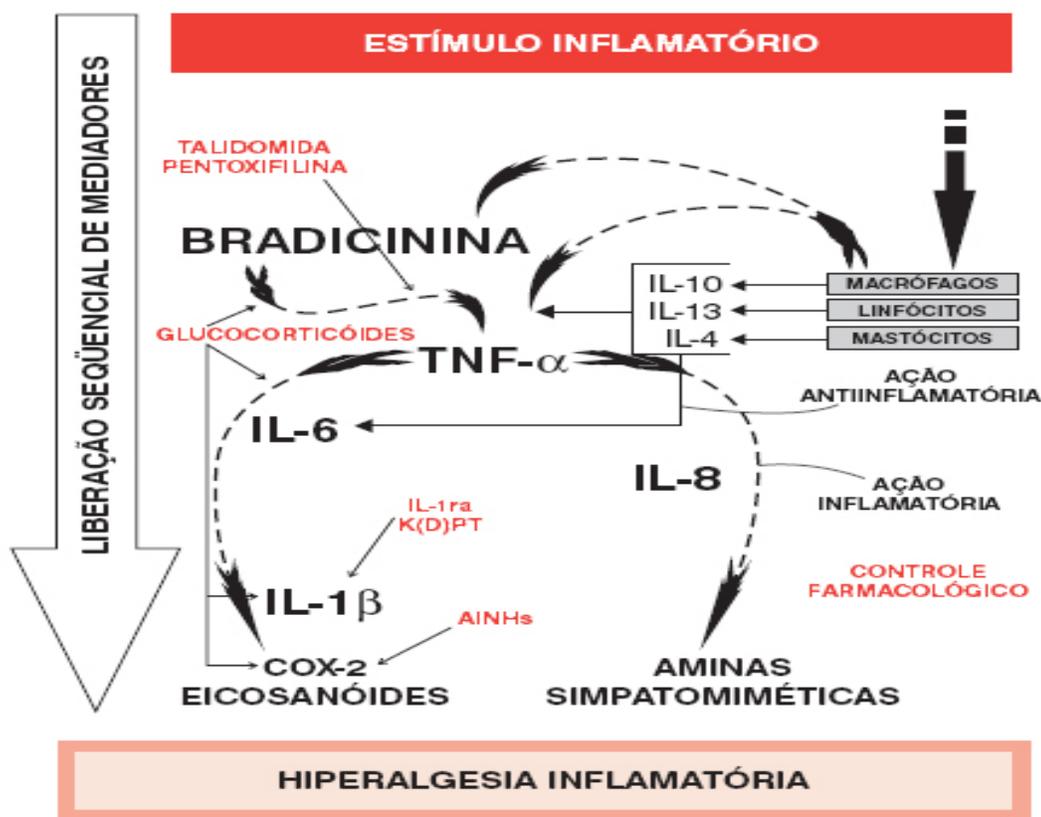


Figura 5 .Principais mediadores inflamatórios responsáveis pela dor e hiperalgisia Extrída da fonte <http://www.dol.inf.br/Html/DorInflamatoria/DorInflamatoria-Titulo2.html> Acesso em 20/03/2012 17:03

Os receptores de citocinas podem ser classificados de acordo com suas semelhanças estruturais como: receptores de classe I, estes receptores apresentam domínios extracelulares conservados de cisteínas e além disso, possuem seqüências conservadas no domínio intracelular, por exemplo, os receptores para IL-2, IL-6, IL-12, IL-15; receptores de classe II; os receptores desta classe também apresentam domínio extracelular de cisteínas conservada, mas com diferenças na estrutura quaternária, por exemplo, os receptores para os interferons e IL-10); receptores de classe III; a família destes receptores

são de cadeias únicas homodímeras, por exemplo, os receptores para: fator de necrose tumoral - α (TNF- α), fator de crescimento do nervo (NGF) e por fim os receptores de classe IV, que são representados pela família de receptores de IL-1 e IL-18, que apresentam estrutura no domínio extracelular e regiões citosólicas relacionadas com receptores toll-like (família de proteínas de membrana que servem como receptores de reconhecimento padrão para uma variedade de moléculas derivadas de microrganismos e estimulam a resposta imune inata (ABBAS & LITCHMAN, 2005).

Dentre as citocinas, o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) é uma citocina multifuncional que pode regular muitos processos celulares e biológicos tais como a função imunológica, diferenciação celular, proliferação, apoptose e metabolismo energético, ainda o TNF- α pode regular a produção de outras citocinas pró-inflamatórias, por exemplo, IL-6 e IL-1, portanto é capaz de mediar e/ou amplificar seus efeitos em órgãos periféricos (CAWTHORN & SETHI, 2008). Durante o processo inflamatório agudo, a superprodução de TNF- α é crucial para a indução dos genes inflamatórios, para morte celular e no recrutamento e ativação de células do sistema imunológico (BHATIA *et. al.*, 2005). Atualmente mais de 40 membros da família TNFR, receptores de TNF, foram identificados em humanos e esses receptores possuem domínios extracelulares de cisteína (LOCKSLEY *et. al.*, 2001). A redução da quantidade de TNF- α que se liga ao seu receptor acarretará na diminuição da fosforilação da MAPK (Proteína quinase ativada por mitógenos) e a ativação do fator nuclear kappa-Beta (NF- κ B), além disso, camundongos estimulados com TNF- α apresentam um aumento da expressão de iNOS e conseqüentemente aumento da produção de óxido nítrico e da expressão da COX-2 (CONCETTA *et. al.*, 2009).

Outras substâncias que estão envolvidas no processo inflamatório são as aminas, uma das principais aminas vasoativas é a serotonina, 5-hidroxitriptamina (5-HT), uma monoamina conhecida principalmente por seu papel como um neurotransmissor (YU *et. al.*, 2008). Fora do sistema nervoso central a 5-hidroxitriptamina é encontrada principalmente em plaquetas e pode ser liberada durante a agregação plaquetária. Além disso, tem sido demonstrado que os mastócitos também são capazes de armazenar e liberar 5-HT. (CLOEZI-TAYARANI & CHANGEUX., 2007). A grande variedade de atividades biológicas e farmacológicas mediadas pela 5-HT é devida à existência de diferentes tipos

de receptores serotoninérgicos (5-HTR) (HOYER *et. al.*, 2002). A administração sistêmica ou arterial de antagonistas dos receptores 5-HTR2A desempenha um papel importante no processo inflamatório, mostrando que estes receptores reduzem drasticamente a dor e a inflamação (HONG *et. al.*, 2006). A serotonina tem a capacidade de induzir a adesão e a migração de mastócitos, e estes efeitos ocorrem pela ativação dos receptores 5-HTR1A (KUSHNIR SUKHOV *et. al.*, 2006).

Outra amina vasoativa que atua em sítios inflamatórios é a histamina, uma amina de baixo peso molecular produzidas por várias células, incluindo neurônios do sistema nervoso central, células enterocromafins do sistema gástrico, células hematopoéticas; mastócitos, basófilos, macrófagos e linfócitos (JUTEL *et. al.*, 2005), sendo sintetizada a partir do aminoácido L-histidina exclusivamente pela ação da enzima histidina descarboxilase. A lesão tecidual pode estimular a células deste tecido lesado a liberar histamina, provocando dor local, vasodilatação e edema (RAFFA, *et. al.*, 2001).

As ações da histamina são mediadas por três receptores distintos, pertencente a famílias de receptores acoplados à proteína G (ASHMAWI *et. al.*, 2009). O receptor H1 é o mais conhecido, quando a histamina se liga aos receptores H1, ela ativa a proteína-G, os receptores H2, possuem ações em secreção de ácido gástrico e alvo de alguns fármacos com atividade antiulcerogênica (HILL *et. al.*, 1997) e um terceiro receptor de histamina está presente no cérebro, o receptor H3. Estes receptores H3 são pré-sinápticos e atuam como autoreceptores, isto é, quando a histamina se liga a esses receptores, inicia uma sinalização celular que irá reduzir a liberação de vesículas em que está armazenada nestas terminações neuronais. Esses receptores são também encontrados em terminações nervosas não histaminérgicas e são présinápticos e quando ativados podem inibir a liberação de neurotransmissores, como a acetilcolina ou noradrenalina (STAHL *et. al.*, 2008).

2.3 O gênero *Copaifera* e propriedades farmacológicas

As espécies conhecidas popularmente como ‘copaíba’, ‘copaibeiras’, ‘pau d’ óleo entre outros nomes pertencentes ao gênero *Copaifera* (Leguminosae-Caesalpinioideae), nativas da região tropical da América Latina e também da África Ocidental são encontradas facilmente nas Regiões Amazônicas e Centro-oeste, possuem 72 espécies catalogadas sendo que 16 destas só são encontradas no Brasil (PIERI *et. al.*, 2009), dentre algumas espécies *C.langsdorffii*, *C. duckei*, *C.glycyarpa*, *C. guyanensis*, *C. martii*, *C. multijuga*, *C. paupera*, *C. piresii*, *C. pubiflora* e *C. reticulata*.. São árvores de crescimento lento, alcançam de 25 a 40 metros de altura, podendo viver até 400 anos. O tronco é áspero, de coloração escura, medindo de 0,4 a 4 metros de diâmetro (**Figura 6**). As folhas são alternadas, pecioladas e penuladas. Os frutos contêm uma semente ovóide. As flores são pequenas, apétalas, hermafroditas e arranjadas em panículos axilares. A floração e frutificação das copaíbas ocorrem a partir dos 5 anos de idade. A floração ocorre entre outubro e julho e a frutificação entre junho e outubro com variações dependendo do clima. Algumas espécies são nectíferas sendo polinizadas por *Apis mellifera* e a dispersão de suas sementes se dá principalmente por aves nativas da região. Sua identificação botânica é difícil, sendo realizada, na maioria das vezes, segundo características das flores, pubescência das sépalas, comprimento dos anteros e a condição glabrosa ou não do pistilo. No Brasil, a espécie *C.langsdorffii* Desf. é a mais conhecida por estar distribuída por todo território (da Amazônia a Santa Catarina, no nordeste e centro-Oeste) e por possuir outras variedades (MARTINS-DA-SILVA *et. al.*, 2007).



Figura 6. *Copaifera langsdorffii* (ITF – Índice terapêutico Fitoterápico p.29)

PIERI em 2009 publicou um trabalho onde realizou o levantamento bibliográfico do gênero suas utilizações num período de 1792 a 2008. Neste trabalho está descrito que a primeira vez que o óleo de copaíba foi citado, provavelmente ocorreu no ano de 1534, quando foi encontrada uma carta enviada por Pethus Martins ao Papa Leão X, em que a droga usada pelos índios nativos era chamada copei, possuía um odor excelente e muito maior efeito para curar feridas. Supõe-se que tal conhecimento advém da observação do comportamento de alguns animais feridos, que se atritavam no tronco das árvores de copaíba, na busca da cura (MACIEL *et. al.*, 2002; VEIGA JUNIOR *et. al.*, 2002). Em 1560, o padre jesuíta José de Anchieta em carta ao padre geral, comenta o poder cicatrizante do óleo de copaíba e em meados do século XVI, Pero de Magalhães Gândavo foi o primeiro a descrever a eficácia do óleo como analgésico e cicatrizante resultando em um comentário mundial, tornando o óleo, um dos quatro produtos mais exportados pelas províncias do Maranhão e Grão Pará. Assim, o óleo continuou sendo explorado ao longo dos anos até Gabriel Soares de Souza, na obra “Taratado descritivo do Brasil”, registrou o uso do óleo pelos europeus e chamou o produto de “árvore ou erva da virtude”. Por volta de 1760, Jacquin descreveu a primeira *Copaifera* (*C.officinalis*) de forma errônea sendo dois anos mais tarde descrita oficialmente por Linnaeus de *Copaifera* L.. Mais tarde outras espécies foram sendo descritas até meados do século XX onde Ducke e Dwyer estudaram e descreveram espécies amazônicas.

O *Food and Drug Administration* (FDA), órgão de regulamentação de fármacos e alimentos do governo americano, aprovou o óleo de copaíba em 1972. Testes de irritação e sensibilização do óleo de copaíba foram realizados com 25 voluntários, não se observando estes tipos de reação (VEIGA-JUNIOR *et.al.*, 2002).

Fitoterápico, de acordo com legislação sanitária brasileira, é o medicamento obtido exclusivamente a partir de matérias-primas ativas vegetais. Os fitoterápicos utilizados pelo SUS são aprovados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), e por isso, são considerados seguros e eficazes para utilização pela população.

Relação nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS) traz uma lista atualmente com 71 espécies medicinais com potencial para gerar produtos de interesse

ao SUS dentre elas encontra-se a *copaifera* spp. Algumas destas encontram-se listadas na **Tabela 1** a seguir.

O objetivo do Ministério da Saúde, com a divulgação da lista, é orientar estudos e pesquisas que possam subsidiar a elaboração da relação de fitoterápicos disponíveis na assistência básica em todo país.

Tabela 1. Lista de 41 plantas medicinais de interesse do SUS.

<i>Achillea millefolium</i>	<i>Bauhinia spp*</i>	<i>Cordia spp*</i>	<i>Mikania spp*</i>
<i>Allium sativum</i>	<i>Bidens pilosa</i>	<i>Costus spp*</i> (C. scaber ou C. spicatus)	<i>Passiflora spp*</i>
<i>Aloe spp*(A. vera)</i>	<i>Calendula officinalis</i>	<i>Croton spp</i>	<i>Psidium guajava</i>
<i>Alpinia spp*</i>	<i>Carapa guianensis</i>	<i>Cynara scolymus</i>	<i>Ruta graveolens</i>
<i>Anacardium occidentale</i>	<i>Casearia sylvestris</i>	<i>Erythrina mulungu</i>	<i>Salix alba</i>
<i>Ananas comosus</i>	<i>Matricaria chamomilla</i>	<i>Eucalyptus globulus</i>	<i>Solanum paniculatum</i>
<i>Apuleia ferrea</i>	<i>Chenopodium ambrosioides</i>	<i>Glycine max</i>	<i>Solidago microglossa</i>
<i>Arrabidaea chica</i>	<i>Copaifera spp*</i>	<i>Kalanchoe pinnata</i>	<i>Trifolium pratense</i>
<i>Artemisia absinthium</i>	<i>Cúrcuma longa (ou curcumina)</i>	<i>Malva sylvestris</i>	<i>Vernonia condensata</i>
<i>Baccharis trimera</i>	<i>Dalbergia subcymosa</i>	<i>Mentha spp*)</i>	<i>Zingiber officinale</i>

O índice Terapêutico Fitoterápico (ITF) traz informações sobre a utilização do óleo de qualquer espécie de *Copaifera*, já que todas possuem as mesmas características botânicas e

medicinais e que a diferença básica é a cor do óleo que é extraído de seu tronco e a região do país onde é encontrada, que pode causar variações em suas alturas. As indicações terapêuticas em afecções da pele: úlceras crônicas, feridas, psoríase, urticária, dermatoses; doenças do aparelho genito - urinário: infecções, blenorragias agudas e crônicas e cistite. A posologia recomendada é de 5 mL do óleo divididos em 2 a 3 doses diárias diluídos em leite frio ou quente, aplicação tópica do óleo equivalente a uma colher de café e crianças ½ dose. Além disso, os efeitos colaterais podem ocorrer por hipersensibilidade aos componentes e a utilização de uma dose 3 vezes maior (15mL ou 300 gotas) pode causar tremores, dores na virilha e insônia. Não há relatos da sua farmacocinética para uso na gestação e na amamentação, também não há relatos sobre interações medicamentosas (LIMA, 2008)

A nomenclatura correta para o óleo da copaíba é a de óleo-resina, por ser um exsudato constituído por ácidos resinosos e compostos voláteis, chamado comumente de bálsamo, apesar de não ser um bálsamo verdadeiro por não apresentar derivados do ácido benzóico ou cinâmico (VEIGA-JUNIOR *et. al.*, 2002). O óleo de copaíba é encontrado em canais secretores localizados em todas as partes da árvore. Estes canais são formados pela dilatação de espaços intercelulares (meatos) que se intercomunicam, Segundo alguns autores, o óleo é produto da desintoxicação do organismo vegetal e funciona como defesa da planta contra animais, fungos e bactérias. A coleta não agressiva é aquela realizada através de uma incisão com trado a cerca de 1 metro de altura do tronco inserindo um cano de PVC de ¾ de polegada no orifício. Terminada a coleta, o orifício é vedado com argila para impedir a infestação por fungos ou cupins. No período do Brasil imperial, mais precisamente em 1818, foi promulgado um ato regulando a extração do óleo, mas essa extração se dava com a derrubada e conseqüente morte da planta (VEIGA-JUNIOR *et. al.*, 2002; PIERI *et. al.*, 2009) (**Figura 7**).



Figura 7. Foto ilustrando a forma de extração da óleo-resina do tronco de *Copaifera* (PIERI *et. al.*, 2009)

As plantas do gênero *Copaifera* são utilizadas para diversos fins sendo um deles o uso do óleo extraído de seu tronco na medicina popular no tratamento de várias afecções como feridas, contusões (pancadas) e doenças do trato respiratório (infecções de garganta, bronquites e asma). As populações autóctones da região do Xingu comumente utilizam essa óleo-resina em escoriações, inflamação sobre a pele, dores estomacais, contraceptivo e na pálpebra inferior dos olhos, como um dilatador da pupila na atividade de caça noturna (SOUZA *et. al.*, 2010).

Ao longo dos anos, esses óleos têm sido estudados em sua composição química e suas atividades biológicas comprovadas em laboratório para diferentes espécies de *Copaifera* como: anti-inflamatória (PAIVA *et. al.*, 2003 e VEIGA *et. al.*, 2007), antiedematogênica (VEIGA *et. al.*, 2002), antimicrobiana (TINCUSI *et. al.*, 2002), gastroprotetora (PAIVA *et. al.*, 1998), antitumoral (LIMA *et. al.*, 2003) e antinociceptiva (GOMES, *et. al.*, 2006; 2007 e 2010). Os principais compostos químicos isolados da óleo-resina ligados a estas atividades biológicas são os sesquiterpenos (cariofilenos e humulenos) e diterpenos (ácido caurenóico e ácido poliáltico) (TAPPIN *et. al.*, 2004).

A atividade anti-tumoral de óleos de *Copaifera langsdorfii* foi observada contra carcinoma em camundongos. O fracionamento guiado por bioensaio mostrou que os diterpenos colavenol e o ácido hardwíckico apresentam potente atividade anti-tumoral, sem contudo, apresentarem citotoxicidade contra as mesmas células (VEIGA JUNIOR *et. al.*,

2002; 2012) Para os óleos de *C. multijuga* a atividade anti-tumoral vem sendo estudada *in vivo* e *in vitro*. Nestes estudos, o óleo de *C. multijuga* tem inibido o crescimento tumoral (melanoma murino B16F10) através da redução da formação dos nódulos de metástase no tecido pulmonar (VEIGA JUNIOR *et. al.*, 2002; 2012). Experimentos de viabilidade celular, realizados *in vitro* com este mesmo óleo, mostram uma significativa redução no número de células de melanoma viáveis (VEIGA JUNIOR *et. al.*, 2002; 2012). O óleo de *Copaifera multijuga* mostrou-se também tóxico e com potente atividade antitumoral tempo e dose dependente em ensaios contra células de mastocitoma murino P815 (VEIGA JUNIOR *et. al.*, 2002; 2012) .Os óleos das espécies *Copaifera multijuga*, *Copaifera cearensis* e *Copaifera reticulata* foram avaliados também quanto a sua atividade anti-inflamatória no modelo de pleurisia em camundongos, antineoplásica *in vitro* e tripanossomicida (VEIGA JUNIOR *et. al.*, 2002; 2012)

Na avaliação da atividade antineoplásica *in vitro* dos óleos destas três espécies, foi verificada a capacidade de inibição da proliferação da linhagem Sp2/0 (mieloma de camundongo). Os três óleos testados (250 mg/poço) foram capazes de inibir significativamente a proliferação celular (medida através de incorporação de timidina [metil-3H] (VEIGA JUNIOR *et. al.*, 2002).

Entre as propriedades medicinais dos óleos de copaíba a mais estudada foi a anti-inflamatória . Zanini e colaboradores (1988) estudaram a atividade anti-inflamatória do óleo em ratos utilizando diversos modelos, como inibição de edema induzido por carragenina, inibição de formação de granuloma e diminuição da permeabilidade vascular. Seus resultados indicam que o óleo possui atividade anti-inflamatória e baixa toxicidade (DL₅₀ 3.79 mg/kg). Apesar dos efeitos adversos por altas doses do óleo (irritação gastrointestinal, diarreia, sialorréia e depressão do sistema nervoso central), seu uso é plenamente justificado na medicina popular. O estudo feito por Zanini e colaboradores foi realizado com óleo comercial, sem identificação botânica da espécie que o produziu. (VEIGA JUNIOR *et. al.*, 2002)

Fernandes e colaboradores (1992) estudaram o efeito analgésico e anti-inflamatório do óleo de *Copaifera cearensis*, comparando-os com os da indometacina e com alguns derivados isolados de óleos de copaíba como o ácido copálico, o éster metílico do ácido

solidago e bisabolol. Os resultados do estudo indicaram que o óleo possui atividades anti-inflamatória e analgésica maiores que aquela dos três compostos estudados isoladamente, porém menores do que as da indometacina. (VEIGA JUNIOR *et. al.*, 2002; 2012).

No ensaio de atividade anti-inflamatória, a pleurisia é induzida por carragenina, LPS (lipopolissacarídeo extraído da parede de *E.coli*) ou reação alérgica. Na reação inflamatória induzida por carragenina, nenhum dos óleos testados foi capaz de inibir o extravasamento de proteínas plasmáticas ou a migração de células que ocorre 4 horas após o estímulo inflamatório. (VEIGA JUNIOR *et. al.*, 2002) . Na reação inflamatória induzida 24h após a injeção de LPS ou estímulo alérgico (ovoalbumina em animais previamente sensibilizados), o óleo de *Copaifera reticulata* foi capaz de inibir significativamente a migração de eosinófilos, enquanto os outros dois óleos não apresentaram efeito na dose testada (100mg/kg) (VEIGA JUNIOR *et. al.*, 2002)

Estudos recentes realizados com diversos óleos de copaíba comerciais e de *Copaifera multijuga* mostram que a fração que contém hidrocarbonetos tem maior atividade anti-inflamatória do que as frações de álcoois sesquiterpênicos e ácidos diterpênicos . (VEIGA JUNIOR *et. al.*, 2001; 2002; 2012)

Óleos de copaíba comerciais mostraram atividades de proteção contra a penetração de cercárias de *Schistosoma mansoni*, e como cercaricida, pesticida e repelente de insetos, sendo ainda descritas atividades antimicrobiana e antibacteriana. Os estudos de atividade antibacteriana mostraram maiores atividades bactericida e bacteriostática do óleo de *Copaifera multijuga*, frente a *Streptococcus mutans*, enquanto o óleo essencial apresentou melhor ação bactericida e a resina apresentou apenas ação bacteriostática e quando avaliada a atividade tripanossomicida, os óleos foram colocados em contato com cultura de formas tripomastigotas de *T. cruzi* durante 48h (250 mg/poço). Observou-se que o óleo de *Copaifera multijuga* foi capaz de matar 100% dos parasitas, enquanto que os óleos de *Copaifera cearensis* e *Copaifera reticulata* mataram 87% dos *T. cruzi*, indicando uma potente atividade (VEIGA-JUNIOR *et. al.*, 2002; 2012).

A atividade gastroprotetora do óleo de *Copaifera langsdorfii* foi avaliada em lesões gástricas induzidas por etanol e indometacina. Ratos pré-tratados com o óleo desta

copaíba foram protegidos em doses a partir de 400 mg/kg. Os resultados obtidos sugerem que a ação deste óleo se deve à diminuição de acidez gástrica, provavelmente através da promoção da secreção de muco gástrico e bicarbonato (PAIVA *et. al.*, 2004). Estudos realizados com óleo de copaíba comercial em ratos mostraram a ocorrência de diarreia, perda de peso e ação irritante no comportamento de ratos em doses de 0,63 ml/kg (VEIGA-JUNIOR *et. al.*, 2002; 2012)

As propriedades cicatrizantes de feridas e úlceras, uma das principais indicações dos óleos de copaíba, foram estudadas em óleos comerciais por Brito e colaboradores para os óleos de *Copaifera langsdorfii*, e por Rao e colaboradores. Nos estudos de Brito, realizados em modelo de ferida aberta, os ratos que receberam óleo de copaíba na região dorsal apresentaram aumento de tecido de granulação e do número de vasos sanguíneos, porém, diminuição da quantidade de fibras colágenas. Nos experimentos realizados por Rao, o óleo mostrou-se bastante ativo nos ratos em modelos de ferida aberta, resistência à tensão e úlcera crônica de estômago, produzida por ácido acético (VEIGA-JUNIOR *et. al.*, 2002).

Os 28 diterpenos, descritos nos óleos de copaíba estudados, pertencem aos esqueletos caurano, labdano e clerodano. Em estudo realizado com diversos óleos de copaíba provenientes de várias regiões do Brasil, o ácido copálico foi o único encontrado em todos os óleos analisados. Por esta razão, este diterpeno ácido pode ser usado como biomarcador de óleos de copaíba (VEIGA-JUNIOR *et. al.*, 1997).

Vários dos compostos já isolados ou detectados nos óleos de copaíba já tiveram propriedades farmacológicas, descritas na literatura. O ácido caurenóico é descrito na literatura como tripanossomicida, atividade conferida também a óleos de copaíba que não contêm este diterpeno (VEIGA-JUNIOR *et. al.*, 2002). Estudos realizados com ácido caurenóico isolado de *Copaifera langsdorfii* mostram também atividade relaxante do músculo liso, sobre contrações uterinas induzidas (CUNHA *et. al.*, 2002).

Paiva e colaboradores em 2003 mostrou a redução nos danos da mucosa em cólon de ratos induzida por ácido acético após administração do ácido caurenóico isolado de

C.langsdorffii na dose de 100mg/kg tendo maior inibição quando administrado por via retal.

Em 2009 LIM e colaboradores demonstrou a ação deste ácido isolado de *Aralia continentalis* que reduziu a produção de NO e PGE`s também demonstrada por Veiga Junior (2007) para a óleo-resina de três espécies de *Copaifera*.

Apesar da extensa literatura sobre óleos de copaíba, poucas referências discriminam a espécie de *Copaifera* que está sendo estudada. Somente 5 espécies têm sua composição química descrita na literatura. Muitos artigos não definem o local da coleta do óleo e outros citam locais onde a espécie não é endêmica. As espécies de *Copaifera* estudadas com identificação botânica, de acordo com sua localização, são: *C. multijuga* Hayne, abundante na região Amazônica, *C. langsdorffii* Desf., encontrada na região do cerrado, no nordeste, centro-oeste e sudeste brasileiro, *C. cearensis* Huber ex Ducke, nordeste brasileiro e *C. officinalis* L. e *C. reticulata* Ducke encontradas ao norte da Amazônia ocidental na região que se estende até a Venezuela (VEIGA JUNIOR *et. al.*, 2002)

2.4 *Copaifera glycyarpa* (DUCKE 1930)

As plantas da espécie *Copaifera glycyarpa* são árvores de 20-35 m de altura encontrada apenas no Brasil na região central da Amazônia brasileira até sudoeste e sul dessa região; foi encontrada no sudoeste do Pará, leste do Amazonas e noroeste de Mato Grosso e habita as matas de terra firme (MARTINS DA SILVA *et. al.*, 2008) (**Figura 8**).

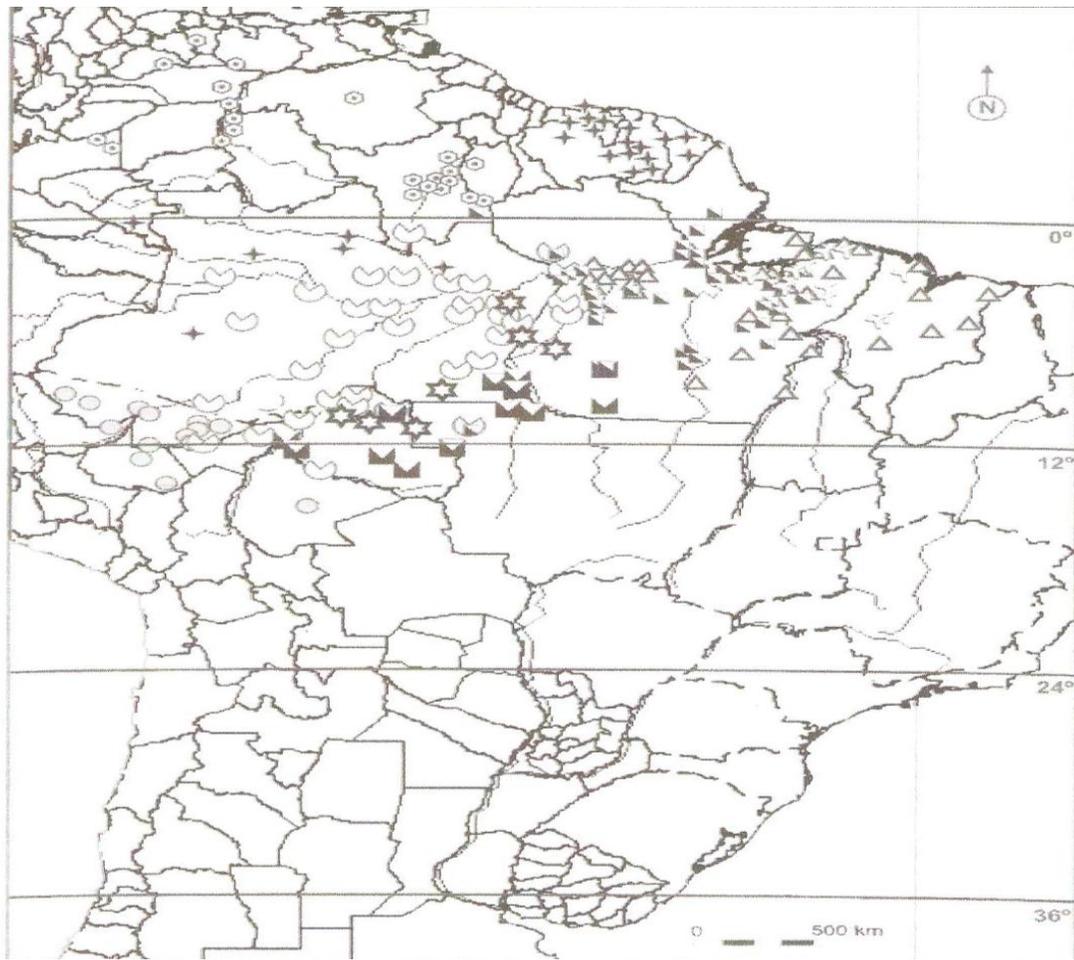


Figura 8. Distribuição geográfica de *C.glycyarpa* no Território Amazônico ☼

Destaca-se por apresentar tricomas na face abaxial da lâmina do folíolo, ovário sésstil e fruto globoso com ápulo rudimentar. Entretanto, devido ao relativamente grande número de folíolos e ao ovário totalmente hirsuto, *C. glycyarpa* é afim de *C. multijuga*, sendo ambas as únicas, na Amazônia, que possuem o ovário totalmente hirsuto. Porém, *C. glycyarpa* difere por apresentar folíolos simétricos, retos e opostos, bem como ovário sésstil e fruto globoso (MARTINS DA SILVA *et. al*, 2008). Os detalhes da folha, folíolo, tricomas, brácteas, bractéolas e gineceu foram ilustradas na **figura 9**.

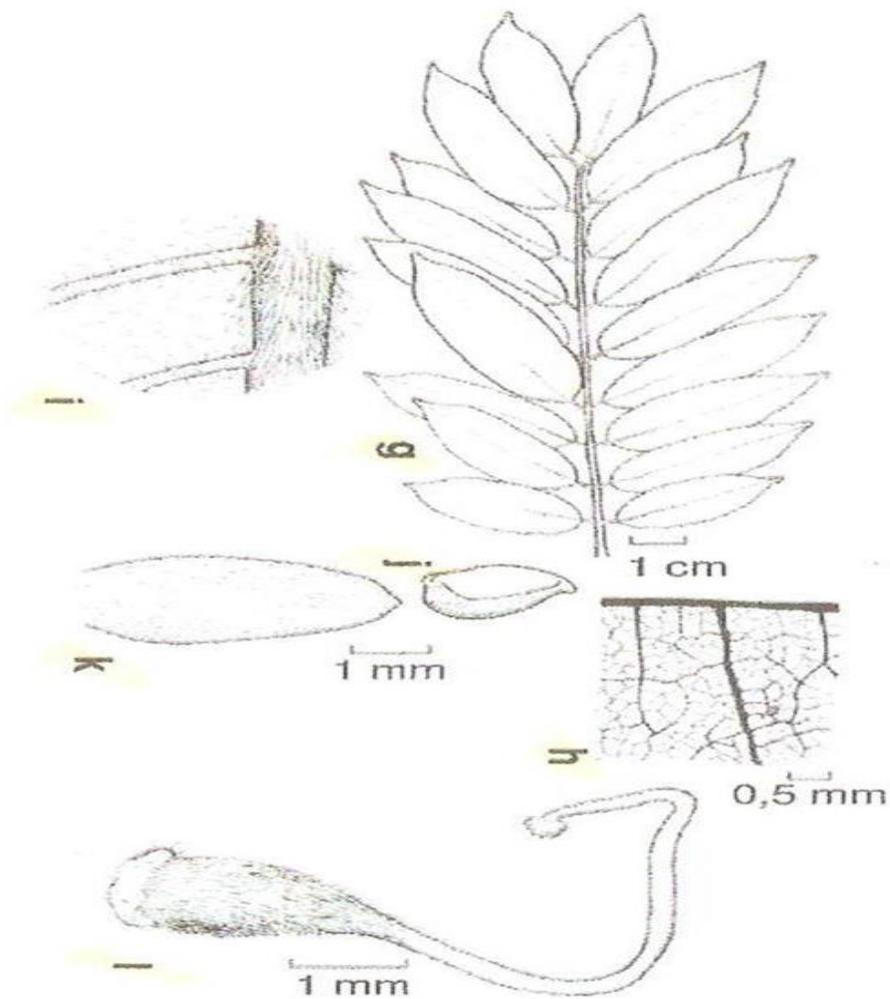


Figura 9. Detalhes da folha, folíolo, tricomas, brácteas, bractéolas e gineceu de *C.glycyarpa* g-l. *C.glycyarpa* – g.folha; h.detalhe do folíolo evidenciando venação congesta; i.detalhe do folíolo evidenciando tricomas na face abaxial da lâmina; j.bractéola; k.bráctea; l.gineceu - *Rodriguesia* 59(3) 455-476, 2008.

Alguns pesquisadores comentam que apesar de inúmeros estudos sobre as óleos-resina de *Copaifera*, abordando as diversas aplicações, muitos dados sobre a composição química e atividade farmacológica são contraditórios. Além disto, poucos são os artigos nos quais é encontrada a identificação botânica da espécie estudada e onde freqüentemente os óleos são misturados e adulterados ou ainda coletados de espécimes de idades e locais distintos (VEIGA JUNIOR, *et.al.*, 2002 ; TAPPIN, *et.al.*, 2004; CASCON, *et.al.*, 2004 e MARTINS-DA-SILVA, *et.al.*, 2008). Através da pressão regulatória para se desenvolver

produtos dentro de estritos padrões sanitários, alguns esforços vem sendo direcionados na tentativa de se manter uma relação entre composição química mínima e ensaios farmacológicos para que o efeito desejável seja mantido e, nesta relação repousa a confiança do consumidor na eficácia do produto.(DI STASI, 2007). VEIGA JR. & PINTO (2002), em uma vasta revisão de literatura, encontraram 72 sesquiterpenos diferentes e 27 ácidos diterpenos, como por exemplo, o ácido caurenóico, β -caurenóico e polialtato (VIEIRA *et al.*, 2008).

Recentemente SOUZA (2010) realizou o estudo fitoquímico da espécie encontrando os sesquiterpenos: d-Elemeno, a-Cubebeno , Cyclosativieno, a-Copaeno , b-Elemeno ,*Trans*-b-caryophylleno ,a-Bergamopteno ,a-Guaieno, *Trans*-b-farneseno, a-Humuleno, g-Gurjuneno, b-Selineno, B-Bisaboleno, b-Sesquifelandreneo, *Cis*-a-Bisaboleno, óxido de Cariofileno , isolando diterpênos com importantes atividades biológicas como os ácidos caurenóico e poliáltico (**Tabela 2**).

Tabela 2. *Composição Química da óleo-resina de C. glycyarpa (Ducke) por GC-MS (Gas Chromatography-Mass Spect (adaptado de Souza, et. al., 2010).*

Diterpenos	Percentual dos compostos (%)	Tempo de Retenção(s)
Metil-caurenoato	0.98	25.656
Metil-polialtato	19.73	26.082
Metil- copalato	0.38	28.338

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Validar a eficácia da utilização popular da óleo-resina (OR) de *Copaifera glycyarpa* através do uso de métodos farmacológicos *in vivo*, tendo como objetivos investigar as atividades antinociceptiva e anti-inflamatória desta óleo-resina extraída de *Copaifera*

glyycarpa e de dois compostos diterpenóides isolados (ácido caurenóico e ácido poliáltico), determinando os possíveis mecanismos de ação envolvidos com essas atividades.

3.2 Específicos

- Determinar a atividade antinociceptiva periférica da OR através de métodos como o das contorções abdominais, formalina e retirada de cauda.
- Determinar os mecanismos envolvidos nesta atividade antinociceptiva da OR através dos métodos da formalina e da retirada de cauda.
- Determinar a atividade anti-inflamatória da OR através dos métodos do edema de orelha e da pleurisia.
- Determinar a atividade anti-inflamatória dos compostos isolados da OR através do método da pleurisia de modo a contribuir para a elucidação do mecanismo de ação da OR da *C. glyycarpa*.
- Determinar a potencial atividade da OR sobre o sistema nervoso central através de métodos como o do campo aberto e da suspensão pela cauda.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) da linhagem SW55 (SwissWebster), machos adultos pesando entre 25-35 gramas (**Figura 12**) fornecidos pelo biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal Rural do Rio Janeiro.

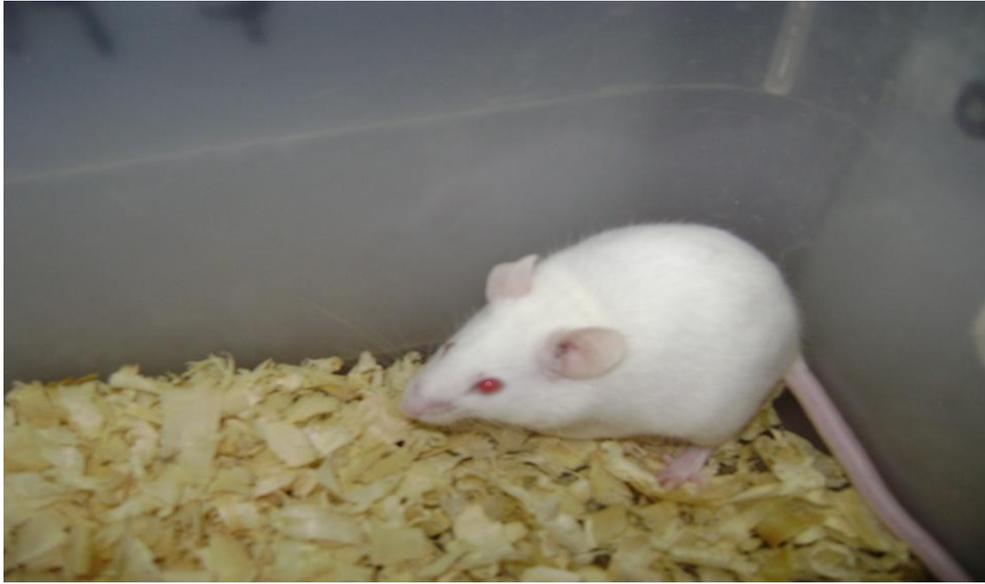


Figura 10. Camundongos (*Mus musculus*), linhagem SW55 (SwissWebster). Extraído de : acervo pessoal

Os animais foram mantidos sob iluminação controlada em um ciclo claro/escuro de 12/12h e com regime de água e ração *ad libitum*. Todos os experimentos foram realizados seguindo as normas que envolvem cuidados com animais de laboratório e normas éticas para seu uso em experimentos que envolvem dor (ZIMMERMANN,1983). Doze horas antes de cada experimento os animais recebem apenas água para evitar interferência na absorção das substâncias.

Os animais utilizados nos diferentes métodos nos caso de morte tiveram seus cadáveres armazenados em freezer para posterior encaminhamento, visando à incineração. Os animais sobreviventes pós avaliações experimentais não foram reutilizados e eutanasiados por exposição ao CO₂ e em seguida se procedeu de acordo com o descrito acima para os casos de morte. Esta metodologia foi submetida e aprovada pela Comissão de Ética na Pesquisa , sob o protocolo n 001267/COMEP, da Universidade Federal Rural Do Rio de Janeiro.

4.2 Material Botânico

A *C. glycyarpa* identificada por Ducke em 1930 possui nome vulgar: “Copaíba cuiarana” tem sua publicação original nos arquivos do Jardim Botânico do Rio de Janeiro 5:128-129.1930. Exsicata depositada sob n° 20218 (**Figura 11**).



Figura 11. Exsicata de *C.glycyarpa*, espécie original depositada no herbário do Jardim Botânico do Rio de Janeiro.

A óleo-resina de *C.glycyarpa* foi coletada pelo pesquisador Pierre André de Souza do Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro em junho de 2006, reserva da Nação Indígena Kamayurá Parque Nacional do Xingu – Estado do Mato Grosso, Brasil. A espécie foi identificada no Departamento de Botânica da Universidade Federal do Mato Grosso, onde a espécie foi depositada na exsicata de identificação (HUFMT 15.510).

4.3 Obtenção dos isolados

Para a obtenção dos compostos isolados da *C. glycyarpa* foi utilizada a cromatografia de contra-corrente (CCC) que é uma técnica rápida e eficiente que evita uma possível degradação dos constituintes durante o processo, útil no isolamento de produtos

naturais biologicamente ativos. Este método é utilizado principalmente em nível de preparação, mais especificamente, a cromatografia contracorrente de alta velocidade (“HSCCC: high-speed counter-current chromatography”), atualmente, é o mais utilizado para isolamento e purificação de diversas classes de substâncias naturais tais como saponinas de esteróides e triterpenos, flavonóides, alcalóides dentre outras classes.

Como o óleo de copaíba é uma mistura complexa de diversos compostos de baixa a média polaridades, foi utilizado um sistema não-aquoso de solvente para análise por HSCCC acoplado a um detector de massa (GC-MS), Mod. 2010S que permitiu o isolamento de 0.98% do ácido caurenóico (ácido Kaur-16-en-18-oic) e 19.73% do ácido poliáltico contidos na óleo-resina de acordo com o tempo de retenção. As estruturas foram confirmadas através da comparação por GC/MS com base na literatura (SOUZA *et.al.*, 2010). Segundo SOUZA, o uso dessa técnica cromatográfica foi apresentada pela primeira vez como promissora no isolamento de compostos diterpênicos dessa óleo-resina e após isolamento e confirmação das estruturas foi feita avaliação da capacidade de inibição do efluxo de rodamina 6G em *Saccharomyces cerevisiae* com a enzima Pdr5p (proteína que confere resistência múltipla a drogas), com os diterpenos isolados dessa óleo-resina e em conclusão o ácido caurenóico foi apresentado como um potencial protótipo de novos inibidores de proteínas carreadoras capazes de conferir resistência múltipla a drogas (Figuras 12).

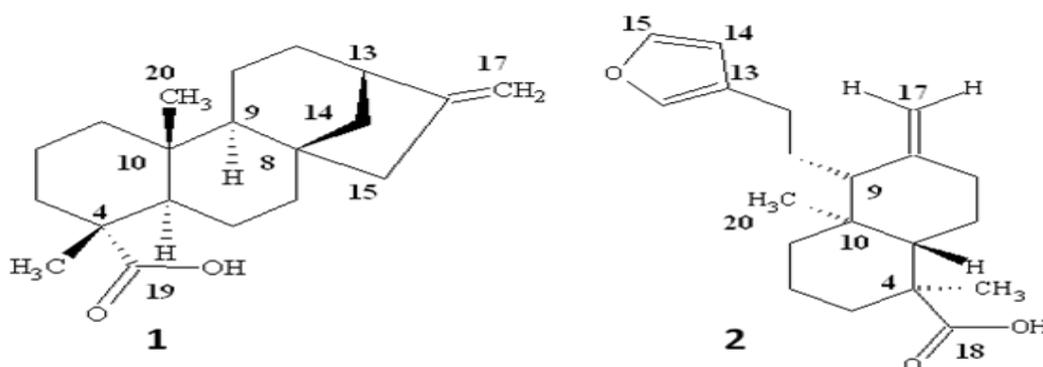


Figura 12. Ilustração da estrutura química dos 2 diterpenos isolados da óleo-esina de *C.glucycarpa* 1. ácido caurenóico; 2. ácido poliáltico . Extraído de Souza *et.al.* 2010.

4.4 Fármacos, Reagentes e Solventes

Óleo-resina de *C. glycyarpa* diluído em Tween 1%; indometacina diluída em solução de bicarbonato 6% e carragenina (Sigma Chemical Co., St.Louis, MO, USA) diluída em salina estéril; Dexametasona (Decadron[®], Ache Lab. Farm., São Paulo, Brasil) diluída em solução salina (NaCl 0,9%) água destilada, solução salina 0,9%, formaldeído 2,5% v/v diluída em solução salina, éter, solução de PBS, Solução de turk, heparina, Tween[®] 80 (Sigma Chemical Co., St Louis, USA) Fentanil 50ug/mL diluído em solução salina (0,3 mg/kg) ou morfina (Dimorf[®], Cristália, São Paulo – Brasil), naloxona 1 mg/Kg diluído em solução salina; ácido acético 1.2% v/v diluído em solução salina ; óleo de cróton/acetona 2,5% v/v ; p-Cloro-fenilalanina (PCPA, Sigma Chemical Co., St.Louis, USA).

4.5 Métodos de Avaliação da Atividade Antinociceptiva Periférica

4.5.1 Método das Contorções abdominais induzidas por ácido acético 1.2% (“Abdominal Writhings”)

O modelo das contorções abdominais descrito por Koster e colaboradores (1959) baseia-se na contagem das contrações na parede abdominal seguida de torção do tronco e extensão dos membros posteriores produzidas como resposta reflexa a irritação peritoneal, amplamente utilizado na pesquisa de novos fármacos com ação analgésica e anti-inflamatória. Os camundongos foram distribuídos em 8 grupos experimentais (n=6/grupo), os quais foram tratados por via oral (gavagem, p.o, *per os*), como descrito a seguir: solução salina (NaCl 0,9%), tween 1 % (veículo de diluição da OR), utilizando 0,01mL/g de animal controles negativos, indometacina 10 mg/kg (controle positivo) e OR de *C. glycyarpa* nas doses de 10, 30, 100, 300 e 1000 mg/kg. Uma hora após os tratamentos, foi injetado ácido acético 1,2 % diluído em NaCl 0,9% por via intraperitoneal (*i.p*). A seguir os animais foram colocados em caixas de vidro espelhadas e individuais, medindo 16 cm de largura, 24,3 cm de comprimento e 15 cm de altura de vidro, sendo efetuada a contagem das contorções abdominais acumuladas (c.a.a) durante os 30 minutos subsequentes.

4.5.2 Método da Dor induzida pela formalina (“Formalin Test”)

Os camundongos foram agrupados (n=6/grupo) e tratados por via oral (p.o), constituindo os seguintes grupos experimentais: solução salina (NaCl 0,9%) e tween 1% (0,01mL/g de animal, controles negativos), indometacina 10 mg/kg (controle positivo) e a OR nas doses de 100, 300 e 1000 mg/kg. Uma hora após os tratamentos foi injetada por via intraplantar (*i.pl.*) 20 uL de formalina 2.5% v/v no membro posterior direito de todos os animais.

Após a injeção intraplantar de formalina, os camundongos são colocados em caixas de vidro espelhadas e individuais, medindo 16 cm de largura 24,3 cm de comprimento e 15 cm de altura de vidro, para facilitar a observação do comportamento nociceptivo de lambrer, morder ou sacudir a pata (DUBISSON; DENNIS,1977). Foi então avaliado o tempo de reação à nocicepção/dor (em segundos) nos dois períodos em que esta se manifesta. Nos primeiros 5 minutos após a injeção da formalina temos a primeira fase (dor neurogênica) e a seguir segunda fase ocorre entre 15 e 30 minutos após a injeção da formalina (HUNSKAAR; HOLE, 1987). A primeira fase representando a resposta ao estímulo nociceptivo químico direto e a segunda e última a resposta tônica à dor, acompanhada de uma resposta inflamatória relacionada à liberação de mediadores químicos inflamatórios. Para a avaliação da participação do sistema opióide foi realizada a administração de fentanil 0,3 mg/kg (agonista opióide não-seletivo) por via subcutânea (*s.c*), naloxona 1mg/kg (antagonista opióide não-seletivo, *i.p*), e a OR 300mg/kg *v.o*.

4.5.3 Método da Retirada da cauda (“Tail-flick Test”)

Neste método descrito por Lindneer and Vogel (1963) utiliza-se um analgesímetro térmico modelo 7360 V-115 (Ugo - Basile, ITALY) na avaliação da atividade antinociceptiva de fármacos de ação central (infra-espinhal) por meio de uma fonte radiante de luz infravermelha na região ventral do 1/3 médio da cauda e após o correto posicionamento sobre a fonte de luz com potência previamente estabelecida em 50 Watts,

foi acionada juntamente com o cronômetro eletrônico até que o animal retirasse a cauda (tempo de reação), momento no qual a fonte de luz e relógio paravam automaticamente. Os camundongos foram colocados em contentores para evitar o estresse da manipulação, esperando-se um período de adaptação de 10 minutos antes de medir-se a reatividade ao calor. Em caso de analgesia intensa, a incidência do raio é interrompida com no máximo 20 segundos, medindo-se o tempo de reação 30 minutos antes (tempo -30), imediatamente após o tratamento com as substâncias teste (tempo 0) e após 30, 60, 90 e 120 minutos dos tratamentos. No tempo 0, os animais foram tratados por via oral (p.o) através de gavagem sendo divididos nos seguintes grupos experimentais: solução salina (NaCl 0,9%), tween 1% (0,01 mL/g – controles negativos), fentanil 0,3 mg/kg *s.c* (controle positivo) e OR nas doses de 30, 100, 300 e 1000 mg/kg. Para avaliarmos a participação do sistema serotoninérgico no efeito antinociceptivo da OR 300mg/kg camundongos foram pré-tratados com PCPA 100mg/kg *i.p* (inibidor da enzima triptofano hidroxilase) por 3 dias consecutivos(HESS *et. al.*, 2010).

4.6 Métodos de Avaliação da Atividade Anti-inflamatória

4.6.1 Método do Edema de orelha induzido por óleo de cróton (“Ear Edema Test”)

Este modelo descrito por Schiantarelli e colaboradores (1982) é utilizado na pesquisa da atividade de agentes anti-inflamatórios de uso tópico, mas também responde à administração sistêmica de anti-inflamatórios esteroidais e não esteroidais. Neste caso , os camundongos foram divididos em 8 grupos experimentais (n=6/grupo) foram tratados por via oral (p.o) constituindo os seguintes grupos tratados: solução Salina (NaCl 0,9%), tween 1% (0,01 mg/mL - controles negativos), dexametasona 2 mg/kg (*s.c*, controle positivo) e OR nas doses de 10, 30, 100 , 300 e 1000 mg/kg. Uma hora após os tratamentos foi feita a aplicação do óleo de cróton/acetona a 2,5% v/v tópico na orelha esquerda e apenas acetona (veículo) na orelha direita. Decorridas 4 horas da aplicação, para que pudesse observar a formação do edema ou a inibição do mesmo com o tratamento, os animais foram eutanasiados. Foi feita a remoção de uma pedaço de 6 mm de diâmetro das orelhas direita e

esquerda que foram então pesados e a seguir determinada a diferença de peso entre as orelhas (Δ de peso = peso OE (mg) – peso OD (mg)), sendo os resultados expressos como média erro padrão da média (E.P.M.).

4.6.2 Método da Pleurisia induzida por carragenina 1% (“Pleurisy Induced by Carrageenan”)

A pleurisia induzida em camundongos pela injeção intra-pleural de carragenina é um modelo de inflamação aguda amplamente utilizado na pesquisa de drogas antiinflamatórias. Isso ocorre porque é possível medir no exsudato formado na cavidade pleural, a quantidade de leucócitos migrados para a área, bem como os mediadores inflamatórios liberados com o estímulo lesivo. Além disso, esse modelo é sensível à ação de antiinflamatórios esteroidais e não-esteroidais. Os animais são tratados com o composto de estudo (óleo-resina), os isolados desta óleo-resina; ácido caurenóico 20mg/kg e poliáltico 10mg/kg *v.o* e os controles (solução Salina (NaCl 0,9%), DMSO 0,1% dexametasona 2 mg/kg) administrados 1 hora antes do estímulo lesivo. Após 4 horas, os animais são eutanasiados e segue com abertura e lavagem da cavidade torácica. Após a lavagem, o líquido recolhido (exsudato) é depositado em eppendorf e imerso em gelo. A contagem de leucócitos totais feita em câmara de Neubauer, sob microscopia óptica. (COSTA *et. al.*, 2006).

4.7 Método de Avaliação da Atividade locomotora e sobre sistema nervoso central

4.7.1 Método do Campo aberto (“Open-Field”)

Este método permite avaliar atividade estimulante ou depressora do sistema nervoso central provocada pela óleo-resina. Este ensaio farmacológico foi realizado em uma caixa de acrílico com paredes transparentes medindo 30 cm de largura 30 cm de comprimento e 15 cm de altura e base preta, dividida em nove quadrados iguais. O campo aberto é usado para avaliar a atividade exploratória dos animais e para tanto os camundongos foram tratados por via oral (*p.o*) com : solução salina (NaCl 0,9%) e tween 1% (0,01mL/g - controles negativos), diazepam 1 mg/kg controle positivo) *i.p* e OR 300 mg/kg .

Decorridos 60 minutos do tratamento, os animais foram observados por 5 minutos, sendo avaliados os seguintes parâmetros: distância total percorrida, tempo total de permanência no quadrante central (atividade ansiolítica ou sedativa), rearing (apoiar-se nas patas traseiras), grooming (auto-limpeza), o tempo que permanece parado (imobilidade = sedação ou medo) e número de bolos fecais (emocionalidade). A tendência natural do animal em um novo ambiente é a de explorá-lo, apesar do conflito com o medo provocado por este novo ambiente (MONTGOMERY, 1955).

4.7.2 Método da Suspensão pela Cauda

O procedimento consiste em suspender os animais pela cauda, por um período de 5 min sendo registrado o tempo total de imobilidade, em segundos. Por 3 dias consecutivos os animais foram tratados com PCPA que aumenta o tempo de imobilidade neste teste contribuindo para avaliar um possível mecanismo anti-depressivo ou depressor da OR sobre o SNC. Os camundongos pré-tratados via oral com solução salina (NaCl 0,9%) e tween 1% (controles negativos), PCPA 100 mg/kg *i.p* (controle positivo) e a OR na dose de 300 mg/kg (*v.o*) e a seguir foram suspensos por suas caudas 1h após o tratamento e observados um a um durante 5 min. Foi medido então o tempo total de imobilidade (STERU, 1985).

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística dos resultados experimentais foi utilizado o programa GraphPad Prism versão 5.0 for Windows, GraphPad Software, San Diego Califórnia USA, com a comparação entre os diferentes grupos experimentais determinada pela ANOVA-ONE_WAY com pós-teste de Tukey. Sendo os resultados expressos como média aritmética \pm erro padrão da média (E.P.M) e considerando-se como estatisticamente significativos os resultados dos grupos tratados com OR que mostraram diferenças dos grupos controle com valor de $P < 0.05$.

6. RESULTADOS

6.1 Avaliação da Atividade Antinociceptiva Periférica

6.1.1 Contorções Abdominais induzidas por ácido acético 1,2%

Após o pré-tratamento (*p.o*) dos grupos experimentais (n=6) com a OR nas doses de 10, 30, 100, 300 e 1000 mg/kg, indometacina (10 mg/kg), observou-se redução dose dependente do número de contorções abdominais acumuladas (c.a.a) de 19,14 % ($43,67 \pm 2,30$ c.a.a), 20,37 % ($43,00 \pm 3,35$ c.a.a), 54,32 % ($24,67 \pm 2,09$ c.a.a), 61,11 % ($21,00 \pm 1,46$ c.a.a), 70,99 % ($15,67 \pm 1,31$ c.a.a) e 46,50 % ($19,50 \pm 1,65$ c.a.a) respectivamente, quando comparado ao grupo controle veículo tween 1% ($50,00 \pm 0,77$ c.a.a). Nossos resultados permitiram a construção de uma curva dose-resposta e a consequente determinação da DI_{50} para a OR da *C. glyycarpa* que foi calculada apresentando um valor de 145,24 mg/kg (Tabela 2 e Figura 10 e 11). Estes resultados demonstraram ainda que esta atividade antinociceptiva mostrou-se dependente da dose uma vez que observamos uma diferença estatisticamente significativa entre as doses da OR neste método. (Tabela 3 , Figuras 13 e 14).

Tabela 3. Influência do pré-tratamento com a OR nas doses de 10-1000 mg/kg sobre o número de contorções no teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético. Os valores * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ representam os níveis de significância estatística quando comparados os grupos indometacina e seus respectivos controles salina e tween 1%.

Tratamentos	Número de Contorções	% dos controles	% de inibição
Salina	$54,00 \pm 1,033$	$108,000 \pm 1,033$	--
Tween 1%	$50,00 \pm 0,7746$	$100,000 \pm 0,7746$	--
Indometacina 10 mg/kg	$19,50 \pm 1,648$	$39,000 \pm 1,648$	$46,50 \pm 5,21$ ***
OR 10 mg/kg	$43,67 \pm 2,305$	$87,340 \pm 2,305$	$19,14 \pm 4,27$ *
OR 30 mg/kg	$43,00 \pm 3,347$	$86,000 \pm 3,347$	$20,37 \pm 6,20$ *
OR 100 mg/kg	$24,67 \pm 2,092$	$49,340 \pm 2,092$	$54,32 \pm 3,87$ ***

OR 300mg/Kg	21,00 ±1,461	42,000±1,461	61,11 ±2,70***
OR 1000mg/Kg	15,67±1,308	31,340±1,308	70,99 ±2,42***

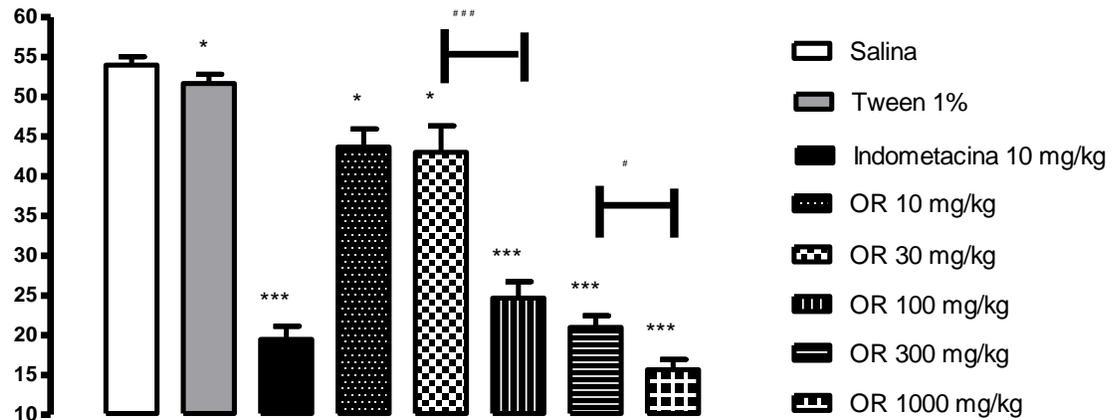


Figura 13. Efeitos da OR da *C. glycyarpa* sobre o número de contorções abdominais induzidas pó ácido acético acumuladas em 30 minutos. As barras verticais representam as médias ± E.P.M. Os valores * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ representam os níveis de significância estatística quando comparados os grupos indometacina e seus respectivos controles salina e tween 1% (ANOVA One-Way, com pós- teste de tukey). Os valores # $p < 0,05$ e ### $p < 0,001$ representam o nível de significância estatística quando a comparação foi feita entre as doses.

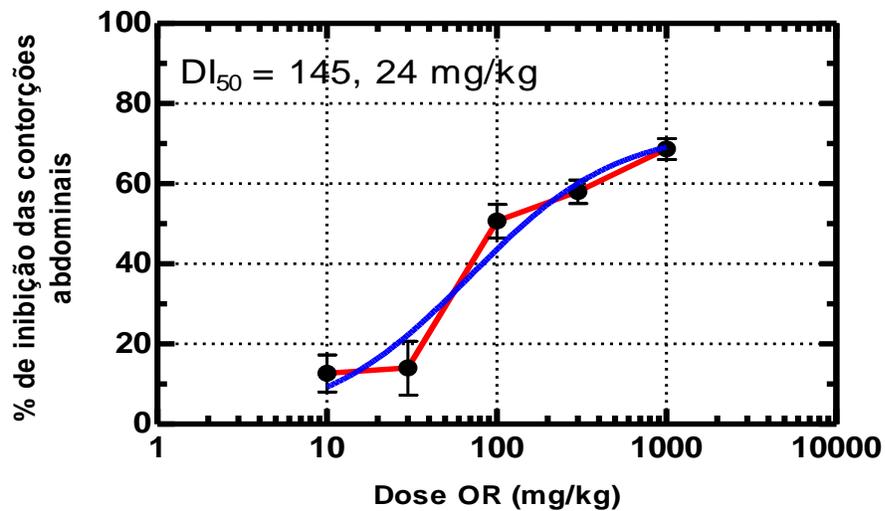


Figura 14. Curva dose-resposta para o efeito antinociceptivo da OR de *C. glycyarpa* em difeentes concentrações (10-1000mg/kg). O efeito está representado como % de inibição das contorções abdominais versus dose da OR em relação a média do grupo veículo tween 1%. Os valores estão expressos como média

E.P.M.. curva em vermelho (---) representa a curva experimental enquanto que curva em azul (---) representa a curva teórica utilizada para determinação da DI_{50} cujo valor determinado experimentalmente foi de 145,24mg/kg.

6.1.2 Método da Dor induzida por Formalina 2,5%

Foram avaliadas as fases da dor neurogênica (Fase 1) e dor inflamatória (Fase 2). Os resultados na fase 1, mostraram que os animais pré-tratados (n=6/grupo) com a OR de 100, 300, 1000 mg/kg apresentaram redução do tempo de reatividade (segundos) de 28,25 % ($143,00 \pm 5,09$ segundos, $p < 0,001$), 40,54 % ($118,50 \pm 9,65$ segundos, $p < 0,001$) e 42,30 % ($115,00 \pm 13,17$ segundos, $p < 0,001$) respectivamente, quando comparados ao grupo controle negativo Tween 1% ($199,30 \pm 3,80$ segundos). Por outro lado, o grupo controle positivo Indometacina ($199,20 \pm 15,16$ segundos) não foi capaz de causar modificação na fase 1 deste método se comparado seu grupo controle negativo salina ($215,2 \pm 6,57$ segundos) (**Tabela 4 e Figura 15**).

Tabela 4. Influência do pré-tratamento com a OR nas doses 100 -1000 mg/kg sobre o tempo de reatividade (segundos) dos animais, na primeira fase do teste da formalina. Os valores *** $p < 0,001$ representam os níveis de significância estatística quando comparados os grupos indometacina e OR com seus respectivos controles salina e tween 1%.

Tratamentos	Dose (mg/Kg)	Reatividade (segundos)	% Inibição
Salina	-	$215,2 \pm 6,570$	-
Tween 1%	-	$199,3 \pm 3,801$	-
Indometacina	10 mg/Kg	$199,2 \pm 15,16$	-
	100 mg/Kg	$143,0 \pm 5,086$	$28,25 \pm 2,552$ (***)
	300 mg/Kg	$118,5 \pm 9,650$	$40,54 \pm 4,842$ (***)

OR	1000 mg/Kg	115,0 ± 13,17	42,30 ± 6,607 (***)
----	------------	---------------	------------------------

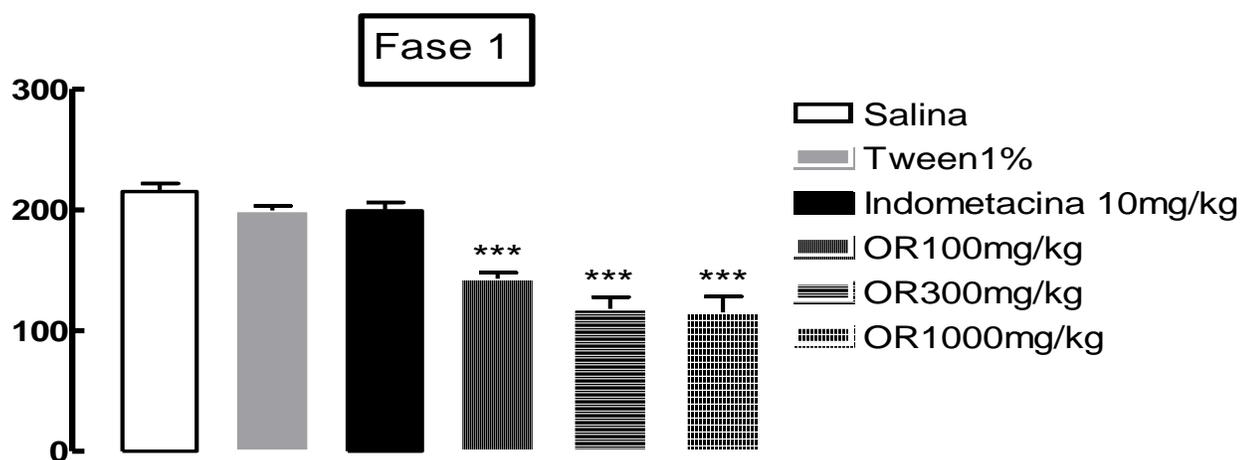


Figura 15. Efeito de diferentes doses da OR da *C.glycyarpa* sobre o tempo de reatividade (segundos) dos animais na 1 fase do teste da formalina. Os valores *** $p < 0,001$ representam os níveis de significância estatística quando comparados os grupos indometacina e seus respectivos controles salina e tween 1% (ANOVA One-Way, com pós- teste de tukey).

Na fase 2, o pré-tratamento dos animais com OR nas doses de 100, 300 e 1000 mg/kg foi capaz de reduzir o tempo de reatividade (segundos) em 33,70 % (294.50 ± 38.46 segundos $p < 0,05$), 55,24 % (198.80 ± 21.44 segundos, $p < 0,001$) e 69,01% (137.7 ± 34.97 segundos, $p < 0,01$) respectivamente em comparação com o grupo controle negativo tween 1 % (444.20 ± 14.87 segundos). O controle positivo indometacina 10mg/kg foi capaz de reduzir o tempo de reatividade em 63,70 % ($176,30 \pm 43,35$ segundos) se comparado ao seu controle negativo o grupo salina ($486,0 \pm 16.88$ segundos) . Estes resultados permitiram a construção de uma curva dose-resposta antinociceptiva foi determinada obtendo-se o valor de $DI_{50\%}$ de 260,01 mg/kg (Tabela 5 e Figuras 16 e 17).

Tabela 5. Influência do pré-tratamento com a OR nas doses 100-1000 mg/kg sobre o tempo de reatividade (segundos) dos animais na segunda fase do teste da formalina. Os valores *** p<0,001 representam os níveis de significância estatística quando comparados os grupos indometacina e seus respectivos controles salina e tween 1%

Tratamentos	Dose (mg/Kg)	Reatividade (segundos)	% Inibição
Salina	-	486.0± 16.88	-
Tween 1%	-	444.2± 14.87	-
Indometacina	10 mg/Kg	176.3± 43.35	63,70± 43,35
OR	100 mg/Kg	294.5± 38.46	33,70 ± 8.658 (*)
	300 mg/Kg	198.8± 21.44	55,24 ± 4.826 (***)
	1000 mg/Kg	137.7± 34.97	69,01 ± 7.873 (***)

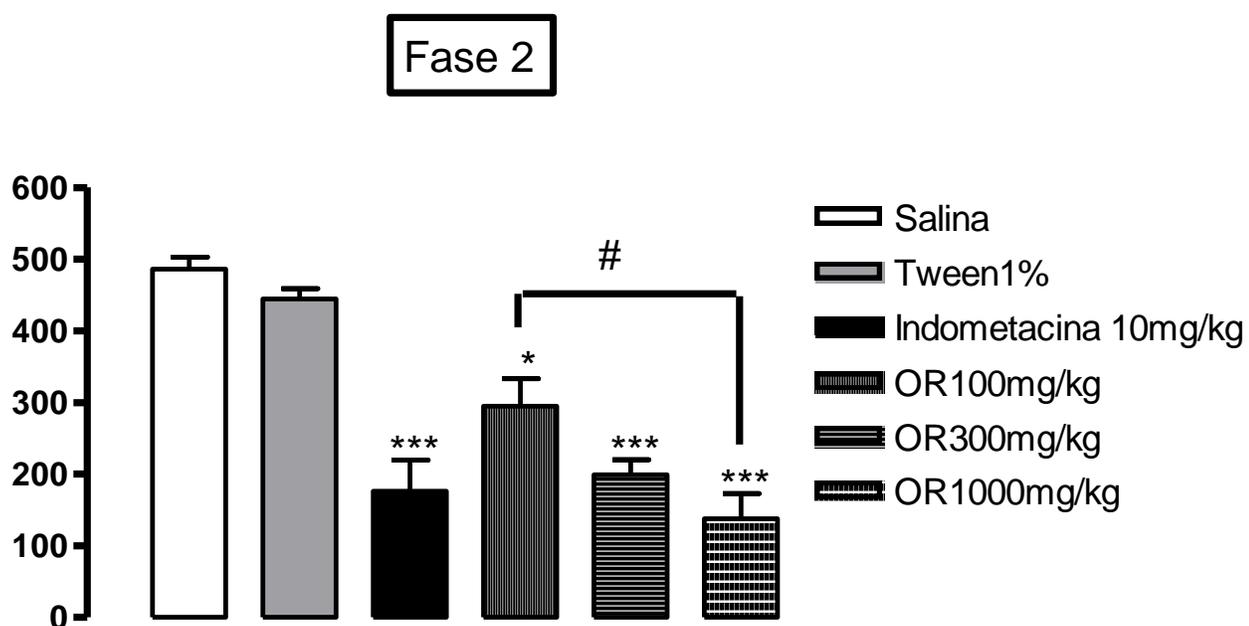


Figura 16. Tempo de reatividade (segundos) dos animais na segunda fase do teste da formalina. As colunas e barras verticais representam as médias o erro padrão em grupos experimentais de 6 animais. *** $p < 0,001$; * $P < 0,05$; # $p < 0,01$

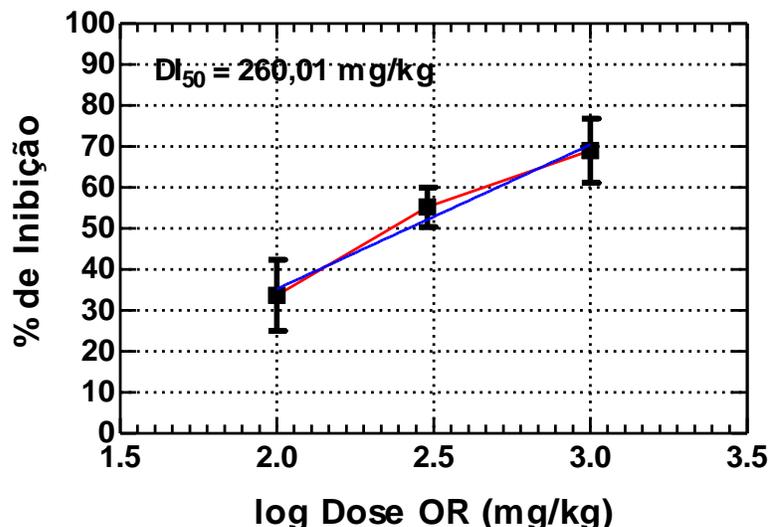


Figura 17. Curva dose resposta determinação da DI_{50} através da % de inibição versus log dose da óleo-resina da segunda fase no teste da formalina (n=6). A DI_{50} determinada graficamente possui o valor de 260,01 mg/kg.

A redução do tempo de reatividade nas fase 1 e 2 promovida pela OR, nos levou a investigar a possibilidade de inibição desta atividade antinociceptiva pelo pré tratamento com o antagonista opióide naloxona. Logo, executamos um prococolo no qual a um grupo tratado com OR 300 mg/kg foi prétratado com a naloxona 1 mg/kg. Os resultados experimentais mostraram que na fase 1, os animais pré-tratados com a OR 300mg/kg e o fentanil 0,3 mg/kg reduziram o do tempo de reatividade em 49,93 % ($103,00 \pm 18,33$ segundos) e 93,03 % ($14,33 \pm 1,50$ segundos) respectivamente e quando prétratadas com naloxona estes valores retornaram aos valores de 1,64 % ($204,20 \pm 12,04$ segundos) e 14,03 % ($176,80 \pm 8,90$ segundos) respectivamente. Os controles negativos, salina ($205,70 \pm 5,67$ segundos) e tween 1% ($206,7 \pm 8,044$ segundos), neste protocolo não apresentaram capacidade de modificar o tempo de reatividade dos animais (**Tabela 6 e Figura 18**).

Tabela 6. Influência do pré-tratamento com a OR na dose de 300mg/kg sobre o sistema opióide no tempo de reatividade (segundos) dos animais na primeira fase do teste da formalina utilizando fentanil (agonista opióide 0,3mg/kg *s.c*) e reversão pela naloxona (antagonista opióide 1mg/kg *i.p*). O valor de *** $p < 0,001$ representa o nível de significância estatística quando da comparação entre os grupos fentanil e OR e seus respectivos controles.

Tratamentos	Salina	Tween 1%	Fentanil 0,3mg/kg	Fentanil+ Naloxona 1 mg/kg	OR 300mg/kg+ Naloxona	OR 300mg/kg
Tempos de reatividade (média ± erro)	205,7±5,673	206,7±8,044	14,33±1,498	176,8±8,905	103,0±18,33	204,2±12,04
% de inibição	-	-	93,03±0,7283	14,03±4,329	1,637±4,864	49,93±8,909

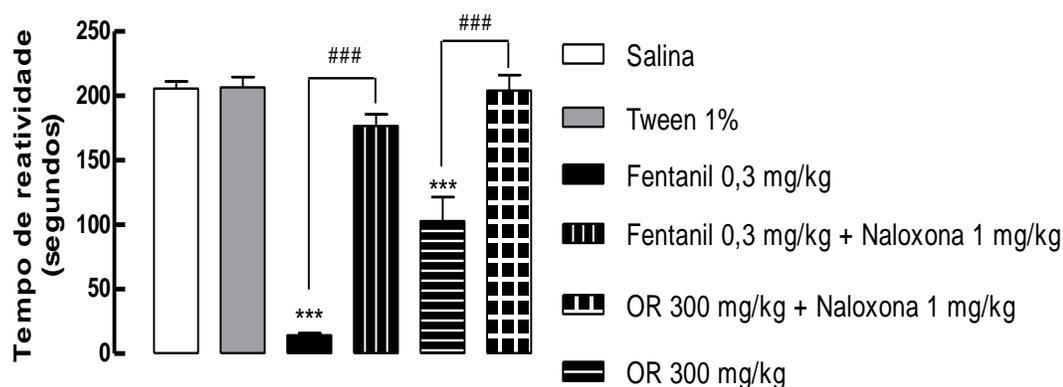


Figura 18. Tempo de reatividade (segundos) dos animais na Fase 1 do método da formalina. As colunas e barras verticais representam as médias ± e.p.m. (n=6). O símbolo * exprime o nível de significância estatística entre os grupos teste, sem pré-tratamento, em comparação com os seus controles *** $P < 0,001$ e o símbolo ### $P < 0,001$ exprime o nível de significância estatística entre os grupos pré-tratados precedidos ou não com naloxona.

Na Fase 2, os animais pré-tratados com a OR 300 mg/kg e fentanil 0,3 mg/kg reduziram significativamente o tempo de reatividade em 84,78 % ($56,00 \pm 23,55$ segundos) e 81,16 % ($69,33 \pm 12,80$ segundos) respectivamente, quando os animais não haviam sido pré-tratados com naloxona. Por outro lado, quando precedidos do tratamento com naloxona 1 mg/kg os pré-tratamentos com OR e fentanil apresentaram percentuais de redução de 63,99

% ($132,50 \pm 22,88$ segundos) e 15,35 % ($311,50 \pm 10,02$ segundos) respectivamente. Se comparados aos seus controles negativos respectivos tween 1 % ($206,70 \pm 8,04$ segundos) e salina ($368,00 \pm 10,15$ segundos) (**Tabela 7 e Figura 19**)

Tabela 7. Influência do pré-tratamento com a OR na dose de 300mg/kg sobre o sistema opióide no tempo de reatividade (segundos) dos animais na segunda fase do teste da formalina utilizando fentanil (agonista opióide 0,3mg/kg s.c) e reversão pela naloxona (antagonista opióide 1mg/kg i.p). O valor de *** $p < 0,001$ representa o nível de significância estatística quando da comparação entre os grupos fentanil e OR e seus respectivos controles.

Tratamentos	Salina	Tween 1%	Fentanil	Fentanil+ Naloxona	OR + Naloxona	OR
Tempos de reatividade (média \pm erro)	368,0 \pm 10,15	384,7 \pm 9,834	69,33 \pm 12,80	311,5 \pm 10,02	132,5 \pm 22,88	56,00 \pm 23,55
% de inibição	-	-	81,16 \pm 3,478	15,35 \pm 2,723	63,99 \pm 6,218	84,78 \pm 8,909

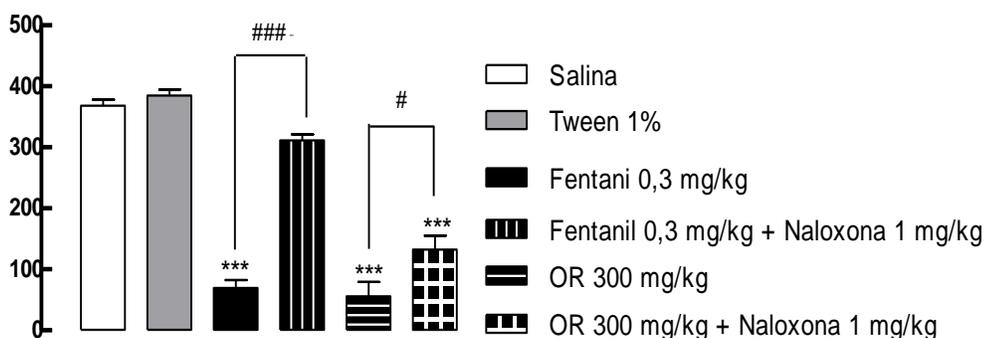


Figura 19. Tempo de reatividade (segundos) dos animais na Fase 2 do método da formalina. As colunas e barras verticais representam as médias \pm E.P.M.. mbolo *** $P < 0,001$ exprime o nível de significância estatística entre os grupos OR e fentanil e seus respectivos controles negativos, tween 1 % e salina. Os símbolos # $P < 0,05$ e ### $P < 0,001$ exprimem os níveis de significância entre os grupos tratados e não tratados com naloxona antes do pré-tratamento (n=6/grupo).

6.1.3 Método de Retirada da cauda

Após o pré-tratamento (*p.o*) de grupos de camundongos ($n = 6/\text{grupo}$) com a OR nas doses de 30, 100, 300 e 1000 mg/kg ou com o controle positivo fentanil (0,3mg/kg *s.c*) produzindo um aumento (17.800 ± 2.0230 segundos) após 30 minutos da administração do fentanil e observou-se aumento no tempo de reação dos animais quando aplicado estímulo térmico na cauda de (7.167 ± 0.2951) e (8.100 ± 0.5489) para as doses de 300 e 1000mg/Kg respectivamente, sendo o efeito observado aos 60 minutos aos administração da OR e este efeito permanece até o fim do experimento, não produzindo qualquer diferença estatística na dose de 30 ou 100 mg/kg quando comparado ao grupo controle veículo tween nos tempos avaliados.(**Tabela 8 e figura 20**)

Tabela 8. *Influência do pré-tratamento com OR (30-1000mg/kg) o tempo de retirada da cauda no teste de retirada da cauda (hiperalgesia térmica) O valor de *** $p < 0,001$ representa o nível de significância estatística quando da comparação entre os grupos fentanil e OR e seus respectivos controles.*

Tratamento	Tempo de Avaliação da Reatividade (minutos)/Tempo de Reação (segundos)					
	-30	0	30	60	90	120
Salina	$4,02 \pm 0,27$	$4,40 \pm 0,17$	$5,55 \pm 0,51$	$4,80 \pm 0,42$	$5,22 \pm 0,57$	$5,28 \pm 0,54$

Tween 1%	4,95±0,30	4,78±0,53	5,03±0,54	5,30±0,37	5,15±0,89	5,78±0,70
Fentanil 0,3mg/kg	4,45±0,30	5,28±0,36	17,80±2,08 (***)	9,62±1,17 (***)	5,68±0,90	5,90±0,69
OR 30mg/kg	3,80±0,18	4,23±0,22	4,38±0,51	5,01±0,31	5,33±0,23	5,68±0,35
OR 100mg/kg	3,82±0,23	4,50±0,21	4,42±0,32	5,82±0,45	5,62±0,19	5,38±0,14
OR 300mg/kg	4,05±0,19	3,68±0,28	4,03±0,35	7,17±0,30	6,98±0,27	6,83±0,11
OR1000mg/kg	3,75±0,18	3,97±0,45	3,58±0,26	8,10±0,55	7,98±0,29	7,62±0,24

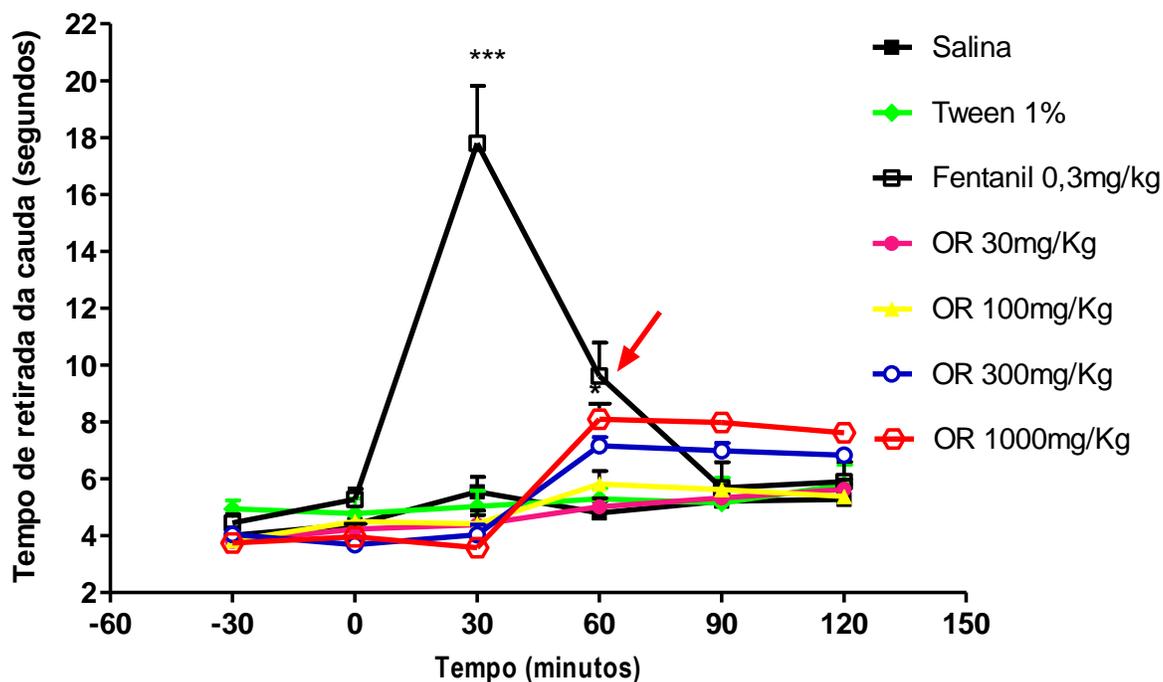


Figura 20. Influência do tratamento com OR (10-1000mg/Kg) sobre o tempo de retirada da cauda no teste de retirada da cauda. As barras verticais representam as médias E.P.M.. O valor de *** $p < 0,001$ representa o nível de significância estatística quando da comparação entre os grupos fentanil e OR e seus respectivos controles.

Ainda utilizando o teste da retirada de cauda e avaliado a possível contribuição da serotonina no mecanismo antinociceptivo da OR 300mg/Kg *v.o* quando administrado PCPA (inibidor da triptofano hidroxilase)100mg/Kg *i.p* por 3 dias consecutivos. Sabe-se que o PCPA diminui os significativamente os estoques de serotonina corticais e reverte o efeito de fármacos opióides como o fentanil. A OR mostrou ter efeito antinociceptivo aumentando o tempo de retirada da cauda frente ao estímulo térmico e quando administrada aos grupo pré tratado com PCPA revertendo o efeito hiperalgésico (**Figura 21**).

Tabela 9. Influência do pré-tratamento com OR (30-1000mg/kg) o tempo de retirada da cauda no teste de retirada da cauda (hiperalgesia térmica) e influência do PCPA sobre o efeito hiperalgésico. O valor de *** p<0,001 representa o nível de significância estatística quando da comparação entre os grupos fentanil e OR e seus respectivos controles.

Tratamento	Tempo de Avaliação da Reatividade (minutos)/Tempo de Reação (segundos)					
	-30	0	30	60	90	120
Salina	5,57 ± 0,19	5,33± 0,22	5,78 ± 0,18	4,80± 0,42	4,72 ± 0,36	4,96 ± 0,35

Tween 1%	4,95±0,30	4,78±0,53	4,53±0,59	4,51±0,37	4,65±0,66	4,78±0,25
Fentanil 0,3mg/kg	4,16±0,16	5,28±0,36	19,60±10,00 (***)	8,28±0,63 (***)	5,57±0,29	5,18±0,26
PCPA 100 mg/kg	3,13±0,37	3,37±0,44	3,05±0,39	3,17±0,317	3,35±0,28	3,30±0,15
Fentanil+ PCPA 100mg/kg	6,10±0,64	6,23±0,59	13,58±1,71 (***)	7,89±1,60	5,18±0,41	4,72±0,27
OR 300mg/kg	4,52±0,24	4,73±0,36	4,00±0,23	6,70±0,50	5,90±0,13	4,83±0,52
OR+PCPA 100mg/kg	3,60±0,20	4,02±0,42	3,70±0,26	8,48±0,41	7,62±0,53	6,20±0,20

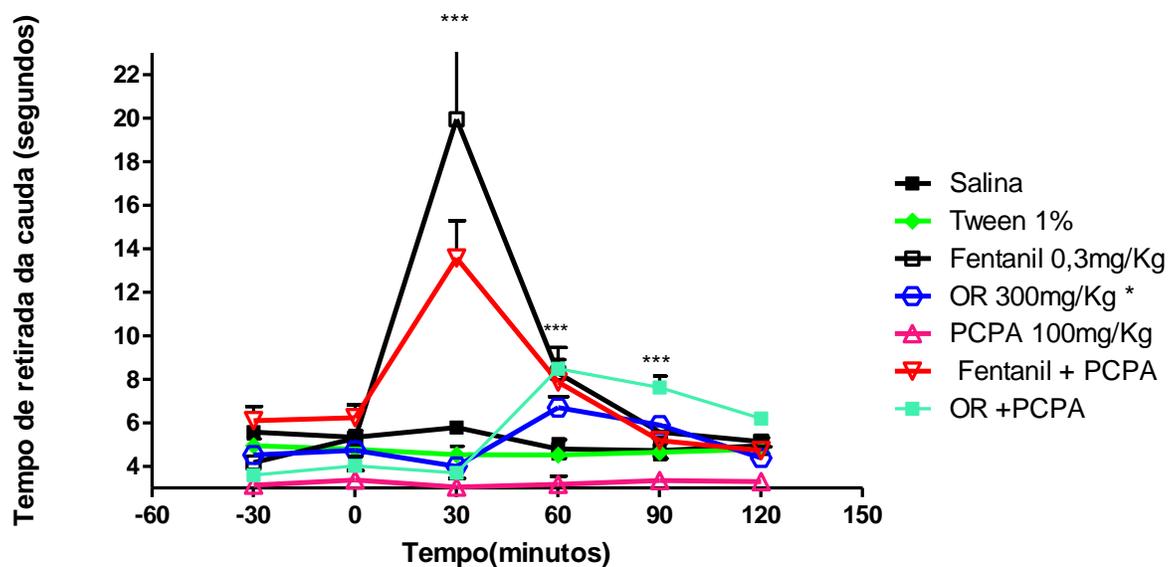


Figura 21. Avaliação da influência da via serotoninérgica no mecanismo antinociceptivo da OR na dose de 300mg/Kg v.o e fentanil 0,3mg/Kg (agonista opióide) quando foram camundongos pré-tratados com PCPA 100mg/Kg i.p por 3 dias consecutivos) no teste da retirada de cauda . O valor de *** p<0,001

representa o nível de significância estatística quando da comparação entre os grupos fentanil e OR e seus respectivos controles.

6.2. Avaliação da Atividade Anti-inflamatória

6.2.1. Método do Edema de orelha induzido por óleo de cróton

Após o pré-tratamento (*p.o*) de grupos de camundongos ($n = 6$) com a OR nas doses de 10, 30, 100, 300 e 1000 mg/kg ou com o controle positivo dexametasona (2mg/kg, *s.c*) 66,67% ($2,200 \pm 0,2864$ mg, $p < 0,001$) observou-se redução dose dependente da formação do edema de orelha de 8.45% ($6,317 \pm 0,3005$ mg, $p < 0,05$); 26.57% ($5,067 \pm 0,2917$ mg, $p < 0,05$); 45.65% ($3,750 \pm 0,3374$ mg, $p < 0,01$); 79.95% ($1,383 \pm 0,2301$ mg, $p < 0,001$) respectivamente, não produzindo qualquer efeito na dose de 10mg/kg e 30mg/kg quando comparado ao grupo controle veículo ($6,989 \pm 0,6100$), sendo permitido calcular a DI50 que foi de 369,94mg/kg(Tabela 9 , Figuras 22 e 23).

Tabela 10. Influência do pré-tratamento com OR nas doses 10-1000 mg/Kg (*p.o*) na formação do edema após aplicação tópica de óleo de cróton 2,5% na orelha de camundongos ($n=6$). Os valores * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ representam os níveis de significância estatística quando comparados os grupos indometacina e seus respectivos controles salina e tween 1%.

Tratamento	Dose (mg/Kg)	Δ Peso da orelha (mg)	% inibição
Salina	-	$6,600 \pm 0,4592$	-
Tween1%	-	$6,989 \pm 0,6100$	-
Dexametasona	2	$2,200 \pm 0,2864$	$66,67 \pm 4,339$
	10	$7,200 \pm 0,6792$	-
	30	$6,317 \pm 0,3005$	8.45 ± 4.35
	100	$5,067 \pm 0,2917$	26.57 ± 4.22

OR	300	3,750 ± 0,3374	45.65± 4.89
	1000	1,383 ± 0,2301	79.95± 3.33

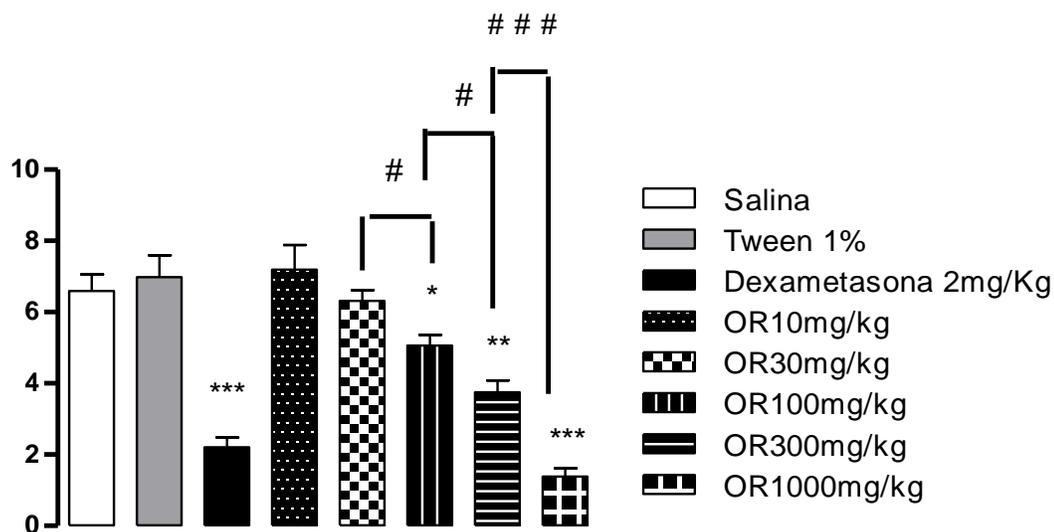


Figura 22. Avaliação da formação do edema induzido por óleo de cróton 2,5% após tratamento com diferentes doses da óleo-resina. As barras verticais representam as médias ± E.P.M. Os valores * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ representam os níveis de significância estatística quando comparados os grupos indometacina e seus respectivos controles salina e tween 1% (ANOVA One-Way, com pós- teste de tukey). Os valores # $p < 0,05$ e ### $p < 0,001$ representam o nível de significância estatística quando a comparação foi feita entre as doses.

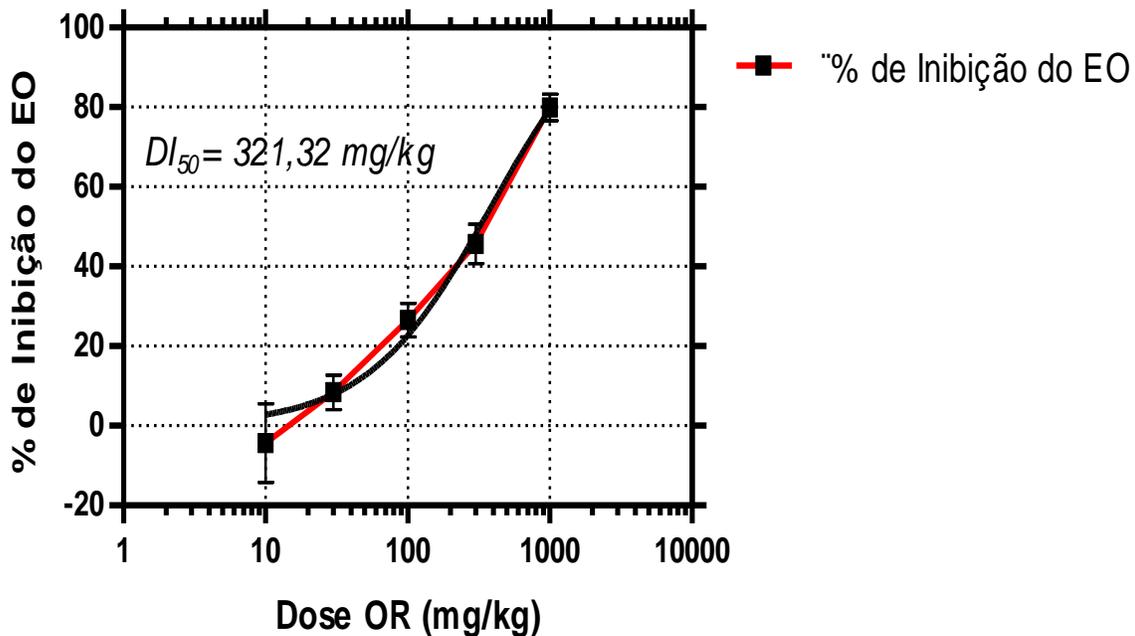


Figura 23. Curva dose-resposta para o efeito anti-inflamatório da OR de *C.glycyarpa* em diferentes concentrações (10-1000mg/kg). O efeito está representado como % de inibição do edema *versus* dose da OR em relação a média do grupo veículo tween 1%. Os valores estão expressos como média E.P.M.. curva em vermelho (---) representa a curva experimental enquanto que curva em preto) representa a curva teórica utilizada para determinação da DI_{50} cujo valor determinado experimentalmente foi de 321,32 mg/kg.

6.2.2. Pleurisia induzida por carragenina 1%

Após o pré-tratamento (v.o) de grupos de camundongos ($n = 6$) com a OR (1000mg/kg) ou com o controle positivo dexametasona (2mg/Kg), observou-se inibição da migração leucocitária para a cavidade pleural de 59,80% ($4050 \pm 385,7 \times 10^6$ leucócitos/mL) e 66,64% ($3425 \pm 281,0 \times 10^6$ leucócitos/mL) respectivamente, quando comparado aos grupos veículo salina ($10267 \pm 951,7 \times 10^6$ leucócitos/mL) e DMSO ($10075 \pm 2183 \times 10^6$ leucócitos/mL) (Tabela 10 e Figura 24).

Tabela 11. Influência do pré-tratamento com OR 300mg/Kg sobre a contagem total de leucócitos no teste da pleurisia induzida por carragenina. Os valores de $p < 0,05$; $** p < 0,01$ e $*** p < 0,001$ representam o nível

de significância estatística quando da comparação entre os grupos dexametasona e OR e seus respectivos controles.

Grupos	n	N. de Leucócitos x10 ⁶ /mL(media ± erro)	% dos controles	% de inibição
Salina	7	10267±951,7	91,49±11,57	-
DMSO 0,0125%	5	10075±2183	75,55±15,59	-
Dexametasona 2mg/Kg	6	3425±281,0	33,36±2,373	66,64±2,737
OR 1000mg/Kg	5	4050±385,7	40,20±3,028	59,80±3,828
Ácido Caurenóico 10mg/kg	5	5125±869,5	50,87±8,630	49,13±8,630
Ácido Poliáltico 20mg/Kg	5	4600±711,5	45,66±7,062	54,34 ±7,062

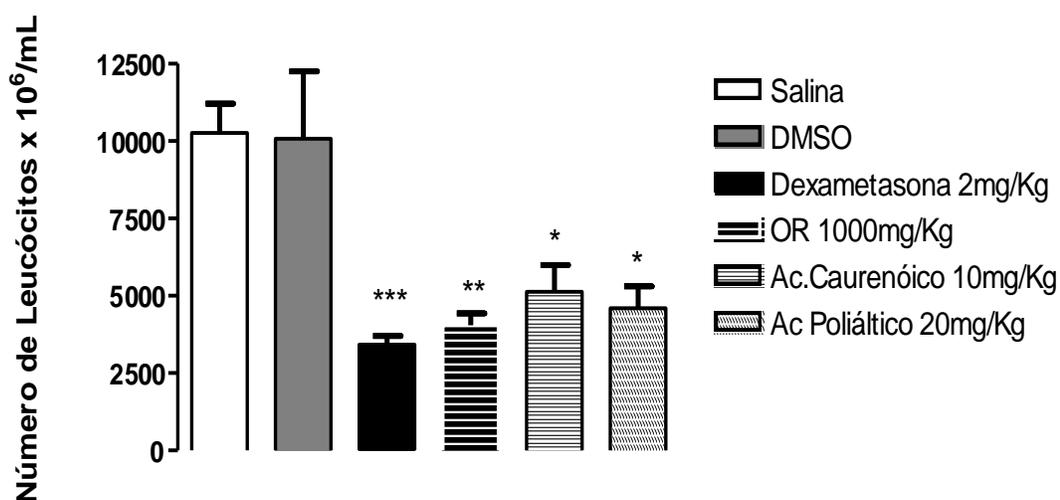


Figura 24. Avaliação da migração leucocitária através da contagem de leucócitos totais no teste da pleurisia induzida por carragenina. As colunas e barras representam as médias e o E.P.M. dos grupos experimentais (n=6). Os asteriscos exprimem os valores de significância estatística dos grupos experimentais quando comparados aos seus controles negativos (* p<0,05; **p<0,01 e *** p<0,001).

6.3. Atividade motora e sobre o sistema nervoso central

6.3.1. Teste do Campo aberto

O teste de campo aberto é um dos instrumentos mais utilizados na avaliação comportamental e da função motora de animais. Os animais que receberam OR 300mg/kg e diazepam 1mg/kg obtiveram uma resposta similar nos parâmetros analisados, ou seja, aumentaram o número de bolos fecais ($1,17 \pm 0,31$ e $1,38 \pm 0,17$ bolos fecais, $n=6$, $p<0,001$; **Tabela 11 e Figura 25**) se comparados aos seus respectivos controles salina e tween 1% ($0,53 \pm 0,33$ bolos fecais, percorreram uma distância menor ($7,07 \pm 0,55$ e $6,75 \pm 0,36$ metros, $n=6$, $p<0,001$; **Tabela 11 e Figura 25**) se comparados aos seus respectivos controles salina e tween 1% ($11,61 \pm 0,61$ e $11,68 \pm 1,01$ metros), permaneceram mais tempo na zona central ($7,10 \pm 1,10$, $n=6$, $p<0,05$ e $9,20 \pm 1,64$ segundos, $n=6$, $p<0,01$; **Tabela 11 e Figura 25**) quando comparados aos seus respectivos controles salina e tween 1% ($2,52 \pm 0,44$ e $2,90 \pm 0,82$ segundos), passaram mais tempo imóveis ($109,60 \pm 9,60$ e $123,00 \pm 14,99$ segundos, $n=6$, $p<0,05$; **Tabela 11 e Figura 25**) se comparados aos controles salina e tween 1% ($61,28 \pm 6,24$ e $74,28 \pm 7,40$ segundos) e diminuíram o tempo gasto durante os comportamentos de levantar com apoio nas patas traseiras (“rearing”) ($0,32 \pm 0,15$ e $1,48 \pm 0,26$ segundos, $n=6$, $p<0,001$; **Tabela 11 e Figura 25**) se comparados aos controles salina e tween 1% ($21,83 \pm 4,80$ e $22,72 \pm 1,78$ segundos, $n=6$, $p<0,001$ e reduziram o tempo de comportamento de autolimpeza (“grooming”) ($11,40 \pm 1,07$; $p<0,001$ e $21,62 \pm 3,04$ segundos, $p<0,01$; **Tabela 11 e Figura 25**) em relação aos seus controles negativos salina e tween 1% ($48,13 \pm 6,43$ e $46,45 \pm 3,22$ segundos) sugerindo uma atividade anseolítica e sedativa da OR nesta dosagem

Tabela 12. Influência do pré-tratamento com OR 300mg/Kg sobre o sistema nervoso central central no teste do campo aberto. Os valores de $p < 0,05$; $** p < 0,01$ e $*** p < 0,001$ representam o nível de significância estatística entre os grupos diazepam e OR e seus respectivos controles negativos salina e tween 1%

Parâmetros/grupos	salina	Tween 1%	Diazepam 1mg/kg	OR 300mg/kg
N. de bolos fecais	0,3333±0,2108	0,6667±0,3333	2,167±0,3073 (***)	1,833±0,1667 (***)
Distância percorrida(m)	11,61±0,6127	11,68±1,015	7,072±0,5479 (***)	6,750±0,3608 (***)
Tempo na zona central (s)	2,517±0,4438	2,900±0,8181	7,100±1,102 (*)	9,200±1,645 (**)
Tempo de imobilidade(s)	61,28±6,240	74,28±7,399	109,6±9,595 (*)	123,0±14,49 (*)
Tempo de rearing(s)	21,83±4,798	22,72±1,776	0,3167±0,1493 (***)	1,483±0,2638 (***)
Tempo de grooming(s)	48,13±6,435	46,45±3,218	11,40±1,073 (***)	21,62±3,038 (**)

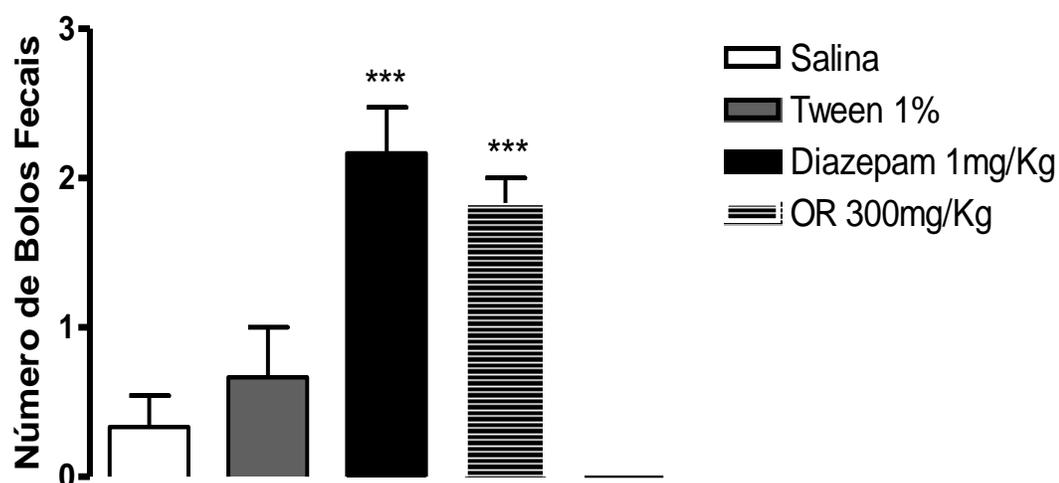


Figura 25. Influência do pré-tratamento com OR 300mg/KG no número de bolos fecais no teste do campo aberto. As barras verticais representam as médias e E.P.M. e *** $p < 0,001$ representa o nível de significância estatística entre os grupos diazepam e OR e seus respectivos controles negativos Salina e tween 1% (ANOVA-One-Way, com teste de Tukey) (n=6).

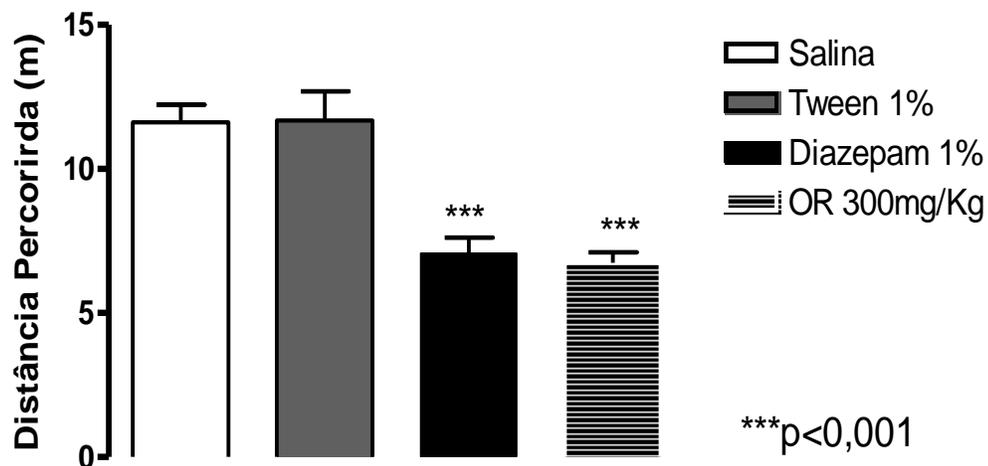


Figura 26. Influência do pré-tratamento com OR 300mg/kg na distância total percorrida no teste do campo aberto. As barras verticais representam as médias e E.P.M. e *** $p < 0,001$ representa o nível de significância estatística entre os grupos diazepam e OR e seus respectivos controles negativos Salina e tween 1% (ANOVA-One-Way, com teste de Tukey) (n=6).

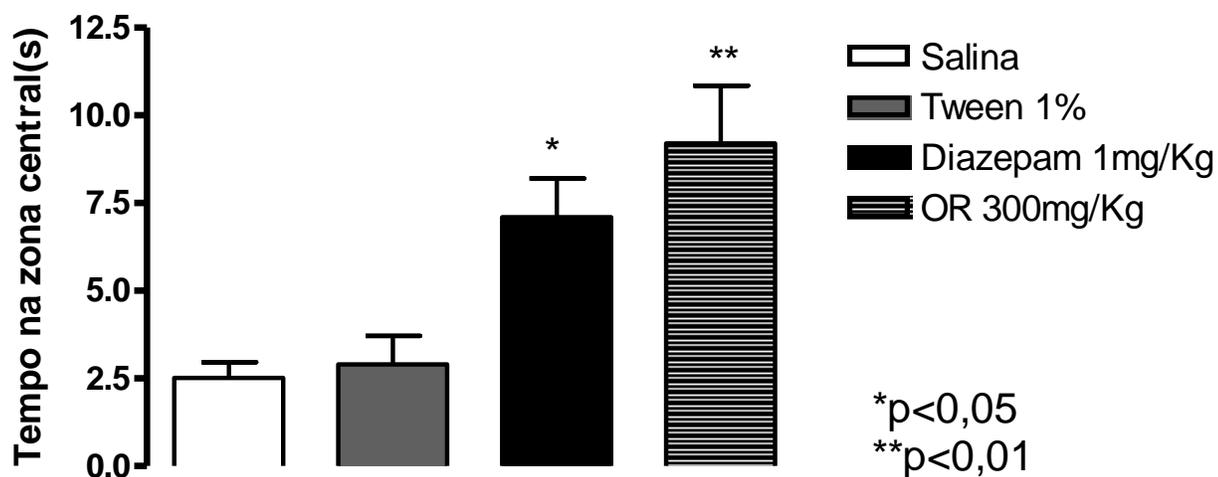


Figura 27. Influência do pré-tratamento com OR 300mg/kg no tempo total de permanência na zona central no teste do campo aberto. As barras verticais representam as médias e E.P.M. e os valores de * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ representa o nível de significância estatística entre os grupos diazepam e OR e seus respectivos controles negativos Salina e tween 1% (ANOVA-One-Way, com teste de Tukey) (n=6).

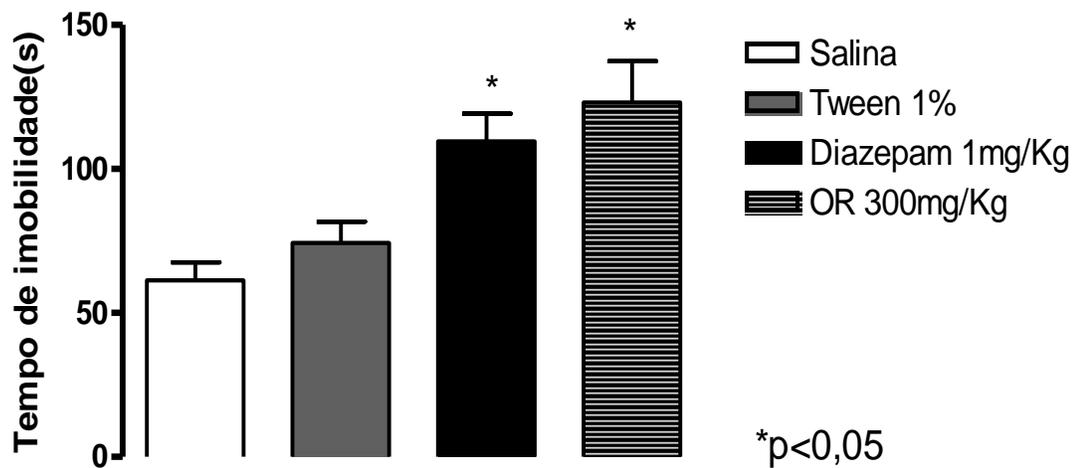


Figura 28. *Influência do pré-tratamento com OR 300mg/kg no tempo de imobilidade no teste do campo aberto.* As barras verticais representam as médias e E.P.M. e * p<0,05 representa o nível de significância estatística entre os grupos diazepam e OR e seus respectivos controles negativos Salina e tween 1% (ANOVA-One-Way, com teste de Tukey) (n=6).

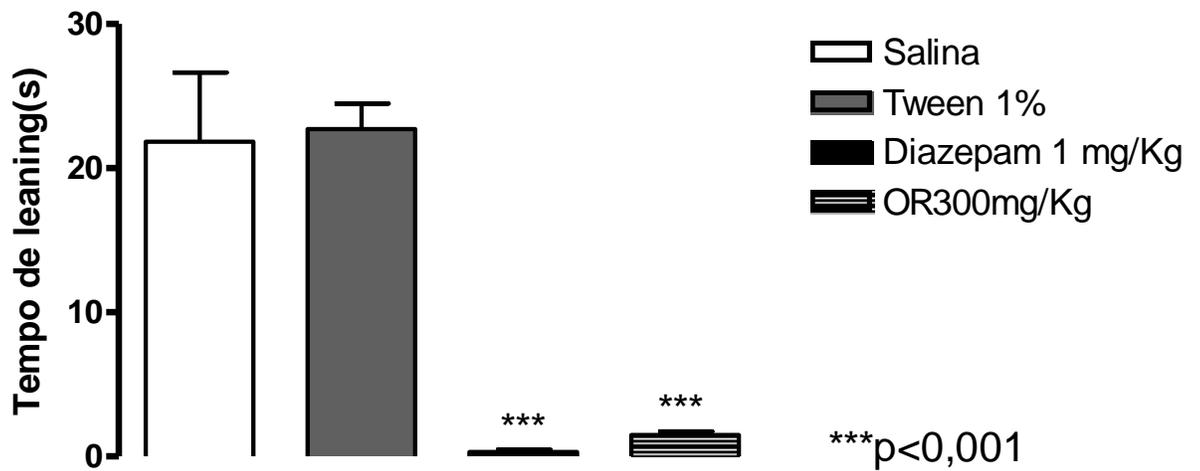


Figura 29. *Influência do pré-tratamento com OR 300mg/kg no tempo total de rearing (apoiar-se nas paredes da caixa) no teste do campo aberto.* As barras verticais representam as médias e E.P.M. e *** p<0,001 representa o nível de significância estatística entre os grupos diazepam e OR e seus respectivos controles negativos Salina e tween 1% (ANOVA-One-Way, com teste de Tukey) (n=6).

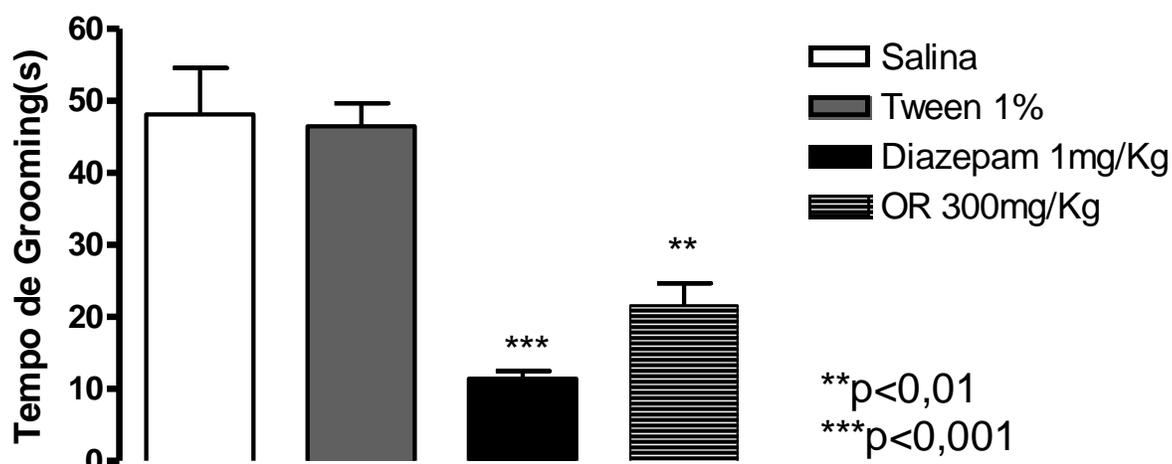


Figura 30. Influência do pré-tratamento com OR 300mg/kg no tempo total de grooming (limpeza) no teste do campo aberto. As barras verticais representam as médias e E.P.M. e os valores de ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ representam o nível de significância estatística entre os grupos diazepam e OR e seus respectivos controles negativos Salina e tween 1% (ANOVA-One-Way, com teste de Tukey) (n=6).

6.3.2 . Teste da Suspensão pela Cauda

Os camundongos pré-tratados com PCPA 100mg/kg *i.p* por 3 dias consecutivos obtiveram média de tempo de imobilidade aumentado de 56,55% ($138,7 \pm 3,442$, $p < 0,001$) quando os animais foram tratados com a OR300mg/kg esse tempo foi reduzido em 23,35% ($66,30 \pm 1,832$ segundos, $p < 0,001$) se comparados aos seus controles negativos salina ($88,60 \pm 4,17$ segundos) e tween ($86,50 \pm 5,180$). Quando pré-tratados com PCPA 100mg/kg o efeito da OR por sua vez foi intensificado para 35,26 % ($56,00 \pm 1,89$ segundos, $p < 0,001$ se comparado com tween 1%.

Tabela 13. *Influência do tratamento com OR na dose de 300 mg/Kg v.o sobre o sistema nervoso central em camundongos submetidos ao pré-tratamento com PCPA 100mg/Kg i.p por 3 dias consecutivos no teste da suspensão pela cauda.* Os valores *p<0,05; **p<0,01 e ***p<0,001 representam os níveis de significância estatística quando comparados os grupos indometacina e seus respectivos controles salina e tween 1%.

Tratamentos	Salina	Tween 1%	PCPA	OR	OR+ PCPA
Tempo de imobilidade (s) média e erro	88,60±4,172	86,50±5,180	138,7±3,442 (***)	66,30±1,832 (***) inibição de 25,17 %	56,00±1,886 (***)

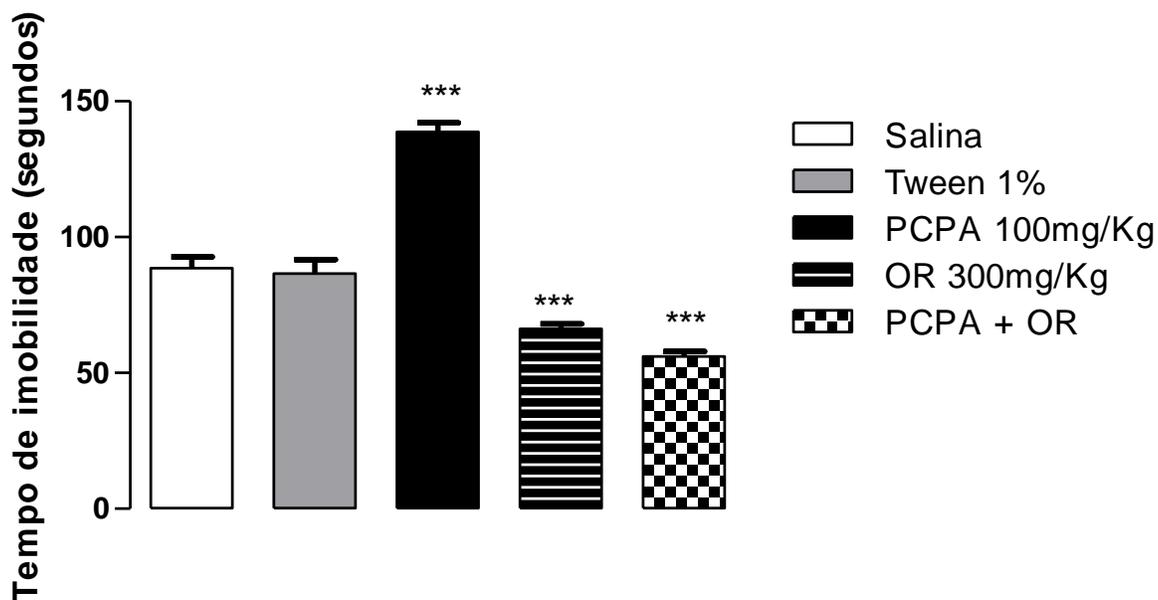


Figura 31. *Efeito da OR 300 mg/kg v.o após pré-tratamento com PCPA 100mg/kg i.p por 3 dias consecutivos no tempo de imobilidade no teste da suspensão pela cauda.* As barras verticais representam as médias e E.P.M. e *** p<0,001 representa o nível de significância estatística entre os grupos diazepam e OR e seus respectivos controles negativos Salina e tween 1% (ANOVA-One-Way, com teste de Tukey) (n=6).

7. DISCUSSÃO

A comprovação de atividades biológicas de plantas como medicamento hoje vem dos resultados de experiências realizadas pelo homem em seu próprio corpo ao longo de sua evolução, identificando inúmeras plantas medicinais que passam de geração a geração de forma que esse conhecimento não pode ser desconsiderado ainda mais em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento como o Brasil, grande parte da população se utiliza dessas práticas de saúde como única alternativa de tratamento, já que não tem acesso à assistência médica e muito menos aos medicamentos oficiais do mercado e principalmente pela enorme biodiversidade vegetal, essas plantas, na verdade, são fonte inesgotável de novas substâncias, e muitas vezes são muito bem aceitos por determinado grupo mas não recebem o devido respaldo por parte da comunidade científica (DI STASI 2007).

A elucidação dos componentes ativos presentes nas plantas, bem como seus mecanismos de ação, vem sendo um dos maiores desafios para a química farmacêutica, bioquímica e a farmacologia. As plantas contém inúmeros constituintes e seus extratos, quando testados podem apresentar efeitos sinérgicos entre os diferentes princípios ativos devido a presença de compostos de classes ou estruturas diferentes contribuindo para a mesma atividade (MACIEL *et.al.*, 2002).

Entre as várias espécies utilizadas pela população estão as plantas do gênero *Copaifera* que consta de 72 espécies, sendo 16 destas nativas e amplamente distribuídas, principalmente no território Amazônico, conhecida como Copaíba. A óleo-resina apresenta inúmeras utilizações na medicina tradicional, como a maioria voltadas para doenças inflamatórias (PIERI *et.al.*, 2009).

Utilizando métodos farmacológicos *in vivo*, o presente estudo tem como objetivos investigar as atividades antinociceptiva e anti-inflamatória da óleo-resina extraída de *Copaifera glycyarpa* e de dois compostos diterpenóides isolados (ácido caurenóico e ácido poliáltico) desta óleo-resina, determinando os possíveis mecanismos de ação envolvidos com essas atividades.

Este trabalho tem como justificativa a comprovação de algumas utilizações das plantas do gênero *Copaifera* na medicina tradicional através da avaliação da atividade farmacológica do óleo bruto de *C.glycyarpa* e dois diterpenos isolados. Além disso, contribuir com a avaliação farmacológica de uma espécie vegetal não estudada. A utilização de produtos naturais de forma segura tanto em humanos como em animais é resultado de intensos estudos de farmacêuticos, médicos veterinários e outros profissionais na identificação de seus potenciais farmacológicos, dosagens e vias de administração garantindo sua eficácia.

O teste das contorções abdominais apesar de ser considerado um modelo de antinocicepção não-seletivo, é sensível aos anti-inflamatórios não-esteroidais e/ou opióides é apropriado para avaliar este efeito como forma de triagem já que os efeitos algésicos induzidos por ácido acético está relacionado com a liberação de diversos mediadores químicos como citocinas e eicosanóides com aumento dos níveis de prostaglandinas no fluido peritoneal.(Koster, 1959).

Considerando que um dos parâmetros que indicam a especificidade de uma atividade farmacológica é a obtenção da relação dose x efeito, utilizando o teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos foi avaliada a efetividade antinociceptiva da óleo-resina. A administração oral dessa óleo-resina (10, 30, 100, 300, 1000 mg/kg) reduziu de forma dose-dependente o número de contorções abdominais ($ID_{50}=145,24$ mg/kg em relação a porcentagem de inibição do grupo veículo tween) . Entetanto neste mesmo modelo utilizando a dipirona como controle positivo do teste, Gomes e colaboradores (2007), demonstraram a atividade antinociceptiva para duas espécies diferentes de copaíba (*C.reticulata* e *C multijuga*) obtendo significativa inibição das contorções abdominais em todas as doses testadas, propondo um efeito máximo entre as doses de 100 e 150 mg/kg quando administradas oralmente.

A atividade antinociceptiva dos óleos de copaíba pode ser relacionado com a inibição da cascata do ácido araquidônico reduzindo os produtos das ciclooxigenases e lipoxigenases. Seus constituintes químicos podem ter ação similar aos antiinflamatórios não-esteroidais ou drogas opióides (GOMES *et. al*, 2006). Posteriormente, esse mesmo grupo testou a óleo resina e 3 frações diferentes do óleo utilizando desta metodologia, a

óleo-resina demonstrou ser mais efetiva ao reduzir o número de contorções abdominais do que as frações desse mesmo óleo e que esse efeito só eram significativos quando administrados oralmente em doses maiores que 30mg/kg com efeito máximo em 100mg/kg.(GOMES *et. al.*, 2010)

Para iniciar a investigação dos possíveis mecanismos envolvidos na antinocicepção dessa óleo-resina, foi realizado o teste da dor induzida pela injeção intraplantar de formalina 2,5%, válido, confiável e sensível a várias classes de fármacos com propriedades analgésicas sendo avaliada dois períodos distintos de nocicepção: uma fase inicial ou primeira fase (dor neurogênica), que corresponde aos primeiros 5 minutos de reatividade imediatamente após o estímulo pela formalina, e uma fase tardia ou segunda fase (dor inflamatória), compreendida entre 15 e 30 minutos após a injeção da formalina.

Fármacos como a indometacina (inibidor não-seletivo das enzimas COX) e a dexametasona (anti-inflamatório esteroideal) possuem a capacidade de inibir o processo inflamatório e por isso podem ser demonstrado pela redução prioritária da segunda fase do teste enquanto fármacos com ação analgésica central reduzem ambas as fases do teste. Nossos resultados neste método demonstraram que a OR de *C.glycyarpa* fo capaz de reduzir tanto a primeira como a segunda fase sugerindo que esta óleo-resina possui mais de um mecanismos de ação agindo tanto na redução da dor neurogênica como na dor inflamatória. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por outros autores que avaliaram anteriormente outras espécies de Copaiferas (GOMES *et. al.*, 2006 e GOMES *et. al.*, 2010).

No presente estudo a administração oral da óleo-resina (300mg/Kkg *v.o*) reduziu o tempo em que os animais lambiam, sacudiam ou mordiam o membro injetado com a formalina (tempo de reatividade) em ambas a fases do teste, tendo o efeito revertido parcialmente pela naloxona (antagonista opióide não-seletivo) de maneira semelhante ao fentanil (agonista opióide), Esses resultados corroboram com o efeito inibiório da OR no método das contorções abdominais.

Interessantemente, foi que a óleo-resina (100, 300 e 1000mg/kg *v.o*) reduziu o tempo de reatividade aparentemente de forma dose-independente na primeira fase e de forma

dose-dependente na segunda fase do método, possivelmente este efeito inibitório observado para óleos provenientes de diferentes espécies de *copaifera* em modelos de dor poderia ser em parte devido a ação direta sobre receptores opióides (subtipo μ) na medula espinhal assim como compostos morfina-like ou ainda sobre a atividade das fibras C de axônios ascendentes pela diminuição da produção de PG's responsáveis pela estimulação de fibras C (GOMES *et. al.*, 2007), assim, algum componente presente no óleo poderia estar atuando no controle das condutâncias iônicas entre as células e o meio alterando sua polaridade favorecendo a hiperpolarização inibindo assim a transmissão do impulso nociceptivo de vias aferentes periféricas ou antagonizar o efeito de alguns mediadores liberados logo após dano tecidual(histamina/5-HT) não retirando a possibilidade de participação em outras vias modulatórias nos processos dolorosos. Estes resultados reforçam a idéia inicial de um efeito antinociceptivo para a OR como sugerido com os efeitos inibitórios da OR no método das contorções abdominais. Além disso, a inibição de ambas as fases do método da formalina e a reversão parcial pela naloxona observada somente na segunda fase, sugerem a existência de outros mecanismos envolvidos nesta atividade antinociceptiva. Este achado está de acordo com o observado para as espécies *C.multijuga* e *C.reticulata* (GOMES *et. al.*, 2007 ; GOMES *et. al.*, 2010)

Para testar se o óleo de copaíba poderia desenvolver efeito antinociceptivo central, foi utilizado o método da retirada de cauda (analgesia espinhal). Diferenças características ocorreram no tempo de curso temporal das alterações produzidas pela OR no método da retirada de cauda. Ao contrário do observado para o fentanil, o nosso controle positivo, que produziu um efeito rápido (aos 30 e 60 minutos após tratamento) e intenso neste método, a OR mostrou uma tendência a um efeito temporalmente mais lento quanto a sua gênese e decaimento, tendo atingido valores próximos da significância estatística nas maiores doses testadas (300mg/kg e 1000mg/kg). A ação e efeito máximo rápidos são características de agonistas opióides (morfina, fentanil) que causam analgesia via mecanismos centrais descritas em ambas as condições normais e/ou patológicas como os processos inflamatórios. Neste sentido, uma possível explicação para esta ação mais prolongada, poderia ser uma lenta eliminação pelo cérebro baseada na sua alta solubilidade conforme discutido para outra espécie de *Copaifera* utilizando a mesma metodologia (GOMES *et. al.*, 2007).

Ainda utilizando o teste da retirada de cauda e avaliado a possível contribuição da serotonina no mecanismo antinociceptivo/antihiperálgica da OR 300mg/kg *v.o* quando administrado PCPA (inibidor da triptofano hidroxilase)100mg/kg *i.p* por 3 dias consecutivos. Sabe-se que o PCPA diminui os significativamente os estoques de serotonina corticais e reverte o efeito de fármacos opióides como o fentanil. Os animais tratados com PCPA, deveriam apresentar uma maior sensibilidade à dor, uma vez que a depleção dos estoques de 5-HTdiminuem a modulação negativa em modelos de dor como utilizado. Contudo., esta droga embora tenha reduzido o efeito antinociceptivo do fentanil, não foi capaz de reverte-lo por completo quando utilizada previamente ao tratamento como este e outros opióides (HESS, *et.al.*, 2010).. A OR por sua vez, curiosamente, apresentou na presença do PCPA um interessante tendência a intensificação de seu efeito sobre a sensibilidade dolorosa dos animais, manifestando um aumento no tempo de retirada da cauda frente ao estímulo térmico e quando pré tratado com PCPA e posteriormente com OR. Contudo estas observações não puderam ser comprovadas em função da ausência de significância estatística.

Os resultados no método da formalina além de indicarem a possível ação antinociceptiva da OR, que aparentemente não tem participação clara de mecanismos opióides. Em modelos de inflamação *in vivo* em ratos, já foi observada significativa atividade nas fases proliferativas e exsudativas da inflamação, como por exemplo na demonstração da inibição do edema de pata por carragenina e do edema de orelha induzido pelo óleo de cróton (DI CARLO *et. al.*, 1999). Sendo o edema um sinal precoce da inflamação aguda, e considerando que diversos fármacos anti-inflamatórios são capazes de inibir a formação do edema, foi utilizado o óleo de cróton como agente flogístico, sendo avaliada a capacidade da OR em reduzir a formação do edema na orelha de camundongos.

A formação do edema ocorre devido ao fluxo transvascular de fluido rico em proteínas plasmáticas, dos compartimentos intravasculares para o interstício devido ao aumento da permeabilidade vascular de capilares e vênulas, como resultado da liberação de histamina, bradicinina, leucotrienos, fatores do complemento, substância P e fator de agregação plaquetária (PAF) no sítio inflamatório.

O pré-tratamento de camundongos com doses crescentes da OR (10-1000mg/kg) inibiu de forma dose-dependente e significativamente a formação do edema em 79.95% e a ID calculada foi de 321,34mg/kg, sendo esta atividade antiedematogênica mais um efeito que evidencia uma propriedade anti-inflamatória desta OR. Resultado similar foi encontrado por Gomes (2010) no modelo de edema de pata induzido pelos mediadores serotonina e histamina em ratos utilizando OR e as frações hexânica, clorofórmica e metanólica com inibição de 80% do edema induzido por estas substâncias.

Para confirmação deste indicativo de atividade anti-inflamatória demonstrada no teste da formalina e do edema de orelha da OR foi realizado o teste da pleurisia induzida por carragenina. A pleurisia é uma metodologia que provoca na cavidade pleural reação semelhante a que ocorre em consequência a infecções e inflamações com liberação de mediadores sendo difundidos para o tecido pleural e subpleural, resultando em ativação de células constitutivas. Como consequência observa-se aumento de células inflamatórias na cavidade pleural, causando aumento no número de células no espaço pleural. Contudo o acometimento da pleura por certas doenças, conforme observado de maneira semelhante neste método experimental, está associado com a infiltração de células do sistema imune, como neutrófilos, eosinófilos ou linfócitos, aumentando o número das mesmas (COSTA *et. al.*, 2006).

A inflamação induzida pela carragenina tem sido um modelo útil para a determinação da atividade anti-inflamatórios administrados por via oral e a pleurisia induzida pela carragenina tem sido extensivamente usada para investigar os mecanismos envolvidos na inflamação aguda, bem como no desenvolvimento de drogas anti-inflamatórias. A carragenina é absorvida na pleura causando danos teciduais nas células pleurais e liberação de enzimas vasoativas. Isto resulta no aumento da permeabilidade vascular e no desenvolvimento de um pequeno edema no tecido subpleural, que é seguido por diapedese de neutrófilos e monócitos para este sítio. A subsequente fagocitose da carragenina pelos neutrófilos resulta em degranulação e liberação de enzimas lisossomais decorrentes do aumento da permeabilidade dos vasos. A síntese e liberação de PG`s vasoativas completa o desenvolvimento da primeira fase da exsudação pleural (COSTA *et. al.*, 2006).

Para avaliarmos mais detalhadamente o mecanismo envolvido na atividade antiedematogênica/anti-inflamatória descrita para a OR seria importante utilizarmos substâncias isoladas a partir desta OR. Souza e colaboradores (2010) mostraram que dos 72 compostos identificados na OR de *C.glycyarpa*, a maior parte pertence a fração volátil do óleo composta por sesquiterpenos e a fração resinosa basicamente composta por ácidos diterpenos, descrito no óleo de copaíba estudado. Estes últimos pertencem aos esqueletos caurano, labdano e clerodano e que uma análise fitoquímica e isolamento de dois destes ácido diterpênicos, ácido caurenóico e ácido poliáltico foi realizado para a óleo-resina de *C.glycyarpa*.

Assim, utilizando o método da pleurisia efetuamos o pré-tratamento de camundongos por via oral com a OR na dose de 1000 mg/kg, ácido caurenóico 10mg/kg e ácido polialtico 20mg/kg, *v.o*), foi capaz de reduzir o número de leucócitos totais migrados para a cavidade pleural em 59,80%; 49,13% e 54,34% respectivamente enquanto a dexametasona inibiu 66,64% em relação aos controles, reforçando com estes resultados, os achados observados com os métodos da formalina e de edema de orelha. Temos ainda que tais propriedades antiedematogênicas/anti-inflamatórias descritas para a OR parecem ter o envolvimento destes dois ácidos diterpênicos contidos na OR, explicando em parte o efeito descrito inicialmente. Contudo os mecanismos moleculares envolvidos na ação destes compostos necessitam maior investigação, pois poderiam envolver a inibição por exemplo de enzimas como as cicloxigenases, lipoxigenases ou ainda a ação direta ou indireta sobre alguns dos sistemas neurotransmissores envolvidos no desenvolvimento do processo inflamatório. Devemos ainda considerar outras possibilidades como a inibição de citocinas pró-inflamatórias produzidas por células que migram para o local onde tal processo se desenvolve, cabendo portanto uma investigação detalhada deste efeito anti-inflamatório em nível mais molecular.

Paiva (2003) demonstrou a redução nos danos da mucosa em cólon de ratos induzida por ácido acético após administração do ácido caurenóico isolado de *C.langsdorffii* na dose de 100mg/Kg tendo maior inibição quando administrado por via retal. Em 2009 LIM, demonstrou a ação deste ácido isolado de *Aralia continentalis* em reduzir a produção de NO e PGE`s que também foi demonstrada por Veiga Junior (2007) para a óleo-resina de

três espécies de *Copaifera* sendo este diterpeno abundante nestes óleos em diferentes concentrações. Este mesmo diterpeno isolado de *Baccharis illinita* reduziu o edema de orelha de camundongos e a atividade da mieloperoxidase de forma similar a dexametasona e segundo Boller (2010) essa atividade antiedematogênica pode ser resultado da inibição da inflamação através da inibição do NFκB e interação das MAPK com receptores de TNF-α. Mais tarde, CHOI (2011) comprovou a atividade deste ácido em inibir o NF-κB e inibindo assim também a expressão de iNOS e COX-2 em macrófagos. Adicionalmente, segundo Paiva (2004) a óleo-resina de *C. langsdorffii* apresentou atividade gastroprotetora em modelos de úlcera e contra os danos inflamatórios induzidos por ácido acético em cólon de ratos. Estes danos sugerem que os componentes presentes na OR podem inibir preferencialmente COX-2 ao invés de COX-1 diminuindo assim os efeitos indesejáveis causados pela inibição desta enzima constitutiva ou ainda provocando um aumento de muco permitindo uma atividade protetora sobre mucosas.

Em relação ao ácido poliáltico apenas a atividade antimutagênica isolado de *Vitex Rotundifolia* por Miyazawa (1995) foi descrita para a substância e mais recentemente um grupo da universidade do México estudou a atividade anti-úlcera desse ácido isolado de *Croton reflexifolius* e o papel do NO, PG's e sulfidrilas no mecanismo gastroprotetor no modelo de úlcera induzida por etanol em ratos tratados com L-NAME (inibidor da enzima óxido nítrico sintase), NEM (bloqueador de compostos sulfidrilas), indometacina e carbenoxolona e foi observado que as PG's não participam do mecanismo gastroprotetor do ácido poliáltico, bem como o efeito desse composto não alterou com o pré-tratamento com indometacina, um inibidor de ciclooxigenase, já no grupo tratado com L-NAME houve inibição de 76.77% e quando tratados com NEM 67.70% concluindo que os mecanismos gastroprotetores do ácido poliáltico estão relacionados ao óxido nítrico endógeno e grupos sulfidrilas mas não com as prostaglandinas.

Como pôde ser observado, os efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório da OR e compostos isolados da *C. glycyarpa* são evidentes embora neste estudo não tenhamos sido capazes de evidenciar por exemplo, o envolvimento de ações e efeitos similares aos opióides. Visto que alguns métodos aqui utilizados envolvem observações comportamentais e plena capacidade do animal de desenvolver suas habilidades motoras, decidimos avaliar também a possibilidade de esta OR estar influenciando parte de nossos

resultados através de uma atividade sobre o sistema nervoso central que poderia estar determinando algum comprometimento da atividade motora dos mesmos. Assim, escolhemos o método do campo aberto e da suspensão pela cauda, o primeiro é um dos instrumentos mais utilizados na avaliação comportamental e da função motora de animais. Dados como aumento do tempo despendido na parte central do campo aberto é indicação de ansiólise, locomoção aumentada pode ser um indicativo de um efeito estimulante, enquanto diminuição da locomoção e da frequência com que o animal permanece sobre as patas traseiras é relatada como sedação. Além disso, a ausência de movimento (tempo de parada) é um parâmetro utilizado como indicativo de alto nível de estresse e a defecação reflete o índice de emoção, sendo relacionada à ativação do sistema simpatomimético (SACHETTI *et. al.*, 2009).

Neste método os animais que receberam OR 300mg/kg e diazepam 1mg/kg obtiveram uma resposta similar nos parâmetros analisados, ou seja, percorreram uma distância menor, permaneceram mais tempo na zona central, passaram mais tempo imóveis e diminuição do número de rearings (levantamento) e groomings (autolimpeza) em relação aos seus controles sugerindo uma atividade anseolítica e sedativa da OR nesta dosagem.

Curio em 2009 demonstrou atividade anseolítica do óleo de *Copaifera reticulata* Ducke em ratos utilizando o modelo do labirinto em cruz elevado nas doses de 100, 400 e 800 mg/kg. Em um estudo publicado em 2009 de toxicidade aguda e potencial neurotóxico do óleo-resina de copaíba (*Copaifera reticulata* de um *pool* de amostras extraídas de plantas do Campo Experimental do Mojú-PA, seguindo o Guia OECD-423/2001 de “Toxicidade Aguda de Classe”(OECD, 2001), nas doses de 300 e 2000mg/Kg v.o por 14 dias em ratas wistar , sendo aplicado o teste do campo aberto, labirinto em cruz elevado monitora peso corpóreo e consumo de ração, e como resultado não foi observado qualquer diferença estatística entre os grupo mesmo na maior dose testada até o último dia de experimento (SACHETTI, *et.al.*, 2009). Portanto, nossos resultados estão de acordo com os descritos por Curio e colaboradores que em 2009, demonstraram um efeito da OR de *C.reticulata* contribuindo para explicar em parte o efeito antinociceptivo da OR de *C.glycyarpa*. Todavia, não está claro o efeito desta OR sobre as fases 1 e 2 do método da formalina e sua reversão pela naloxona, um clássico antagonista opióide, cabendo uma investigação mais detalhada destes achados iniciais.

Além disso, não foi observado toxicidade aguda ou letalidade quando administrado na maior dose de 1000mg/Kg durante o período de experimentação e apesar de alguns trabalhos demonstrarem um efeito citotóxico, outros efeitos adversos já haviam sido descritos principalmente sinais gastro-intestinais e depressão do sistema nervoso central. (MACIEL *et. al.*, 2002).

Outro método utilizado para avaliação da atividade sobre o SNC foi o da suspensão pela cauda. Este teste é baseado no fato do animal ser submetido ao estresse de não poder escapar sendo suspenso pela cauda, desenvolvendo uma postura de imobilidade. Várias medicações antidepressivas são capazes de reverter essa postura de imobilidade e promover a ocorrência de um comportamento de fuga (CRYAN *et. al.*, 2005). Quando executamos este método com o tratamento dos animais pela OR na dose de 300mg/kg, observamos que os animais apresentavam menor tempo de imobilidade se comparados aos animais do grupo controle negativo sugerindo um efeito antidepressivo desta OR.

Neste mesmo método os animais depletados de serotonina (pré-tratados com PCPA) tiveram um tempo de imobilidade significativamente maior do que os grupos controles e quando receberam tratamento com PCPA + OR 300mg/kg o tempo de imobilidade dos animais reduziram mais intensamente mostrando que esta atividade antidepressiva da OR, a princípio, não parece envolver a participação direta da 5-HT.

Um importante sesquiterpeno o β -cariofileno, um óxido comum dos óleos de copaíba e também presente nesta óleo-resina possui atividade anti-inflamatória, antioxidante e antimicrobiana (VEIGA-JUNIOR, *et. al.*, 2012).

Com isto, alguns pesquisadores que estudaram atividades biológicas de outras espécies do gênero propõem um possível sinergismo entre as substâncias contidas no óleo. No entanto esta hipótese ainda não foi testada talvez devido a grande variedade destas substâncias presentes em menor ou em maior concentração no óleo. (PAIVA, *et. al.*, 2003; GOMES, *et. al.*, 2006; 2007; VEIGA - JUNIOR, *et. al.*, 2012).

Diante das evidências relatadas nos artigos que tratam sobre a ação farmacológica, medicinal e industrial dos óleos de copaíba percebemos que ainda há muitas controvérsias sobre a sua real eficácia e propriedades.

Há descrição química de vários de seus componentes direcionadas a indústria, porém toda a abordagem de tratdos sobre as copaibeiras deixam evidências de que é necessária a comprovação mais contundente sobre as suas reais propriedades farmacológicas.

Apesar dos diversos estudos e comprovação da atividade antinociceptiva do óleo, frações e substâncias isoladas em diferentes metodologias que torna difícil fazer comparações somando a enorme acervo de trabalhos e tamanha diversidade de espécies do gênero *Copaifera* com variações qualitativas e quantitativas de seus constituintes. No entanto, com a multidisciplinaridade, estudos etnofarmacobotânicos vêm lançando mão de estratégias e técnicas apostando no mercado do fitomedicamento que mantêm a idéia dos baixos custos de produção quando comparados às substâncias sintéticas, com a vantagem de ter menos efeitos colaterais. Todavia, cada vez mais se faz necessária a investigação farmacológica garantindo o efeito e a segurança na utilização de produtos naturais.

Neste sentido, estudos futuros com a OR e suas substâncias isoladas deverão ser realizadas visando a investigação dos mecanismos antinociceptivos e anti-inflamatórios moleculares utilizando diferentes protocolos e metodologias *in vivo* e *in vitro* como bloqueio farmacológico de receptores, avaliando a atividade de enzimas “chave” que participam do processo inflamatório como a COX-1, COX-2 e dosagem de citocinas que estão diretamente ou indiretamente envolvidas na evolução deste.

Por fim podemos dizer que o óleo de copaíba e seus constituintes embora já amplamente estudado sob vários aspectos demandam uma investigação mais detalhada de suas propriedades farmacológicas e que em nosso entender, o presente estudo pôde contribuir para a comprovação da existência de algumas das propriedades relacionadas ao uso popular desta OR. Entretanto, embora útil em algumas situações, alguns dos efeitos descritos no presente estudo sugerem o seu uso de modo controlado como qualquer medicamento demanda. Alguns dos achados obtidos no presente estudo estão sumarizados na **Tabela 13** juntamente com dados de outros autores.

Tabela 13. Resumo de algumas espécies do gênero *Copaifera* e contribuição farmacológica.

Espécie	Ativ.farmacológica	Modelo farmacológico	Fração/isolado dose testada	Resultado DI ₅₀ /IC ₅₀ /% inibição	Referência
<i>C.multijuga</i> <i>C.reticulata</i>	Antinociceptiva	c.a.a(i) formalina(ii) placa quente(iii) retirada da cauda(iiii)	Óleo bruto(OB) 1-150mg/kg v.o	20 e 30mg/kg 30 e 50mg/kg 45 e 55mg/kg 100mg/kg	Gomes,2007
<i>C.multijuga</i>	Antinociceptiva e anti-inflamatória	i; ii; iii ,edema de pata(EP),Permeabl.	OB; FH; FC;FM 1-150mg/kg v.o	(i)27,3mg/kg 25,9mg/kg; 90mg/kg (ii)49,3; 48,5	Gomes,2010
<i>C.langsdorffi</i>	Antinociceptiva	i; iii	OB/fração volátil 200-400mg/kg	27% e 53%	Santos;1996
<i>C.langsdorffi</i>	Anti-inflamatória	Colite induzida por AA 4%	OB 200-400mg/kg (v.o/i.r)	infiltrado edema;MPO/MDA;>400mg i.r	Paiva,2004
<i>C.langsdorffi</i>	Anti-inflamatória	Colite induzida por AA 4%	Ac.caurenóico 50-100mg/kg(v.o/i.r)	infiltrado;edema;MPO/MDA ,100mg/kg (i.r)52%	Paiva,2003
<i>C.cearencis</i> <i>C.reticulata</i> <i>C.multijuga</i>	Anti-inflamatória	Pleurisia,Produção NO em MØ <i>in vitro</i>	OB100-200-400mg/kg e [] 5,50,500ug/mL	CM (-)leuc.totais (-)NO na <[] e CR>efeito(-)85% na >dose	Veiga,2007
<i>C.duckei</i>	Anti-inflamatória	Edema de pata(EP),granuloma ratos Edema de orelha(EO) e c.a.a camundongos	OB tópico(517,1035, 1802mg/kg)	EP18% ;gran.42% na >dose ;62%EO e 62% c.a.a	Carvalho, 2005
<i>C.langsdorffi</i>	cicatrizante	Cicatz.feridas abertas,cicatz.em incisões	OB	Acelerou até 9° dia,acelerou até 5° dia	Paiva, 2002
<i>C.langsdorffi</i>	Cicatriz.	Reparo de ferida cirúrgica c/CE	OB tópico Balb/c machos e fêmeas	Influenciou(-)// processo de reparo	Vieira, 2008
<i>C.glycyarpa</i>	Antinociceptiva Anti-inflamatória Ativ. Sobre o SNC	Contorções abd.(I) Formalina(II) (II)+naloxona Retirada de cauda(III) (III)+PCPA Edema de orelha(IV) Pleurisia(V) Campo aberto(VI) Suspensão pela cauda+PCPA(VII)	OB(10-1000mg/kg)[I; IV] (100-1000mg/kg)[II] 300mg/Kg[II+ naloxona ; III e VI] (30-1000mg/Kg)[III] 1000mg/Kg[V] Ác. Caurenóico 10mg/Kg[V] Ácido poliáltico 20mg/Kg[V]	[I] DI=145,24mg/kg [II]DI=260,01mg/kg inibição das fases 1 e 2 + reversão parcial pela naloxona [III] e [III]+PCPA tendência a aumento no tempo de reação [IV] DI=321,32 mg/kg [V] diminuição número de Leucócitos totais sedativo; anseolítico sugere atividade antidepressiva	Em andamento para publicação

8. CONCLUSÕES

Os resultados demonstram que:

- A óleo-resina extraída de *C. glycyarpa* possui atividade antinociceptiva periférica, conforme observado nos métodos das contorções abdominais induzidas por ácido acético 1,2% e da indução de dor pela injeção intraplantar de formalina 2,5%.
- A atividade antinociceptiva observada para a OR, a priori, não parece envolver diretamente o sistema opioide uma vez que não foram observados claramente efeitos anti-hiperalgesia no método de retirada da cauda.
- A atividade antinociceptiva observada é dose-dependente conforme comprovado pelos métodos das contorções abdominais e formalina.
- A OR da *C. glycyarpa* possui em seu mecanismo antinociceptivo, o envolvimento de mecanismos periféricos diretamente relacionados à redução no desenvolvimento do processo inflamatório pois, esta OR foi capaz de inibir a formação do edema de orelha de camundongos induzido por óleo de cróton 2,5% e posteriormente, foi capaz de inibir a migração leucocitária para o foco inflamatório como demonstrado no método da pleurisia induzida por carragenina 1%.
- Os dois ácidos diterpênicos isolados, caurenóico e poliáltico, parecem estar contribuindo para esta atividade antiedematogênica/anti-inflamatória observada para a OR de *C. glycyarpa* pois estes separadamente foram capazes de reduzir a migração leucocitária demonstrado pelo método da pleurisia.
- Parte do efeito antinociceptivo da OR pode estar diretamente relacionado à sua capacidade de promover efeitos anseolíticos e sedativos conforme demonstrado pelo método do campo aberto.

- A OR possui efeito antidepressivo caracterizado pela diminuição do tempo de imobilidade dos animais quando executado o método da suspensão pela cauda.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K., LICHTMAN, A.H. In: **Imunologia celular e molecular**. Ed, Elsevier quinta edição, 2005.

AHUMADA, C.; SAENZ, T.; GARCIA, D.; DeLa PUERTA, R.; FERNANDEZ, A. e MARTINEZ, E. The effects of a triterpene fraction isolated from *Crataegus monogyna* Jacq. on different acute inflammation models in rats and mice. Leucocyte migration and phospholipase A2 inhibition. **Journal of Pharmacology**. V.49 (3), p.329-331, 1997.

AIRES, M. M. e Colabodores ,RJ. **Fisiologia**. 2008. 3.ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan p.242-57.

ALVES, T. M. A.; CHAVES, P. P. G.; SANTOS, L. M. S. T.; NAGEM, T. J.; MURTA, S. M. F.; CERAVOLO, I. P.; ROMANHA, A. J.; ZANI, C. L. **Planta Médica**. V.61, p.85, 1995.

APPLETON, I.; TOMLINSON, A.; WILLOUGHBY, D. A. Induction cyclo-oxygenase and nitric oxide synthase in inflammation. **Advances in Pharmacology**. v.35, p.27-78, 1996.

APPOLINÁRIO, P. P.; DEROGIS, P. B. M. C.; YAMAGUTI, T. H.; MIYAMOTO, S. Metabolismo, oxidação e implicações biológicas do ácido docosahexaenoico em doenças neurovegetativas **Química Nova**, v.43, p.1-8, 2011.

ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. **Animal Behavior** v.21 (2), p.205-235, 1973.

ASHMAWI, H. A.; BRAUN, L. M.; SOUSA, A. M.; POSSO, I. P. Analgesic Effects of H1 Receptor Antagonists in the Rat Model of Formalin-Induced Pain. **Revista Brasileira de Anestesiologia** v.59, p.461-70, 2009.

BASILE, A. C.; SERTIÉ, J. A.; FREITAS, P.C. D.; ZANINI, A. C. Anti-inflammatory activity of otilresin from Brazilian *Copaifera*. **Jornal of Ethnopharmacology** v.22, p.101-109, 1988.

BHATIA, M.; WONG, F. L.; CAO, Y.; LAU, H. Y.; HUANG, J.; PUNEET, P. Pathophysiology of acute pancreatitis. **Pancreatology**. v.5, p.132-44, 2005.

BOLLER, S.; SOLDI, C.; MARQUES, M. C. A.; SANTOS, E. P.; CABRINI, D. A.; PIZZOLATTI, M. G.; ZAMPRONIO, A. R.; OTUKI, M. F. Anti-inflammatory effect of crude extract and isolated compounds from *Baccharis illinita* DC in acute skin inflammation. **Journal of Ethnopharmacology**. v.130, p.262-266, 2010.

BOISSIER, J. R. e SIMON, P. The exploration reaction in the mouse. Preliminary note. **Thérapie**. v.17, p.1225-1232, 1962.

BREYER, R. M.; BAGDASSARIAN, C. K.; MYERS, S. A.; BREYER, M. D. Prostanoid receptors: Subtypes and signaling. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**. v.41, p. 661-90, 2001.

BUCHANAN, F. G.; CHANG, W.; SHENG, H.; SHAO, J.; MORROW, J. D. DUBOIS, R. N. Up-regulation of the enzymes involved in prostacyclin synthesis via Ras induces vascular endothelial growth factor. **Gastroenterology**. v.127, n°5, p.1391–400, 2004.

BUT, P. G.; MURAVEV, R. A.; FORMINA, V. A.; ROGOVIN, V. V. Antimicrobial activity of myeloperoxidase from neutrophilic peroxisome. **Biological Bulletin**. v.29, p.212-15, 2002.

CARVALHO, W. A.; LEMÔNICA, L. Mecanismos centrais de transmissão e de modulação da dor. Atualização terapêutica. **Revista Brasileira de Anestesiologia**. v.48, p.221 – 41, 1998.

CASCON, V.; GILBERT, B. Characterization of the Chemical Composition of Oilresins of *Copaifera guyanensis* Desf., *Copaifera duckei* Dwyer and *Copaifera multijuga* Hayne. **Phytochemistry**. v.55 (7), p.773-778, 2000.

CAWTHORN, W. P.; SETHI, J. K. TNF-alpha and adipocyte biology. **FEBS Letters**. v.582, p.117-31, 2008.

CHANDRASEKHARAN, N. V.; DAI, H.; ROOS, K. L.; EVANSON, N. K.; TOMSIK, J. ELTON, T. S. SIMMONS, D. L. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant

inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure and expression. **Proceedings of National Academy of Sciences USA**. v.99, , p.13926–31, 2002.

CHARLESWORTH, E. N.; KAGEY-SOBOTKA, A.; SCHLEIMER, R. P.; NORMAN, P. S.; LICHTENSTEIN, L. M. Prednisone inhibits the appearance of inflammatory mediators and the influx of eosinophils and basophils associated with the cutaneous late-phase response to allergen. **The Journal of Immunology** v.146, p. 671–76, 1991.

CHENG, H. F.; HARRIS, R. C. Cyclooxygenases, the kidney, and hypertension. **Hypertension**. v.43, p.525–30, 2004.

CHOI, R. J.; SHIN, E. M.; JUNG, H. A.; CHOI, J. A.; KIM, Y. S. Inhibitory effects of kaurenoic acid from *Aralia continentalis* on LPS-induced inflammatory response in RAW264.7 macrophages **Phytomedicine** v.18; p.677–682, 2011.

CLOEZI-TAYARANI, I.; CHANGEUX, J. P. Nicotine and serotonin in immune regulation and inflammatory processes: a perspective. **Journal Leukocyte Biology**. v.81, p.599–606, 2007.

COGGESHALL R.E.; CARLTON, S.M. Receptor localization in the mammalian dorsal horn and primary afferent neurons. **Brain Research Review** v.24, p. 28-66, 1997.

COSTA, R. Effect of novel selective non-peptide kinin B(1) receptor antagonists on mouse pleurisy induced by carrageenan. **Peptides**. v. 27, p.2967-75, 2006.

CUNHA, K. M. A.; PAIVA, L. A. F; SANTOS F. A; GRAMOSIA. N. V; SILVEIRA E. R; RAO, V. S. N Smooth muscle relaxant effect of kaurenoic acid diterpene from *Copaifera langsdorffii* on rat uterus in vitro. **Phytotherapy Research**.v.17, 2002.

CRYAN, J. F.; MOMBÉREAU, C.; VASSOUT A. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: Review of pharmacological and genetic studies in mice. **Neuroscience and Behavioral Reviews**, 29, p. 571–625, 2005.

CURIO, M.; JACONE, H.; PERRUT, J.; PINTO, A. C.; VEIGA FILHO, V. F.; SILVA, R. C. B. Acute effect of *Copaifera reticulata* Ducke copaiba oil in rats tested in the elevated plus-maze: an ethological analysis.

DI STASI, L.C. **Plana medicinas: Verdades e mentiras**. São Paulo: Unesp, 2007, p.10-83

DJAHANGUIRI, B. The production of acute gastric ulceration by indomethacin in the rat. **Scand. Journal of Gastroenterology**. v.4, p.265-267, 1969.

DUBUISSON, D.; DENNIS, S. G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. **Pain**. v.4, p.161-1174, 1977.

DUHAM, N. W. e MYIA, T. S. **Journal of American Pharmacology Association**. 46, 208, 1957.

DWYER, J.D. The Central American West Indian and South American Species of *Copaifera* (Caesalpiniaceae). **Brittonia**. v.7(3), p.143-172, 1951.

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

GAO, W.; SCHMIDTKO, A.; WOBST, I.; LU, R.; ANGIONI, C.; GEISLINGER, G. Prostaglandin D2 Produced by hematopoietic prostaglandin D synthase contributes to LPS-induced fever. **Journal of Physiology and Pharmacology**. v.60, p.145-50, 2009.

GAUT, J. P.; YEH, G. C.; TRAN, H. D.; BYUN, J.; HENDERSON, J. P.; RICHTER, G. M.; BRENNAN, M. L.; LUSIS, A. J.; BELAAOUA, A.; HOTCHKISS, R. S.; HEINECKE, J. W. Neutrophils employ the myeloperoxidase system to generate antimicrobial brominating and chlorinating oxidants during sepsis. **Proceedings of National Academy of Sciences** . v.98, p.11961-66, 2001.

GIBSON, S. J.; POLAK, J. M.; BLOOM, S. R.; SABATE, I. M.; MULDERY, P. M.; GHATEI, M. A.; MCGREGOR, G. P.; MORRISON, J. F.; KELLY, J. S.; EVANS, R. M.; ROSENFELD, M. G. Calcitonin-gene related peptide immunoreactivity in the spinal cord of man and eight other species. **Journal os Neuroscience**. v.4, p.3101– 11, 1984.

GIORDANO, J. The Neurobiology of Nociceptive and Anti-nociceptive Systems. **Pain Physician** v.8, p.277- 90, 2005.

GOMES, N. M.; REZENDE ,C. M.; FONTES ,S. P.; MATHEUS, M. E.; FERNANDES, P. D. Antinociceptive activity of Amazonian Copaiba oils. **Journal of Ethnopharmacology** . v.109, p.486-492, 2007.

GOMES, N. M.; REZENDE, C. M.; FONTES, S. P.; MATHEUS, M. E.; PINTO, A. C. e FERNANDES, P. D. Characterization of the antinociceptive and anti-inflammatory activities of fractions obtained from *Copaifera multijuga* Hayne **Journal of Ethnopharmacology** v.128, p.177-183, 2010.

HARGREAVES, K.; DUBNER, R.; BROWN, F.; FLORES, C.; JORIS, J. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. **Pain**. v.32 n.1, p.77-78, 1988.

HESS, S.; PADOANI, C.; SCORTEGANHA, L. C.; HOLZMANN, I.; MALHEIROS, A. YUNES, R. A.; MONACHE, F. D.; SOUZA, M. M. Assessment of mechanisms involved in Antinociception Caused by Myrsinoic Acid B **Biological and Pharmaceutical Bulletin** v.33(2), p.209-215, 2010

HILL, S. J.; GANELLIN, C. R.; TIMMERMAN H.; SCHWARTZ, J. C.; SHANKLEY, N. P.; YOUNG, J. M.; SCHUNACK, W.; LEVI, R.; HASS, H. L. International Union of Pharmacology. XIII. Classification of Histamine Receptors. **Pharmacology Research**. v.49, p.253-78, 1997.

HONG, Y.; JI, H.; WEI, H. Topical ketanserin attenuates hyperalgesia and inflammation in arthritis in rats. **Pain**. v.124, p. 27–33, 2006.

HOYER, D.; HANNON, J. P.; MARTIN, G. R. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. **Pharmacol Biochem Behav**. v.71, p.533–54, 2002.

HUSSAIN, T.; GUPTA, S.; MUKHTAR, H. Cyclooxygenase-2 and prostate carcinogenesis. *Cancer Lett.* v.191, p.125-35, 2003.

HUNSKAAR, S.; FASMER, O. B.; e HOLE, K. Dissociation between antinociceptive and anti-inflammatory effects of acetylsalicylic acid and indomethacin in the formalin test. *Journal of Neuroscience. Meth.* 14, 69, 1986.

HUNSKAAR, S. and HOLE, K. Formalin test in mice: dissociation between antinflammatory and non-inflammatory pain. *Pain* v.30, p.103-114, 1987.

JONES, T. C.; HUNT, R. D.; KING, N. W. *Patologia Veterinária*. 2000. São Paulo: Manole

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. *Nature* v.413, p203–10, 2001.

KALKAN, A.; BULUT, V.; EREL, O.; AVCI, S.; BINGOL, N. K. Adenosine deaminase and guanosine deaminase activities in sera of patients with viral hepatitis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* v.94, p.383–6, 1999.

KANAOKA, Y.; URADE, Y. Hematopoietic prostaglandin D synthase. Prostaglandins *Leukotrienes and Essential Fatty Acids* v.69, p.163-7, 2003.

KIS, B.; SNIPES, J. A.; ISSE, T.; NAGY, K.; BUSIJA, D. W. Putative cyclooxygenase-3 expression in rat brain cells. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism.* v.23, p.1287–92, 2003.

KIS, B.; SNIPES, J. A.; BUSIJA, D. W. Acetaminophen and the cyclooxygenase-3 puzzle: sorting out facts, fictions, and uncertainties. **Journal Pharmacology Experimental Therapies**. v.315, p.1412-14, 2005.

KLAUMAN, P. R.; WOUK, A. F. P. F.; SILAS, T. **Patofisiologia da dor**. **Archives of Veterinary Science** v.13, p.1-12, 2008.

KOSTER,R.; ANDERSON, M.; DE BEER, E. J. Acetic acid for analgesic screening.**Federation Proceedings**. v.18, p.412 ,1959.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; ASTER, J. C. ROBBINS and COTRAN-**Patologic Basis of Disease**, 8th editon, 2010, Elsevier.

KURUMBAIL, R. G.; KIEFER, J. R.; MARNETTT, L. J. cyclooxygenase enzymes: catalysis and inhibition. **Current Opinion in Structural Biology**. v.11, p.752-60, 2001.

KUSHNIR-SUKHOV NM, BROWN JM, WU Y, KIRSHENBAUM A, METCALFE DD. Human mast cells are capable of serotonin synthesis and release. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. v.119(2), p.498–499, 2007.

LIM, H.; JUNG, H. A.; CHOI, J. S.; KIM, Y. S.; KANG, S. S.; KIM, H. P. Anti-inflammatory activity of the constituents of the roots of *Aralia continentalis* **Archives of Pharmacological Research** v.32, p.1237-1243, 2009

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

LIMA, A. RJ. **Índice Terapêutico Fitoterápico**. 2008. 1 ed.-Petrópolis:EPUB

LOCKSLEY, R. M.; KILLEEN, N.; LENARDO, M. J. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. **Cell** v.104, p.487–501, 2001.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA JUNIOR, V.F; GRYNBERG, N.F.; ECHEVARRIA, A. Plantas Medicinai:A Necessidade de Estudos Multidisciplinares. **Quimica Nova**. v.25, n.3, 2002.

MAGGI, C. A. Tachykinins and calcitonin gene-related peptide (CGRP) as cotransmitters released from peripheral endings of sensory nerves. **Progress in Neurobiology**. v.45, p.1-98, 1995.

MARTINS-DA-SILVA, R.C.V; PEREIRA, J.F. e LIMA, H.C. O gênero *Copaifera* (Leguminosae – Caesalopinoideae) na Amazônia Brasileira.**Rodriguesia**. v. 59(3), p.455-476, 2008.

MIYAZAWA, M.; SHIMAMURA, H.; NAKAMURA, S.; KAMEOKAT,H. Antimutagenic Activity of(+)- Polyalthic Acid from *Vitex Rotundifolia* **Journal of Agricultural and Food Chemmistry**. v. 43, p.3012-3015, 1995.

MELZACK, R.; WALL, P. D. Pain mechanisms: a new theory. **Science**. v.150, p.971–79, 1965.

MESSLINGER, K. What is a nociceptor ? **Anaesthesiology**. v.46, p.142-53, 1997.

MERSKEY, H.; BOGDUK, N. Classification of chronic pain. Seattle: **IASP Press**. 1994.

MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review. **Progress in Neurobiology** v.57, p.1–164, 1999.

MILLAN, M. J. Descending control of pain. **Progress in Neurobiology** v.66, p.355–474, 2002.

MURAKAMI, M.; NAKASHIMA, K.; KAMEI, D.; MASUDA, S.; ISHIKAWA, Y.; ISHII, T.; OHMIYA, Y.; WATANABE, K.; KUDO I. Cellular prostaglandin E2 production by membrane-bound prostaglandin E synthase-2 via both cyclooxygenases-1 and -2. **The Journal of Biological Chemistry**. v.278, p.37937–47, 2002.

NEVE, J.; PARIJ, N.; MOGUILEVSKY, N. Inhibition of the myeloperoxidase chlorinating activity by nonsteroidal anti-inflammatory drugs investigated with a human recombinant enzyme. **European Journal of Pharmacology**. v.417, p.37-43, 2001.

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

PAIVA, L.A.F.; GURGEL, L.A.; SILVA, R.M.; TOMÉA.R.; GRAMOSA, N.V.; SILVEIRA, E.R.; SANTOS, F.A.; RAO, V.S.N. Anti-inflammatory effects of Kaurenoic acid, a diterpene from *Copaifera langsdorffii* on acetic acid-induced colitis in rats. **Vascular pharmacology**. v.39, p.303-307, 2003.

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

PEREIRA, F.J.; MARTINS, F. T.; CORRÊA, R.S.; MOREIRA, M.E.C.; COSTA, A.M.D.D.; DOS SANTOS, M.H.; POLO, M.; BARBOSA, L.C.A. Isolamento, Composição Química e Atividade Anti-inflamatória do óleo Essencial do Pericarpo de *Copaifera langsdorffii* Desf.de acordo com Hidrodestilações sucessivas **Latin American Journal of Pharmacy** v.27(3), p.369-374, 2008.

PICOT, D.; LOLL, P. J.; GARAVIT, R. M. The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H2 synthase-1. **Nature** v.367, p.243-9, 1994.

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

PINHEIRO, M M.; BESSA, S. O.; FINGOLO, C. E.; KUSTER, R. M.; MATHEUS, M. E.; MENEZES, F. S. E FERNANDES, P. D. Antinociceptive activity of fractions from

Couroupita guianensis Albl. Leaves **Journal of Ethnopharmacology**. v.127(2), p.407-413, 2010.

RAFFA, R. B. Antihistamines as analgesics. **Journal of Clinical Pharmacology Therapies**. v.26, p.81-5, 2001.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; FLOWERS, R.J. **Farmacologia**. 2007.6 ed., Rio de Janeiro: Elsevier.

REYES-TREJO, B.; SÁNCHEZ-MENDONZA, M.E.; BECERRA-GARCIA, A.A.; CEDILLO-PORTUGAL, E.; CASTILLO-HENKEL, C.; ARRIETA, J. Bioassay-guided isolation of an anti-ulcer diterpenoid from *Croton reflexifolius*: role of nitric oxide, prostaglandins and sulfhydryls. **Journal of pharmacy and pharmacology** v.60, p. 931–936, 2008

ROSEN, H.; MICHEL, B. Redundant contribution of myeloperoxidase dependent systems to neutrophil-mediated killing of Escherichia coli. **Infection and Immunity**. v.65, p.4173–8, 1997.

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** v.19(4), p. 937-941, 2009

SALEH, T. S. F.; CALIXTO, J. B.; MEDEIROS, Y. S. Pro-inflammatory effects induced by bradykinin in a murine model of pleurisy. **European Journal of Pharmacology**. v.331, p.43-52, 1997.

SCHIANTARELLI, P.; CADEL, S.; ACERBI, D. e PAVESI, L. Antiinflammatory activity and bioavailability of percutaneous piroxicam. *Arzneim.-Forsch./Drug Research*. v.32 (3), p.230-235, 1982.

SERHAN, C.N.; SAVILL, J. Resolution of Inflammation: The beginning programs the end *Nature Immunology* . v. 6, p.1191-1197, 2005.

SERHAN, C.N. Nuevos mediadores químicos en la resolución de la inflamación: resolvinas y protectinas *Anesthesiology Clinics of North America* v.24, p.341-364, 2006.

SKILL, N. J.; THEODORAKIS, N. G.; WANG, Y. N.; WU, J. M.; REDMOND, E. M.; Sitzmann, J. V. Role of cyclooxygenase isoforms in prostacyclin biosynthesis and murine prehepatic portal hypertension. *American Journal of Gastrointestinal and Liver Physiology*. v.295, p.53-64, 2008.

SOUZA, P.A.; RANGEL, L. P.; OIGMAN, S. S.; ELIAS, M. M.; FERREIRA-PEREIRA, A.; GARDEN, N. C. L. e LEITÃO, G. G. The Efficient Preparative Isolation of Two Bioactive Diterpenic Acids from *Copaifera glycyarpa* Ducke Oilresin by High-Speed Counter-Current Chromatography (HSCCC) Using a Non-aqueous Solvent System. *Phytochemical Analysis*.v.21; p.539-543, 2010.

STERU, L.;CHERMAT, R.;THIERRY ,B.; SIMON, P. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology* V.85(3), p.367-370, 1985.

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

TINCUSI, B.M.; JIMENEZ, I.A.; BAZZOCCHI, I.L.; MOUJIR, L.M.; MAMANI, Z.A; BARROSO, J.P.; RAVELO, A.G.; HERNANDEZ, B.V. Antimicrobial terpenoids from the oleoresin of the peruvian medicinal plant *Copaifera paupera*. **Planta Médica**. v. 68, p.808-812, 2002.

VEIGA JUNIOR V.F.; PATITUCCI, M.L. ; PINTO, A.C. Controle de Autenticidade de óleos de copaíba comerciais por cromatografia gasosa de alta resolução **Química Nova**.v.20, p.612, 1997.

VEIGA JUNIOR V. F.; ZUNINO, L.; CALIXTO, J. B.; PATITUCCI, M. L.; PINTO, A. C. Phytochemical and antiedematogenic studies of comercial copaíba oil available in Brazil. **Phytotherapy research**. v.15, p.476-480, 2001.

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

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

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

VIEIRA, R.C.; BOMBARDIERE, E.; OLIVEIRA, J.J.; LINO-JUNIOR, R.S. BRITO, L.A.B.; JUNQUEIRA-KIPNIS, A.P. INFLUÊNCIA DO ÓLEO DE *Copaifera*

langsdorffii NO REPARO DE FERIDA CIRÚRGICA NA PRESENÇA DE UM CORPO ESTRANHO) **Pesquisa Veterinária Brasileira**. V.28 (8) p.358-366, 2008

WINKELSTEIN, B. A. Mechanisms of central sensitization, neuroimmunology & injury biomechanics in persistent pain: implications for musculoskeletal disorders. **Journal of Electromyography and Kinesiology**. v.14, p. 87-93,2004.

WOOLFE, G. and MACDONALD, A. D. The evaluation of analgesic action of pethidine hydrochloride (DEMEROL) . **Journal of Pharmacology Experimental Therapies**. v. 80, p. 300-307, 1944.

WOOLF, C.J. Pain: moving from symptom control toward mechanism-specific pharmacologic management. **Ann. Intern. Med** v. 140, n. 6, p. 441- 451, 2004.

YU, B.; BECNEL, J.; ZERFAOUI, M.; ROHATGI, R.; BOLARES, A. H.; NICHOLS, C. D. Serotonin 5-Hydroxytryptamine 2A Receptor Activation Suppresses Tumor Necrosis Factor-Induced Inflammation with Extraordinary Potency. **Journal of Pharmacology Experimental Therapies**. v.327, p.316-23, 2008.

ZIMMERMANN, M. Ethical considerations in relation to pain in animal experimentation. **Acta Physiologica Scandinavica Supplement**.v.554, p.221-233, 1986.