



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA
INSTITUTO DE PESQUISAS CIENTÍFICAS E TECNOLÓGICAS DO ESTADO DO AMAPÁ
CONSERVAÇÃO INTERNACIONAL DO BRASIL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE TROPICAL
UNIFAP/ EMBRAPA-AP/ IEPA/ CI-BRASIL/PPGBIO

CLARISSA SILVA LIMA

**APROVEITAMENTO DE RECURSOS NATURAIS: ESTUDO DA
PERFORMANCE REPRODUTIVA COM A APLICAÇÃO DO ÓLEO DE COPAÍBA
(*Copaifera duckei* Dwyer) VEICULADO EM CREME VAGINAL.**

MACAPÁ-AP

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

CLARISSA SILVA LIMA

APROVEITAMENTO DE RECURSOS NATURAIS: ESTUDO DA PERFORMANCE REPRODUTIVA COM A APLICAÇÃO DO ÓLEO DE COPAÍBA (*Copaifera duckei* Dwyer) VEICULADO EM CREME VAGINAL.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. José Carlos Tavares Carvalho

MACAPÁ-AP

2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal do Amapá

Lima, Clarissa Silva

Aproveitamento de recursos naturais: estudo da performance reprodutiva com a aplicação do óleo de copaíba (*Copaifera duckei* Dwyer) veiculado em creme vaginal / Clarissa Silva Lima; orientador José Carlos Tavares Carvalho. Macapá, 2009.

65 f.

Dissertação (mestrado) – Fundação Universidade Federal do Amapá, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical.

1. Biodiversidade tropical. 2. Óleo de Coapíba. 3. Resina de Copaíba. 4. Fitoterapia. I. Carvalho, José Carlos Tavares, orient.. II. Fundação Universidade Federal do Amapá. III. Título.

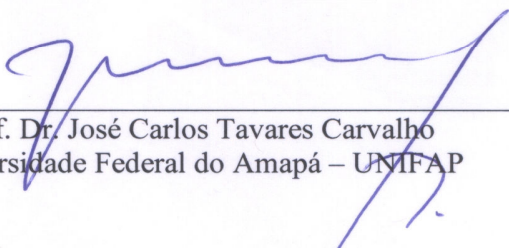
CDD. 22.ed. 574.5

CLARISSA SILVA LIMA

**APROVEITAMENTO DE RECURSOS NATURAIS: ESTUDO DA
PERFORMANCE REPRODUTIVA COM A APLICAÇÃO DO ÓLEO DE COPAÍBA
(*Copaifera duckei Dwyer*) VEICULADO EM CREME VAGINAL.**

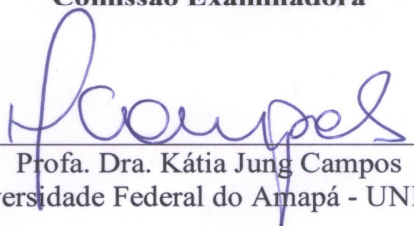
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Biodiversidade Tropical (PPGBIO) da Universidade Federal do
Amapá (UNIFAP), como parte das exigências para obtenção do
grau de Mestre em Biodiversidade Tropical.
Área de Concentração: Ecologia e Meio Ambiente

Orientador

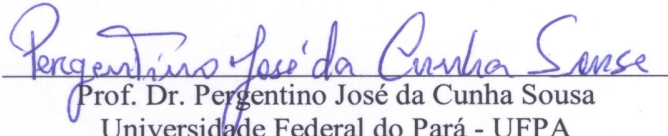


Prof. Dr. José Carlos Tavares Carvalho
Universidade Federal do Amapá – UNIFAP

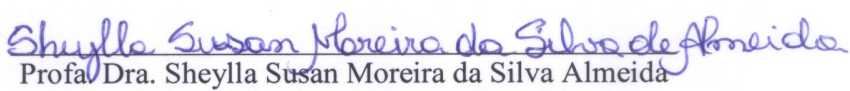
Comissão Examinadora



Profa. Dra. Kátia Jung Campos
Universidade Federal do Amapá - UNIFAP



Prof. Dr. Pergentino José da Cunha Sousa
Universidade Federal do Pará - UFPA



Profa. Dra. Sheylla Susan Moreira da Silva Almeida
Universidade do Estado do Amapá - UEAP

Macapá-AP, 21 de dezembro de 2009

Dedico este trabalho aos meus pais, Antônio e Cleide, que nunca mediram esforços para me oferecer uma boa educação, e que sempre me apoiaram, dando-me força e coragem nos momentos mais difíceis.

Ao meu esposo Breno William, pela compreensão dos momentos ausentes em nosso lar.

À nossa filha, Luana Beatriz, que mesmo sem entender, suportou minha ausência. Você é a nossa razão de viver, tradução mais simples e sólida do nosso amor.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Carlos Tavares Carvalho, por acreditar no meu potencial, confiando a mim a execução deste trabalho. Obrigada pelos ensinamentos técnicos, pela exigência e pela amizade.

Ao CNPq pelo apoio financeiro ao projeto.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical, na pessoa de sua Coordenadora, Prof. Dr^a Helenilza Cunha, onde tive a oportunidade de dar um importante rumo ao crescimento científico e profissional.

A toda Equipe do Laboratório de Pesquisa em Fármacos/UNIFAP, pelo apoio na realização dos experimentos, em especial ao Benedito Júnior, Aline Ferreira e Hugo Favacho.

A toda Equipe do Laboratório de Entomologia/UNIFAP, na pessoa do Prof. Dr. Raimundo Nonato, por, gentilmente, permitir a utilização do esteromicroscópio de seu laboratório, instrumento essencial na última etapa do experimento.

A todos familiares e amigos que me incentivaram, apoiaram e, também, entenderam minha ausência, para execução deste trabalho. Aqueles que me ajudaram nas constantes idas e vindas ao Laboratório de Pesquisa em Fármacos.

A todas as pessoas que participaram, contribuindo para realização deste trabalho, direta ou indiretamente, meu agradecimento.

*“Com o tempo, os conceitos mudam...
os sonhos mudam...
os planos mudam...
a vida muda...
Mas não se mudam princípios e valores...
Mudei e continuo igual...
Assim é o ser humano: tão coerente em suas
contradições...”*

Jacky Correia

RESUMO

A Fitoterapia constitui uma forma de terapia medicinal que vem crescendo notadamente nestes últimos anos. Dentro desta perspectiva, o Brasil, em especial a Amazônia, apresenta um grande potencial, considerando sua biodiversidade, pois detém, aproximadamente, um terço da flora mundial. O óleo-resina de copaíba é um importante produto natural usado na medicina popular e vários estudos têm comprovado sua atividade anti-inflamatória e antimicrobiana. Com o aumento da resistência microbiana aos tratamentos medicamentosos de rotina, de fato, faz-se necessário a busca de novos agentes antimicrobianos eficazes e seguros. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do óleo-resina de copaíba (*Copaifera duckei* Dwyer), veiculado em creme vaginal, sobre a performance reprodutiva de ratas Wistar (*Rattus norvegicus*). Para tanto, três grupos (n=5-6/grupo) de ratas foram tratados, 1- Creme Vaginal do óleo-resina de Copaíba (28,6 mg/kg), 2- Creme Vaginal Base e 3- Controle (Soro fisiológico 0,9 %), via intravaginal, durante 30 dias antes da prenhez e após, desde o dia Zero até o 20º dia. No 21º dia de prenhez, procedeu-se a laparotomia e, em seguida, foram determinadas as variáveis reprodutivas: número de fetos vivos e mortos, massa dos fetos e das placentas, número de implantações e reabsorções, número de corpos lúteos, perda pré e pós-implantação, e análises dos fetos quanto às anomalias e/ou malformações externas e internas (esquelética e visceral). Os resultados deste estudo demonstraram ausência de toxicidade materna e embriofetotoxicidade na dose administrada, correspondente a 10 vezes a dose que será usada em humanos. Assim, não foi observada nenhuma diferença estatística, significativa, entre os grupos tratados e controle nas variáveis analisadas. Desta forma, conclui-se que o creme vaginal com óleo-resina de copaíba a 2,5 % é seguro, durante a gestação, em ratas da linhagem Wistar.

Palavras-chave: Biodiversidade, óleo-resina de copaíba, *Copaifera duckei* Dwyer, performance reprodutiva.

ABSTRACT

Phytotherapy is a medical therapy that has been growing remarkably in recent years. Within this perspective, Brazil, in particular the Amazon, has great potential and its biodiversity, it has approximately one third of the world's flora. The oil-resin of Copaiba is an important natural product used in folk medicine and many studies have proven its anti-inflammatory and antimicrobial activities. With the growing resistance to the medication routine treatment, in fact, it is necessary to search for new antimicrobial agents, effective and safe. The aims of this study was to evaluate the effects of oil-resin of Copaiba (*Copaifera duckei* Dwyer), aired in vaginal cream on the reproductive performance of female rats (*Rattus norvegicus*). In order to do this evaluation, three groups (n = 5-6 in each group) of rats were treated, 1 - Vaginal Cream oil-resin of Copaiba (28.6 mg / kg), 2 - Vaginal Cream Base and 3 - Control (Saline 0.9 %), intravaginally for 30 days before and after pregnancy, from day zero until day 20. At day 21 of pregnancy, it was proceeded to laparotomy and then were measured reproductive variables: number of live and dead fetuses, weight of fetuses and placentas, number of implantations and resorptions, number of corpora lutea, pre-and loss post-deployment, and analysis of fetuses as the anomalies and / or external and internal malformations (skeletal and visceral). The results of this study showed the absence of maternal toxicity and Embryo in the administered dosage, corresponding to 10 times the dosage that will be used in humans. Thus, there was no significant statistical difference between the treated and control groups in the variables analyzed. Thus, it is concluded that vaginal cream with oil-resin of Copaiba to 2.5 % is safe during pregnancy in Wistar rats.

Keywords: Biodiversity, oil-resin of Copaiba, *Copaifera duckei* Dwyer, reproductive performance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura dos principais sesquiterpenos presentes no óleo-resina de <i>Copaifera spp.</i>	16
Figura 2. Estrutura dos principais ácidos diterpênicos presentes no óleo-resina de <i>Copaifera spp.</i>	17
Figura 3. Cromatograma do padrão <i>trans</i> -cariofileno obtido em Cromatógrafo Gasoso 6850 (Agilent®) acoplado a Espectrômetro de Massa 5973 (CG-EM).	23
Figura 4. Perfil de fragmentação do padrão <i>trans</i> -cariofileno, obtido em Cromatógrafo Gasoso 6850 (Agilent®) acoplado a Espectrômetro de Massa 5973 (CG-EM).	24
Figura 5. Curva de calibração do padrão <i>trans</i> -cariofileno, coeficiente de correlação 0,997975237; inclinação da reta 3,58189E-05.	25
Figura 6. Ovário direito (A) e esquerdo (B) de ratas, retirados para a contagem de corpos lúteos (observar a ponta da seta).	31
Figura 7. Fetos de ratas e suas respectivas placentas após a laparotomia.	31
Figura 8. Secções seriadas de um feto, de rata, processado para análise das vísceras, conforme Wilson (1965).	33
Figura 9. Feto de uma rata processado para análise esquelética, conforme o método de Staples e Schell (1964).	36
Figura 10. Cromatograma do óleo-resina de copaiba (FR 3340) esterificada pelo método H&L, obtido em Cromatógrafo Gasoso 6850 (Agilent®) acoplado a Espectrômetro de Massa 5973 (CG-EM).	37
Figura 11. Cromatograma do óleo-resina de copaíba (FR 3340) esterificado pelo método IUPAC, obtido em Cromatógrafo Gasoso 6850 (Agilent®) acoplado a Espectrômetro de Massa 5973 (CG-EM).	38
Figura 12. Cromatograma do óleo-resina de copaíba (RF 3340) não esterificado, obtido em Cromatógrafo Gasoso 6850 (Agilent®) acoplado a Espectrômetro de Massa 5973 (CG-EM).	38
Figura 13. Cromatograma do padrão <i>trans</i> -cariofileno, esterificado pelo método IUPAC, obtido em Cromatógrafo Gasoso 6850 (Agilent®) acoplado a Espectrômetro de Massa 5973 (CG-EM).	39
Figura 14. Cromatograma do padrão <i>trans</i> -cariofileno, não esterificado, obtido em Cromatógrafo Gasoso 6850 (Agilent®) acoplado a Espectrômetro de Massa 5973 (CG-EM).	40
Figura 15. Cromatograma do Branco utilizado no método de esterificação IUPAC, obtido em Cromatógrafo Gasoso 6850 (Agilent®) acoplado a Espectrômetro de Massa 5973 (CG-EM).	40
Figura 16. Cromatograma e análise quantitativa do óleo-resina de <i>C. duckei</i> Dwyer, obtido em Cromatógrafo Gasoso 6850 (Agilent®) acoplado a Espectrômetro de Massa 5973 (CG-EM).	42

- Figura 17.** Evolução do ganho de pesos das ratas, expresso em gramas (g), dos grupos Controle, TCVB e TCVC, de acordo com o dia de prenhez. As colunas representam as médias e o desvio padrão da variável peso de n = 5-6/grupo. 43
- Figura 18.** Útero de uma rata do grupo TCVC. Após duas horas em solução NaOH 0,2 %, um ponto de implantação invisível foi revelado, NaOH (+) (observar a ponta da seta). 46
- Figura 19.** As colunas representam as médias e o respectivo desvio padrão da variável reabsorção nas ratas do grupo Controle, TCVB e TCVC de n = 5-6/grupo. 47
- Figura 20.** Recém-nascido Adequado para a Idade de Prenhez - AIP (A) e Pequeno para Idade de Prenhez - PIP (B). 48
- Figura 21.** Porcentagem (%) de recém-nascidos pequenos (PIP), adequados (AIP) e grandes (GIP) para idade de prenhez em ratas tratadas com creme vaginal de copaíba (TCVC), creme base (TCVB) e controle..... 49
- Figura 22.** Recém-nascido do grupo TCVB com falanges normais (A), e com agenesia de falanges (B) (observar a ponta da seta). 52
- Figura 23.** Recém-nascido do grupo Controle com esternébrios normais (A), e com o 5º esternébrio em borboleta (B) (observar a ponta da seta). 52
- Figura 24.** Secção da cabeça, evidenciando os dois ventrículos laterais normais, de um recém-nascido do grupo Controle (A), e de um do grupo TCVB, com ventrículo lateral fechado (B) (observar a ponta da seta). 54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Pesos (g) das ratas, dos grupos Controle, Creme Vaginal Base e Creme Vaginal de Copaíba, expresso em média e desvio padrão, de acordo com o dia de prenhez.	43
Tabela 2. Número de ratas acasaladas, prenhez a termo e taxas de perda (%) pré e pós-implantação do blastocisto nas ratas prenhes dos grupos Controle, TCVB e TCVC.	44
Tabela 3. Peso dos filhotes (Peso Fetal), expresso em média e desvio padrão, das ratas dos grupos Controle, TCVB e TCVC.	45
Tabela 4. Peso das Placentas (Peso Placentário), expresso em média e desvio padrão, das ratas dos grupos Controle, TCVB e TCVC.	45
Tabela 5. Índice Placentário (IP), obtido pela razão entre cada Peso Placentário e respectivo Peso Fetal das ratas dos grupos Controle, TCVB e TCVC.	46
Tabela 6. Porcentagem (%) de recém-nascidos Pequenos (PIP), Adequados (AIP) e Grandes (GIP) para Idade de Prenhez, de ratas Tratadas com Creme Vaginal de Copaíba (TCVC), Creme Base (TCVB) e Controle.	48
Tabela 7. Média e desvio-padrão dos pontos de ossificação de recém-nascidos de ratas do grupo Controle, TCVB e TCVC.	50
Tabela 8. Freqüências de anomalias e malformações externas, esqueléticas e viscerais conforme em ninhadas e recém-nascidos de ratas dos grupos Controle, TCVB e TCVC.	51
Tabela 9. Percentual (%) de malformações e anomalias externas e esqueléticas de recém-nascidos das ratas do grupo Controle, TCVB e TCVC.	53
Tabela 10. Percentual de malformações e anomalias viscerais de recém-nascidos de ratas do grupo Controle, Creme Vaginal Base (TCVC) e Creme Vaginal de Copaíba (TCVC).	54

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	2
2.1. Geral	2
2.2. Específicos	2
3. REVISÃO DA LITERATURA	3
3.1. Biodiversidade, Uso Sustentável e os Produtos Naturais	3
3.2. Plantas Medicinais e os Produtos Naturais no Mercado Farmacêutico	4
3.3. Indústria Farmacêutica e Legislação de Medicamentos Fitoterápicos	7
3.4. Infecções Ginecológicas na Gravidez	9
3.5. Óleo-resina de Copaíba	10
3.5.1. Histórico da Planta “Copaíba”	11
3.5.2. Aspectos Botânicos e Distribuição do Gênero <i>Copaifera</i>	11
3.5.3. Produção, Obtenção e Variações Sazonais do Óleo-resina	12
3.5.4. Métodos de Coleta do Óleo-resina	13
3.5.5. Ações Farmacológicas do Óleo-resina de Copaíba	14
3.5.6. Composição Química de <i>Copaifera spp</i>	16
3.5.6.1. A Espécie <i>Copaifera duckei</i> Dwyer e seus Principais Compostos	17
3.6. Toxicologia Reprodutiva	18
3.6. 1. Toxicologia Reprodutiva de Produtos Naturais	20
4. MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1. Obtenção do Óleo-resina	22
4.2. Análise do Óleo-resina de Copaíba por Cromatografia Gasosa	22
4.2.1. Parâmetros do Equipamento CG-MS	22
4.2.2. Identificação dos Compostos	23
4.2.3. Preparo da Amostra	24

4.2.4 Construção da Curva de Calibração	25
4.3. Preparação do Creme Vaginal de Copaíba.....	27
4.4. Ensaio Biológico	28
4.4.1. Animais.....	28
4.4.2. Grupos Experimentais	28
4.4.3. Seqüência Experimental	29
4.4.3. 1. Período de Adaptação	29
4.4.3. 2. Período de Acasalamento.....	29
4.4.3. 3. Período de Prenhez.....	30
4.4.3. 4. Cesárea	30
4.4.3. 5. Métodos de Avaliação	31
4.4.3. 5.1. Peso Materno	31
4.4.3. 5.2. Performance Reprodutiva Materna	32
4.4.3. 5.3. Teste para Confirmação dos Sítios de Implantações e de Reabsorções.....	32
4.4.3. 5.4. Peso e Classificação dos Recém-nascidos	32
4.4.3. 5.5. Peso das Placentas e Índice Placentário	33
4.4.3. 5.6. Análise das Malformações Externas.....	33
4.4.3. 5.7. Análise das Anomalias e Malformações Viscerais.....	33
4.4.3. 5.8. Análise das Anomalias e/ou Malformações Esqueléticas e Contagem dos Pontos de Ossificação	34
4.5. Análise Estatística	36
5. RESULTADOS.....	37
5.1. Análise do Óleo-resina de Copaíba por Cromatografia Gasosa	37
5.2. Peso Materno	42
5.3. Performance Reprodutiva Materna	44
5.4. Peso dos Fetos, das Placentas e Índice Placentário	44
5.5. Teste para Confirmação dos Sítios de Implantações e de Reabsorções	46
5.6. Peso e Classificação dos Recém-nascidos	47

5.7. Contagem dos Pontos de Ossificação.....	49
5. 8. Análise das Anomalias e Malformações Externas e Internas (esqueléticas e viscerais) ...	50
6. DISCUSSÃO	55
7. CONCLUSÃO	65
8. REFERÊNCIAS	66
9. BIBLIOGRAFIA.....	81

1. INTRODUÇÃO

As infecções do trato genital baixo têm sido a causa mais freqüente de consulta ginecológica (50-70 % das queixas). Acredita-se que todas as mulheres sexualmente ativas já tiveram pelo menos um episódio de vaginose bacteriana e/ou vulvovaginite. O aumento da resistência das bactérias aos antibióticos convencionais tem estimulado intensos esforços para desenvolver novos agentes antimicrobianos eficazes contra essas bactérias e fungos.

Atualmente, o conhecimento tradicional, principalmente, sobre os produtos da biodiversidade amazônica, tem se tornado um importante instrumento no desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos. Apesar da existência de vários cremes vaginais no mercado, o óvulo de copaíba nunca deixou de ser utilizado pela população.

A ação anti-inflamatória e antimicrobiana do óleo de copaíba já estão comprovadas, no entanto, ainda não está bem estabelecida a relação entre a composição química e suas atividades, dificultando sua validação como fitoterápico. Neste contexto, é importante ressaltar que o uso dessas preparações não pode ser utilizado de maneira indiscriminada pela população, pois além dos estudos que comprovam a ação desses medicamentos, são necessários, ainda, estudos toxicológicos para avaliar a segurança do medicamento fitoterápico.

A toxicologia reprodutiva é um ramo da toxicologia que procura avaliar os efeitos toxicológicos de determinadas substâncias sobre a prole. Por exemplo, buscar identificar se um medicamento, utilizado por mulheres gestantes, poderá causar danos à saúde da mãe ou do feto. A *Food and Drugs Administration* (FDA) preconiza a realização de testes de toxicidade reprodutiva para avaliar os efeitos de uma substância química sobre o processo de reprodução dos mamíferos. Esses ensaios, geralmente, compreendem a exposição de animais sexualmente maduros antes da concepção, durante o desenvolvimento pré-natal e após o nascimento e, continuamente até sua maturação sexual, dependendo do protocolo experimental.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Avaliar a performance reprodutiva, à nível pré-clínico, de animais tratados com creme vaginal do óleo-resina de copaíba.

2.2. Específicos

- Comparar o ganho de peso em ratas prenhes, normais, tratadas com creme vaginal base e tratada com creme vaginal do óleo de copaíba;
- Comparar as taxas de prenhez a termo e de perda pré e pós-implantação em ratas prenhes normais, tratadas com creme vaginal base e tratadas com creme vaginal do óleo de copaíba;
- Comparar o peso médio dos recém-nascidos e das placentas, o índice placentário e o percentual de recém-nascidos pequenos (PIP), adequados (AIP) e grandes (GIP) para a idade de prenhez em ninhadas de ratas prenhes normais, tratadas com creme vaginal base e tratadas com creme vaginal de copaíba;
- Comparar a frequência de anomalias e malformações externas e internas (esqueléticas e viscerais) em ninhadas de ratas prenhes normais, tratadas com creme vaginal base e tratadas com creme vaginal do óleo copaíba.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Biodiversidade, Uso Sustentável e os Produtos Naturais

A biodiversidade pode ser definida por apresentar variedade e a variabilidade existente entre organismos vivos e as complexidades ecológicas (SANDES; DIBLASI, 2000). Segundo Dias (2000), a biodiversidade é uma das propriedades fundamentais da natureza, responsável pelo equilíbrio e estabilidade dos ecossistemas e fonte de imenso potencial de uso econômico. A participação desta diversidade, cada vez maior, nos produtos diretos ou indiretos da economia mundial, tem obrigado, também, a considerar estes recursos do ponto de vista do planejamento estratégico (RODRIGUES, 2003). Todavia, a crescente devastação dos ecossistemas tem levado a uma gradual e irreversível perda de espécies, sem que haja tempo e recursos para estudar suas potencialidades (FERREIRA, 2000).

O Brasil é considerado o primeiro em megadiversidade, tanto em número de espécies quanto em níveis de endemismo (ALBAGLI, 2001). As plantas, por exemplo, por estarem na base dos ecossistemas, são determinantes para que a maior diversidade seja detectada nos trópicos. Nesta região elas florescem com mais intensidade, por serem áreas quentes e úmidas, como é o caso da Amazônia (SANDES; DIBLASI, 2000).

No território brasileiro existem, aproximadamente, 60.000 espécies de plantas, o que corresponde a cerca de 20 % de toda a flora mundial, e não menos que 75 % de todas as espécies existentes nas grandes florestas (SANT'ANA; ASSAD, 2001). Com este número de espécies, não será difícil entender o porquê que nas florestas tropicais podem-se descobrir novos produtos naturais biologicamente ativos.

Estima-se que 25.000 espécies de plantas sejam usadas nas preparações da medicina tradicional. Entretanto, com o desconhecimento sobre a biodiversidade das florestas tropicais, como a Amazônia, torna-se óbvio que o uso dos produtos naturais e plantas medicinais ainda seja fragmentário e escasso. A imensa flora brasileira é praticamente desconhecida em termos químicos, pois menos de 1 % das plantas tropicais tiveram seus usos potenciais corretamente investigados. Diante deste panorama, pode-se imaginar o valor econômico de seu estudo (GARCIA, 1995).

Do ponto de vista brasileiro, acredita-se que sua biodiversidade apresenta amplo potencial. Ela pode vir a tornar-se uma vantagem comparativa do país no âmbito da geopolítica global, levando-se em conta: sua ampla disponibilidade de recursos biogenéticos,

a tradição de sua ciência na área biológica, além do acervo de conhecimentos tradicionais acumulados pelas populações locais e pertinentes para o acesso à natureza e para as aplicações dessa biodiversidade (ALBAGLI, 2001).

Desta forma, podemos dizer que a Amazônia, em particular, constitui um cenário territorial de suma importância, no que se refere aos desafios e aos impasses hoje colocados internacionalmente em torno da conservação e do uso sustentável da biodiversidade. Princípios de conservação e uso sustentável dos recursos naturais já estavam presentes nas políticas florestais desde o século XVIII, na Europa e depois na Índia. Contudo, somente na metade do século XX é que esses princípios passaram a ser utilizados no âmbito global. O desmatamento descontrolado das florestas e as mudanças climáticas foram o motivo para o ressurgimento desses conceitos (ALBAGLI, 2001).

A idéia da conservação *stricto sensu* dos recursos da biodiversidade amazônica vem cedendo espaço, gradativamente, à consciência da necessidade de utilização sustentável dos recursos biológicos e da partilha de seus benefícios, associadas à preservação das espécies e dos ecossistemas. Assim, é de grande importância a valorização da diversidade biológica e da agregação de valor econômico aos produtos naturais provenientes dessa diversidade. O desenvolvimento tecnológico recente, especialmente com relação às novas tecnologias, abriu inúmeras oportunidades para investimento no aproveitamento sustentável dos recursos genéticos e da diversidade biológica em áreas de interesse químico, farmacêutico, agrícola e industrial (ODALIA-RÍMOLI *et al.*, 2000).

3.2. Plantas Medicinais e os Produtos Naturais no Mercado Farmacêutico

Há milhares de anos, o homem vem utilizando recursos da flora para tratar diversas patologias (TYLER, 1996). As plantas, segundo alguns autores, possuem um sistema imunológico rudimentar que proporciona o desenvolvimento de meios de defesa química contra o ataque de bactérias, fungos, protozoários, insetos e outros animais (ALENCAR, 1982; CARVALHO, 2004). Essas substâncias – os produtos naturais – são, na maioria das vezes, os metabólitos secundários das plantas. Na prática medicinal, esses produtos tornaram-se agentes terapêuticos e/ou profiláticos úteis (CARVALHO, 1998; CARVALHO, 2004).

O estudo das plantas medicinais iniciou-se, praticamente, no princípio da evolução do homem sobre a terra. Ele passou a perceber que certas espécies de plantas eram capazes de curar e que outras não serviam para o consumo alimentício e tratamento de enfermidades, por serem tóxicas. Esse conhecimento adquirido pelo homem primitivo deu-se,

provavelmente, a partir de um processo de tentativa e erro. Pode-se dizer, portanto, que a descoberta das propriedades farmacológicas e a identificação da toxicidade das plantas são processos que caminham juntos ao longo da história (BENDAZZOLI, 2000).

Com o passar do tempo, determinadas plantas tiveram suas propriedades terapêuticas identificadas e foram propagadas de geração em geração, fazendo parte da cultura popular. O óleo de copaíba, por exemplo, é tradicionalmente utilizado pelas comunidades da região amazônica como cicatrizante, antisséptico e anti-inflamatório, fazendo parte das farmacopéias britânica e americana desde os séculos XV e XVII, respectivamente (MAIMOM, 2000). No século XIX, muitas plantas passaram a fazer parte das farmacopéias alopáticas e homeopáticas, momento em que de fato começou-se a investigar suas bases terapêuticas (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006).

Em 1803, após o isolamento da *Papaver somniferum*, deu-se início ao processo de extração de princípios ativos de plantas. A partir de então outras substâncias foram isoladas, passando a serem utilizadas em substituição aos extratos vegetais, uma vez que, havia muita dificuldade no controle químico, físico-químico, farmacológico e toxicológico dos extratos vegetais (TYLER, 1996). Essas dificuldades, aliados à ausência de comprovações científicas sobre a sua eficácia, contribuíram para que esses medicamentos, de uso quase exclusivo até 1950, fossem gradativamente substituídos nas farmácias por medicamentos contendo as substâncias ativas extraídas ou seus derivados sintéticos (RATES, 2001).

O crescimento do poder econômico das indústrias farmacêuticas culminou com a produção de fármacos via síntese química. No entanto, mesmo com o desenvolvimento de grandes laboratórios farmacêuticos e dos medicamentos obtidos por síntese, as plantas medicinais permaneceram como forma alternativa em várias partes do mundo. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), 65 a 80 % da população dos países em desenvolvimento dependem, essencialmente, das plantas como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde (WHO, 2002). Este fato deve-se à pobreza e ao pouco acesso à medicina moderna (CALIXTO, 2005). É nesse contexto social que as plantas medicinais e os fitoterápicos adquirem importância como agentes terapêuticos.

A OMS define que planta medicinal é “todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semissintéticos” (WHO, 2002). A diferença entre planta medicinal e fitoterápico reside na elaboração da planta para uma formulação específica, o que caracteriza um fitoterápico. Segundo a Agência Nacional de Vigilância em Saúde (ANVISA), em sua resolução, RDC nº. 48 de 16 de março de 2004 (BRASIL, 2009a), fitoterápico é “todo

medicamento tecnicamente obtido e elaborado, empregando-se exclusivamente matérias-primas vegetais, com finalidade profilática, curativa ou para fins de diagnóstico, com benefício para o usuário. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos do seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade”. É o produto final acabado, embalado e rotulado. Na sua preparação podem ser utilizados adjuvantes farmacêuticos permitidos na legislação vigente.

Nas últimas décadas observou-se a revalorização do emprego de preparações fitoterápicas. Assim, alguns grupos farmacêuticos passaram a desenvolver esforços voltados para o aprimoramento de medicamentos fitoterápicos e sua produção em escala industrial. O novo avanço desses medicamentos, longe de ser volta ao passado, caracteriza-se pela busca de produção em escala industrial, diferentemente das formas artesanais que caracterizavam os estágios iniciais de sua utilização (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006).

Além disso, apesar da indústria farmacêutica empregar as mais diferentes técnicas, tal como, a biologia molecular, química combinatória e a química computacional, os produtos naturais são sintetizados mediante um processo de química combinatória inigualável, a evolução biológica e seleção natural, que proporciona uma diversidade estrutural das moléculas para diferentes alvos biológicos (MCCHESENEY, 2007). Das vantagens do emprego de preparações fitoterápicas, a mais importante é a existência de uma ação combinada de seus constituintes, reduzindo os efeitos colaterais e secundários, uma vez que a resposta não é devida a uma simples e forte ação. Talvez isso explique porque na Alemanha se prescreve 200 vezes mais o *Hypericum* do que o fármaco fluoxetina no tratamento de depressões leves (TYLER, 1997).

Outra vantagem em se investir em medicamentos fitoterápicos é a diminuição do tempo de pesquisa e o menor custo frente aos fármacos sintéticos. Estima-se que o desenvolvimento de um novo medicamento fitoterápico gire em torno de 2 % a 3 % do previsto para o desenvolvimento de um medicamento sintético (SANT’ANA, 2002). O custo de um medicamento originado a partir de plantas medicinais gira em torno de 35 milhões de dólares. Já a descoberta de um novo medicamento sintético varia de 500 a 800 milhões de dólares, podendo levar entre sete a vinte anos de pesquisa para chegar ao mercado (SANT’ANA, 2002; MCCHESENEY, 2007).

Atualmente, os fitoterápicos são amplamente utilizados, com crescimento em torno de 10 % a 20 % de suas vendas em vários países. Como exemplo, nos últimos 10 anos as florestas tropicais foram responsáveis por fornecer matéria prima que resultou na produção de 60 % das novas drogas utilizadas para o tratamento do câncer (NEWMAN; GRAG, 2007;

MCCHESENEY, 2007). Cerca de $\frac{1}{4}$ do mercado brasileiro de medicamentos corresponde ao uso de produtos de origem natural (SANT'ANA, 2002).

A produção de medicamentos fitoterápicos demanda valores que podem ser facilmente enfrentado pelas empresas farmacêuticas brasileiras. Na África, por exemplo, 80 % da população dependem do uso destes medicamentos, os quais representam alternativa para diminuição dos custos. O mercado mundial de medicamentos fitoterápicos é de U\$\$ 43 bilhões por ano. Se a este valor for incluída a economia informal da utilização popular de plantas medicinais nos países em desenvolvimento, este valor poderá alcançar a ordem de algumas centenas de bilhões de dólares por ano (GARCIA, 1995).

3.3. Indústria Farmacêutica e Legislação de Medicamentos Fitoterápicos

A indústria farmacêutica global representa 33 % da produção de químicos, negociando valores da ordem de U\$\$ 280 bilhões. Desse total, 65 % dos medicamentos são preparados em laboratórios, sendo 25 % deles oriundos de plantas e 10 % fabricados a partir de microorganismos (MACHADO, 2001).

Em uma revisão realizada por Newman e Grag (2007) sobre novas drogas inseridas no mercado, durante 25 anos, podemos observar a importância dos produtos naturais no mercado farmacêutico. Os dados demonstraram que 6 % dessas drogas foram originárias, exclusivamente, de produtos naturais e 28 % foram derivadas desses produtos (semissíntese). Se juntarmos com mais 5 % de drogas obtidas a partir de síntese (com grupo farmacofórico oriundo de um produto natural), mais 12 % de drogas que mimetizam a partir de síntese um produto natural (incluindo grupo farmacofório obtido de um produto natural) e 12 % de drogas sintéticas (que mimetizam produtos naturais), temos um total de 63 % versus 37 % daqueles obtidos, somente, a partir de síntese química com *screening* farmacológico randomizado.

Os dados sobre a venda de fitoterápicos são imprecisos. Alguns autores indicam que o faturamento mundial dessa indústria encontra-se ao redor de U\$\$ 21 bilhões. No mercado brasileiro, estima-se um consumo anual atingindo de 7 a 10 % do mercado de medicamentos, correspondendo a valores entre U\$\$ 700 milhões a U\$\$ 1 bilhão (SANTOS, 2003).

No Brasil, em 2006 foi aprovada a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (decreto nº 5.813) que regulamenta o uso desses na rede pública de saúde (BRASIL, 2008). Isso beneficia e incentiva os investimentos nas áreas de pesquisas com

espécies vegetais. Contudo, para um medicamento fitoterápico ser lançado no mercado, há necessidade de cumprir as várias legislações envolvidas, uma delas é a Resolução RE nº 90 de 16 de março de 2004 (BRASIL, 2009b), que determina a publicação da guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos para avaliação dos riscos associado ao uso do medicamento. Para um medicamento atingir as fases de ensaios clínicos com seres humanos (fase I, II, III e IV) deve ter sido exposto aos ensaios pré-clínicos para determinações da farmacodinâmica, da farmacocinética e da toxicidade (LAPA *et al*, 2003).

Neste contexto é importante ressaltar que antes da resolução RE nº 90 de 16 de março de 2004, a legislação para medicamentos fitoterápicos já vinha sofrendo modificações nos últimos anos (BRASIL, 2009b). A ANVISA elaborou normas para a regulamentação destes medicamentos, desde a portaria nº 6 de 1995, que estabeleceu prazos para que as indústrias farmacêuticas apresentassem dados de segurança e eficácia desses medicamentos, passando pela RDC nº 17 de 2000 (BRASIL, 2009c), e a Resolução RDC nº 48 de 16 de março de 2004, atualmente em vigor, que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos (BRASIL, 2009a).

Essa normatização dos medicamentos fitoterápicos propicia a avaliação de aspectos importantes, como a eficácia e a segurança para o uso destes medicamentos. Desta forma, para comercializar um produto fitoterápico que tenha indicações profiláticas e/ou terapêuticas, a ANVISA exige o cumprimento de um processo denominado teste de validação. Esse processo consiste da realização de ensaios físico-químicos, microbiológicos, analíticos, farmacológicos e toxicológicos.

A toxicidade de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos é um sério problema de saúde pública. Os efeitos adversos, possíveis alterações e toxidez, bem como a ação sinérgica (interação com outras drogas) ocorrem comumente. As pesquisas realizadas para a avaliação do uso seguro de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil ainda são incipientes, assim como o controle da comercialização pelos órgãos oficiais em feiras livres, mercados públicos ou lojas de produtos naturais (VEIGA-JÚNIOR; PINTO, 2005).

A OMS reconhece a importância do uso tradicional, mas para a utilização de uma planta com finalidade terapêutica, em nível de saúde pública, é fundamental o estabelecimento de sua segurança, eficácia e garantia de qualidade das preparações (RATES, 2001; WHO, 2002; LAPA *et al.*, 2003). Além disso, um grupo populacional, o de gestantes, que culturalmente recorre ao uso de plantas medicinais deve ser considerado. A utilização de preparações fitoterápicas nesse grupo pode gerar riscos a saúde, podendo ocorrer graves conseqüências, tanto para a mãe como para o feto (HANCOCK *et al*, 2008). Nesse caso,

embora raros, os estudos toxicológicos bem controlados são necessários, inclusive durante o período gestacional. Devem-se utilizar os mesmos cuidados dos medicamentos alopáticos para comprovar a sua segurança (WU *et al.*, 2008).

3.4. Infecções Ginecológicas na Gravidez

A vaginose bacteriana e a vulvovaginite representam distúrbios ginecológicos extremamente comuns em nosso meio, aproximadamente um terço das queixas, sendo causa freqüente de consulta médica (MURTA *et al.*, 2000; ADAD *et al.*, 2001; MARRAZZO, 2003). Sua sintomatologia pode ser bastante incômoda para as pacientes, pois além da queixa de corrimento genital, referem-se, também, ao odor vaginal desagradável, que se acentua durante a menstruação e depois do contato com o fluido seminal. Desta forma, compromete o equilíbrio biopsicossocial, perturbando inclusive o relacionamento sexual (MARRAZZO, 2003).

Entre os processos infecciosos vaginais mais freqüentes, destaca-se a vaginose bacteriana, candidíase vulvovaginal e tricomoníase (SOBEL, 1990). Além do desconforto da paciente, as vulvovaginites e vaginoses bacterianas se revestem de especial importância, devido às repercussões inerentes à infecção, tal como, ascensão dos agentes para o trato genital superior, aumentando o risco de doença inflamatória pélvica aguda (MARRAZZO, 2003). Outra complicação importante está relacionada à saúde reprodutiva, já que, durante a gravidez, a presença de vaginose associa-se a um risco aumentado de amniorrexe e parto prematuro, abortamento séptico e endometrite pós-cesárea (HILLIER *et al.*, 1995; MORAES FILHO; GOLDENBERG, 2001; CARVALHO *et al.*, 2001).

A vaginose bacteriana constitui infecção polimicrobiana, primariamente anaeróbica. Sua presença representa alteração da microbiota vaginal, ocorrendo significativa redução dos lactobacilos e elevação do pH (maior que 4,5), com crescimento exagerado de bactérias que podem ser encontradas, em baixa concentração, em mulheres normais, como *Gardnerella vaginalis*, *Mycoplasma hominis* e espécies de *Mobiluncus* e *Bacteroides* (MURTA *et al.*, 2000; ADAD *et al.*, 2001; MARRAZZO, 2003). O tratamento de primeira linha da vaginose bacteriana consiste em derivados imidazólicos (DUFF, 1993; KAZY *et al.*, 2005a).

Entre as vulvovaginites, *Candida albicans* é responsável por 85 % a 90 % dos casos de candidíase vulvovaginal, apesar da existência de outras espécies como *C. glabrata*,

C. tropicalis e *C. pseudotropicalis*, que também podem determinar quadros clínicos semelhantes, com prevalência nos casos crônicos, sendo comum apresentar resistência aos tratamentos habituais. Para o tratamento tópico da candidíase vaginal existem alguns fármacos disponíveis no mercado, como clotrimazol, fenticonazol, isoconazol, miconazol, nistatina, terconazol, tinidazol e tioconazol (KOROLKOVAS, 2007). O tratamento, no primeiro trimestre de gravidez, deve levar em conta o risco-benefício relacionado a saúde materna e organogênese fetal, apesar da baixa absorção sistêmica das drogas tópicas (ROSA *et al.*, 1987; KOROLKOVAS, 2007).

3.5. Óleo-resina de Copaíba

O óleo de copaíba é um importante produto natural utilizado na medicina tradicional. É comumente indicado como anti-inflamatório, antisséptico e cicatrizante, principalmente, das vias aéreas superiores e urinárias (LE COINTE, 1934; BASILE *et al.*, 1988; PIO-CORRÊA, 1998; CARVALHO; CASCON, 2003; CARVALHO *et al.*, 2005). A designação correta para o óleo da copaíba é a de óleo-resina, por ser um exudato constituído por ácidos resinosos e compostos voláteis. Também é chamado, de bálsamo de copaíba (BRUNETON, 1993), apesar de não ser um bálsamo verdadeiro, por não conter derivados do ácido benzóico ou cinâmico (PIO-CORRÊA, 1998).

O óleo-resina é um dos produtos naturais mais utilizados pela população da Amazônia brasileira, onde tem uma grande representação econômica e social, por ser nativo e ter várias comunidades dependentes de seu extrativismo (SANTOS *et al.*, 2001). Sua aplicação na ginecologia não é recente, pois os óvulos de copaíba estão nas prateleiras de farmácias e lojas de produtos naturais em todo o Brasil há muitos anos. Apesar da existência de vários medicamentos no mercado para o tratamento, o óvulo de copaíba nunca deixou de ser utilizado pela população (CARVALHO; GREGORI, 2005).

Alguns autores relatam que o óleo-resina é um produto da desintoxicação do organismo vegetal e funciona como defesa da planta contra animais, fungos e bactérias (ALENCAR, 1982; MACEDO; LANGENHEIM 1989). É um líquido transparente cuja coloração varia do amarelo ao marrom. Para a utilização farmacológica os óleos mais escuros e viscosos são os preferidos (RODRIGUES, 1989). Segundo Lawrence (1980) as espécies botânicas mais, freqüentemente, utilizadas na produção de óleo são: *C. reticulata* (70 %), *C. guianensis* (10 %), *C. multijuga* (5 %) e *C. officinalis* (5 %).

3.5.1. Histórico da Planta “Copaíba”

A origem do nome copaíba relaciona-se ao tupi “cupa-yba”, que significa árvore de depósito, ou que tem jazida, em alusão clara ao óleo-resina que guarda em seu interior. Popularmente conhecidas como copaibeiras ou pau d’óleo, as espécies de copaíba são largamente distribuídas nas regiões amazônicas e centro-oeste do Brasil, sendo o óleo-resina extraído de várias espécies do gênero *Copaifera* (VEIGA-JÚNIOR; PINTO, 2002).

A utilização do óleo-resina como agente anti-inflamatório e cicatrizante é reportada desde o século XVI, quando os primeiros colonizadores das Américas relataram que as índias aplicavam este óleo no umbigo dos recém-nascidos e os guerreiros, após as batalhas, em seus ferimentos (SALVADOR, 1975). Na Europa, foi introduzido como droga contra a blenorragia no século XVII, tendo sido listado na *London Pharmacopéia* de 1677 e em todas as edições da USP de 1820 a 1840, quando foi admitido no *National Formulary*. Ao longo dos anos, passou a ser um dos produtos mais utilizados, principalmente, pela população da Amazônia brasileira, que em sua grande maioria não tem acesso a produtos farmacêuticos e a serviços de saúde.

O óleo de copaíba já ocupou o segundo lugar nas exportações brasileiras de drogas medicinais no século passado (ARRUDA, 1980; TAPPIN *et al.*, 2004). Hoje, não há informações suficientes disponíveis sobre a exportação desse óleo. Entretanto, sabe-se que, após a coleta, o óleo é levado até as grandes cidades da Região Amazônica, de onde é exportado diretamente, sendo eventualmente comercializado por laboratórios farmacêuticos brasileiros, especialmente da região Sudeste (VEIGA-JÚNIOR, 1997). Cerca de 20 toneladas de óleo são exportadas para os Estados Unidos e Europa (FERREIRA *et al.*, 1993)

3.5.2. Aspectos Botânicos e Distribuição do Gênero *Copaifera*

As copaibeiras pertencem ao gênero *Copaifera* L, família Fabaceae, subfamília Caesalpinioidea. Elas são árvores de crescimento lento, medem 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 (SILVA *et al.*, 2008).

As folhas são alternadas, pecioladas e penuladas. Os frutos contêm uma semente ovóide envolvida por um arilo abundante e colorido. As flores são pequenas, apétalas, hermafroditas e arrançadas em panículos axilares. A floração e frutificação das copaibas

ocorrem a partir dos 5 anos de idade, em plantios (SILVA *et al.*, 2008). A identificação botânica utilizando as características das flores da copaíba é difícil, dado o curto período em que ocorrem e a elevada altura das árvores (TAPPIN *et al.*, 2004).

As árvores de copaíba são nativas da região tropical da América Latina e também da África Ocidental. Na América Latina são encontradas espécies na região que se estende do México ao norte da Argentina (VEIGA-JÚNIOR; PINTO, 2002). O gênero *Copaifera* possui 72 espécies, sendo que 16 destas só são encontradas no Brasil (DWYER, 1951). Entre as espécies mais abundantes, destacam-se: *C. officinalis* L. (norte do Amazonas, Roraima, Colômbia, Venezuela e San Salvador) (ANDRADE- JÚNIOR *et al.*, 2000), *C. guianensis* Desf. (Guianas), *C. reticulata* Ducke, *C. multijuga* Hayne (Amazônia), *C. confertiflora* Bth (Piauí), *C. langsdorffii* Desf. (Brasil, Argentina e Paraguay), *C. coriacea* Mart. (Bahia), *C. cearensis* Huber ex Ducke (Ceará) (PIO-CORRÊA, 1931; MORS; RIZZINI, 1966; PERROT, 1994).

No território brasileiro ocorrem mais de vinte espécies do gênero *Copaifera*, podendo predominar uma espécie em determinada região, no entanto, comumente, coexistem várias (CASCON; GILBERT, 2000; LEITE *et al.*, 2001; VEIGA- JÚNIOR; PINTO, 2002).

3.5.3. Produção, Obtenção e Variações Sazonais do Óleo-resina

Devido à grande quantidade de aplicações, muitos estudos silviculturais de regeneração natural das árvores, germinação e produção foram realizados para avaliar o potencial de produção do óleo-resina (ALENCAR 1982; 1988). A presença de substâncias químicas em uma determinada espécie pode estar atrelada a sua sazonalidade, variando conforme o ambiente, principalmente, aqueles ligados a fatores climáticos (OLIVEIRA *et al.*, 2006). Nas espécies de *Copaifera* essa relação existe, pois a concentração das substâncias variam em função da temperatura, radiação solar, precipitação pluviométrica, quantidade de nitrogênio no solo e outros. Contudo, a composição química parece ser mais sensível a fatores bióticos externos, tal como: a injúria provocada por insetos ou fungos do que a própria luminosidade (LANGENHEIM, 1994). Algumas árvores praticamente não exudam óleo ou o fazem em quantidades muito pequenas para coleta (o que os mateiros chamam de “árvores macho”).

Alencar (1982) conduziu um estudo realizado com *C. multijuga*, com retiradas periódicas de óleo de copaíba, no qual se observou a obtenção de maiores quantidades de óleo na estação chuvosa em árvores localizadas em terreno argiloso. Todavia, Oliveira *et al.* (2006)

relatam que as maiores produções de óleo de *C. reticulata* e *C. duckei* coincidem com o período de menor precipitação pluviométrica e a menor produção ocorre, principalmente, no período mais chuvoso.

Também são notáveis variações quali e quantitativas de uma única espécie produtora. Estas variações sazonais e a variabilidade química inter e intra espécies apontam para a necessidade de se estabelecer padrões de controle deste óleo-resina (VEIGA- JÚNIOR, 1997; CASCON; GILBERT, 2000). Como produto florestal primário, a exploração do óleo-resina de copaíba apresenta algumas características originárias de seu manejo que vão definir, em última instância, as possibilidades de suas aplicações industriais e, portanto, estabelecer o seu padrão de qualidade para o mercado (LEITE *et al.*, 2001).

A existência de mais de 20 espécies de *Copaifera* no Brasil faz com que seu óleo-resina, comercializado nos mercados regionais, sejam provenientes de misturas de algumas espécies ocorrentes na área de coleta. Veiga Júnior. *et al.* (1997) desenvolveram métodos analíticos, baseados no uso das técnicas de Cromatografia Gasosa de Alta Resolução (CGAR) e Cromatografia Gasosa de Alta Resolução acoplada à Espectrometria de Massa (CG-EM), para controle da autenticidade do óleo-resina de copaíba.

Vasconcelos e Godinho (2002) desenvolveram alguns parâmetros analíticos simples, como a determinação da acidez e do teor de ésteres, tornando-se uma alternativa para laboratórios pequenos. Esses parâmetros podem favorecer o controle de qualidade, contudo, evitam apenas aquelas adulterações grosseiras. Em geral, alguns laboratórios de medicamentos fitoterápicos no Brasil não utilizam nenhuma dessas metodologias analíticas, comprometendo a qualidade desse produto.

3.5.4. Métodos de Coleta do Óleo-resina

Tradicionalmente, coexistem vários métodos para a retirada do óleo-resina de copaíba, tais como: cortes a machado no tronco, a incisão em V (semelhantemente a extração de borracha) e o método do arrocho. Este último consiste em selar o tronco, abaixo das incisões, com embiras e cipós e coletar o óleo da árvore até o seu esgotamento. Esses métodos foram abandonados, pois inutilizavam a árvore. Existe ainda outro método, pouco difundido, que consiste na retirada do óleo por meio de bomba de sucção (VEIGA- JÚNIOR; PINTO, 2002).

A única prática de coleta não agressiva é aquela realizada através de uma incisão com trado a cerca de 1 metro de altura do tronco (ALENCAR, 1982). Terminada a coleta, o

orifício é vedado com argila para impedir a infestação da árvore por fungos ou cupins. A argila pode ser facilmente retirada, permitindo que se façam outras coletas no mesmo tronco, obtendo-se quantidade de óleo igual ou mesmo superior ao da primeira retirada (VEIGA-JÚNIOR; PINTO, 2002).

O método utilizado pelos indígenas ainda é observado no interior do Brasil. Muitos procedimentos são considerados místicos, contudo, ainda hoje eles são seguidos por alguns silvícolas, pois na retirada do óleo não é permitido olhar diretamente para a árvore (para a copa), sob pena de a árvore secar e o óleo voltar para a terra (SALVADOR, 1975). A ascendência do óleo da terra é comumente relatada por mateiros no norte do país (VEIGA-JÚNIOR; PINTO, 2002).

Um estudo realizado por Medeiros e Vieira (2002) demonstrou que é possível extrair o óleo-resina de copaíba de maneira ecologicamente sustentável. Durante a coleta, é necessário que a incisão nas árvores tenha um diâmetro entre 30 e 41 cm, que pode levar a uma recuperação máxima de 100 % do óleo-resina em apenas um ano, contudo, árvores com diâmetros maiores irão requerer períodos maiores para recuperar o óleo-resina.

Apesar da existência de métodos de coleta de forma sustentável, atualmente, essas árvores acabam sendo derrubadas, obtendo-se uma extração não racional. Isso ocorre devido aos desmatamentos crescentes na Região Amazônica com interesse na madeira, transformando o óleo-resina de copaíba em subproduto da indústria madeireira (VEIGA-JÚNIOR; PINTO, 2002; PINTO; MADURO, 2003).

3.5.5. Ações Farmacológicas do Óleo-resina de Copaíba

Apesar do óleo-resina de *Copaifera spp.* ser muito utilizada como medicamento popular, os trabalhos de confirmação das suas atividades biológicas são ainda incompletos. Muitas substâncias são identificadas, mas ainda não está bem estabelecida a relação entre atividade e estrutura dos componentes das diversas espécies de *Copaifera*. Há casos em que os experimentos são realizados com óleo-resinas em estado bruto e de espécies indeterminadas, muitas vezes sem análise química das mesmas. Em geral, existem poucos trabalhos que fazem essa relação entre propriedades farmacológicas e substâncias químicas isoladas de óleos de *Copaifera spp.*

Na literatura já foram descritas várias aplicações farmacológicas, tais como, antimicrobiana e antibacteriana (OPDYKE, 1976; MIRANDA *et al.*, 2000; TINCUSI *et al.*, 2002; SANTOS *et al.*, 2008), anti-helmíntico (PELLEGRINO, 1967; GILBERT *et al.*, 1972),

analgésico (FERNANDES *et al.*, 1992; CARVALHO *et al.*, 2005), anti-inflamatório (BASILE *et al.*, 1988; FERNANDES *et al.*, 1992; VEIGA- JÚNIOR *et al.*, 2001; CARVALHO *et al.*, 2005), cicatrizante (BRITO *et al.*, 1999), gastroprotetora (PAIVA *et al.*, 1998), antitumoral (OHSAKI *et al.*, 1994; LIMA *et al.*, 2003) e tripanomicida (CASCON *et al.*, 1998).

A atividade anti-inflamatória e antimicrobiana são as mais investigadas. Estudos em ratos utilizando modelos de processo inflamatório, como edema induzido por carragenina, indução de tecido granulomatoso e bradicinina indicaram que o óleo-resina de copaíba apresenta atividade anti-inflamatória e baixa toxidez (DL₅₀ 3,79 mL/kg) (BASILE *et al.*, 1988). Lima *et al.* (2003), demonstraram que o óleo de *C. multijuga* apresenta atividade tumoricida em células de melanoma, tanto *in vivo* quanto *in vitro*. A atividade analgésica e anti-inflamatória de *C. duckei* demonstrou resultados significativos, sendo utilizada a via tópica de administração, nos testes de edema de pata induzido por carragenina, teste do granuloma e dermatite induzida pelo óleo de cróton (CARVALHO *et al.*, 2005). Em outro modelo experimental, indução de colite por ácido acético em ratos, observou-se que o ácido caurenóico, aplicado junto com o ácido acético, diminuiu o infiltrado de células inflamatórias e edema da mucosa intestinal sugerindo seu efeito anti-inflamatório (PAIVA *et al.*, 2003).

Santos *et al.* (2008) testaram a atividade antimicrobiana de oito espécies do gênero *Copaifera*. As espécies *C. martii*, *C. officinalis* e *C. reticulata* apresentaram boa atividade antibacteriana contra gram-positivos, incluindo cepas MRSA (Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*). Em contraste, todos os óleos testados foram inativos contra bactérias gram-negativas. A atividade antifúngica nas espécies *C. paupera*, *C. lucens*, *C. cearensis*, *C. langsdorffi* e *C. multijuga* demonstrou ser moderada.

A ação antimicrobiana pode estar associada, principalmente, aos componentes voláteis presentes no óleo-resina, uma vez que a atividade antimicrobiana desses compostos já está descrita na literatura (MUROI; KUBO, 1993; COWAN, 1999; SHAFIN *et al.*, 2002). O real mecanismo de ação antimicrobiano envolvendo terpenos ainda não está bem elucidado, mas acredita-se que estes compostos sejam capazes de destruir a membrana lipofílica da bactéria (COWAN, 1999). Os dados de um estudo realizado no Brasil, utilizando microscopia eletrônica, corroboram com esta hipótese, pois a membrana do *S. aureus* sofreu várias alterações, após o tratamento com o óleo-resina de *C. martii*, como perda da parede celular, resultando na liberação dos compostos citoplasmáticos, observados através da diminuição do volume celular (SANTOS *et al.*, 2008).

3.5.6. Composição Química de *Copaifera spp*

Óleo-resinas são soluções naturais de resinas dissolvidas em óleos essenciais, acumuladas em um tipo de aparelho secretor constituído por bolsas e/ou canais secretores esquizógenos (MACEDO; LANGENHEIM 1989). A fração de óleo essencial é composta basicamente de sesquiterpenos, predominante na maioria deles, e a fração resina de ácidos diterpênicos (VEIGA-JÚNIOR. *et al.*, 1995). Nos óleos-resina de copaíba estudados, os sesquiterpenos predominantes são α -copaeno, β -cariofileno, β -bisaboleno, α e β -selineno, α -humuleno e δ e γ -cadineno (Figura 1) (WENNINGER, *et al.*, 1967; FERRARI, *et al.*, 1971; CRAVEIRO, *et al.*, 1981; VEIGA-JÚNIOR, 1997; VEIGA-JÚNIOR; PINTO, 2002; CARVALHO *et al.*, 2005).

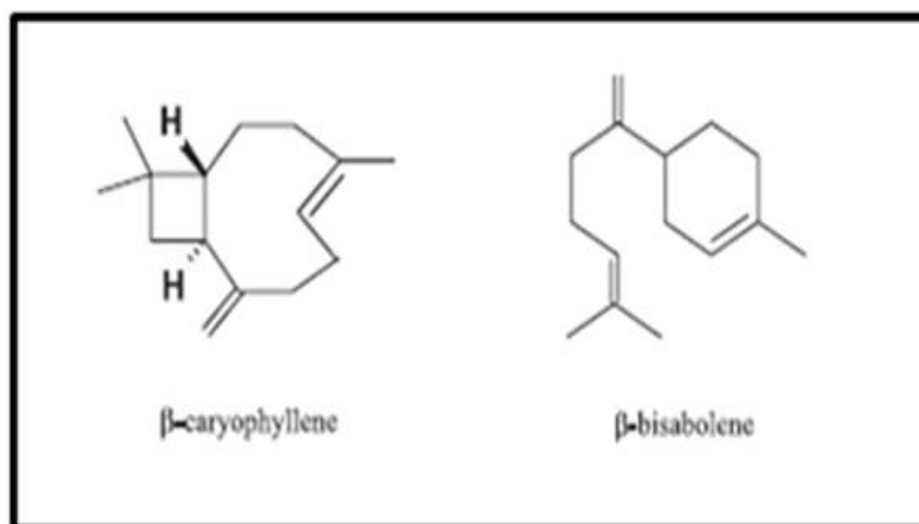


Figura 1. Estrutura dos principais sesquiterpenos presentes no óleo-resina de *Copaifera spp*.

Fonte: Adaptado de Carvalho *et al* (2005)

Têm-se conhecimento da presença de 28 diterpenos nos óleo-resinas de copaíba, divididas de acordo com o seu esqueleto: caurano, labdano e clerodano. Os clerodanos bicíclicos (ácidos hardwickiico, chrolequínico, kolavênico e outros) e cauranos tetracíclicos (ácidos kauran-19-óico e 16-kauren-19-óico) são encontrados em algumas espécies. Os labdanos bicíclicos (ácidos eperúico, catívico, copálico, eperu-8(20)-15,18-dióico, *ent*-agático, poliáltico e outros) são encontradas em todas as espécies (Figura 2) (CRAVEIRO *et al*, 1981; FERNANDES *et al.*, 1992; VEIGA-JÚNIOR *et al.*, 1995; PINTO *et al*, 2000; CASCON; GILBERT, 2000; VEIGA-JÚNIOR; PINTO, 2002; CARVALHO; CASCON,

2003; MAISTRO *et al.*, 2005).

A relação entre a composição química e a atividade biológica de amostras autênticas do óleo-resina de *Copaifera* é essencial para permitir uma validação segura e eficaz de um fitoterápico com adequado controle de qualidade (VEIGA-JÚNIOR; PINTO, 2002)

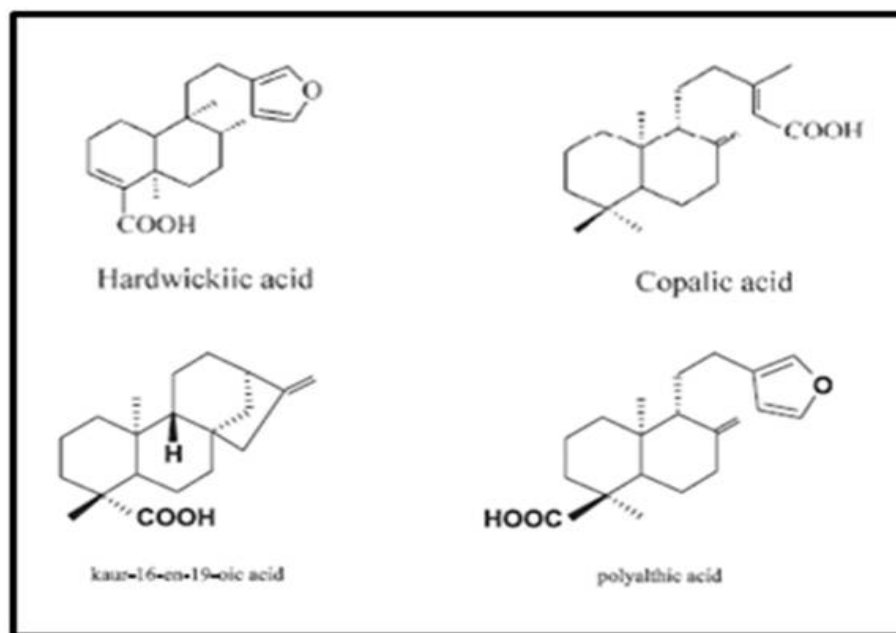


Figura 2. Estrutura dos principais ácidos diterpênicos presentes no óleo-resina de *Copaifera spp.*

Fonte: Adaptado de Carvalho *et al.* (2005) e Maistro *et al.* (2005)

3.5.6.1. A Espécie *Copaifera duckei* Dwyer e seus Principais Compostos

Ocorre apenas no Brasil, no nordeste da Amazônia brasileira. Esta espécie é encontrada principalmente nas matas de terra firme, nas regiões que vão do nordeste do estado do Pará até o noroeste do Maranhão (SILVA *et al.*, 2008).

A proporção de distribuição de terpenos da espécie *C. duckei*, de ocorrência comum na Amazônia brasileira, foi estudada por Cascon e Gilbert (2000) com três amostras, sendo uma do estado do Amapá (AP) e duas do estado do Pará (PA e CJ). As concentrações de sequiterpenos das amostras coletadas no Pará foram maiores que as do Amapá, com valores correspondentes, respectivamente, a 42 %, 32 % e 4 %, para CJ, PA e AP. A substância mais significativa foi o ácido poliáltico (furano labdano), sendo β -selineno o

sesquiterpeno predominante, com presença característica de α -selineno e β -bisaboleno e ausência de α -copaeno e δ -cadineno.

Carvalho *et al.* (2005) realizaram análise cromatográfica do óleo-resina de *C. duckei*, sendo 63,6 % composta por sesquiterpenos (2,2 % β -elemeno, 5,0 % β -cariofileno, 14,7 % α -bergamoteno e 27,4 % β -bisaboleno) e 36,4 % por ácidos diterpênicos (13,5 % kaur-16-en-19-óico, 8,3 % kauran-19-óico, 4,1 % copálico, 6,9 % poliáltico e 2,6 % ácido eperu-8(17)-en-15,18-dióico). Considerando a estrutura dos ácidos diterpênicos, 22,8 % foram ácidos tetracíclicos da série dos cauranos e 13,6 % da série dos labdanos bicíclicos (6,9 % furano labdano).

Maistro *et al.* (2005) também analisaram a proporção de distribuição dos terpenos no óleo-resina desta espécie. Foi detectada a presença de 7,2 % de hidrocarbonetos sesquiterpenos, 1,8 % de diterpenos neutros não identificados e 92,2 % de ácidos diterpênicos. Entre os componentes sesquiterpenicos destacou-se o *trans*- β -cariofileno (4,5%), *trans*- α -bergamotene (1,0 %), α -humuleno (0,7 %), e β -bisabolene (1,0 %) e entre os diterpenos os ácidos copálico (3,7 %), polialtico (27,1 %) e hardwickiic (59,3 %).

3.6. Toxicologia Reprodutiva

Durante algum tempo, acreditou-se que o útero era intransponível a agentes externos e que a placenta constituía-se em uma verdadeira barreira entre os organismos materno e fetal. O conceito de “barreira placentária” foi abalado no início dos anos 60, pela “Tragédia da Talidomida”, um medicamento comercializado como sedativo moderado, usado para diminuir náuseas em mulheres grávidas. Defeitos significativos nos fetos foram causados com a ingestão de uma única dose durante a gestação (SMITHELLS; NEWMAN, 1992).

Os fetos expostos à talidomida apresentaram intestinos malformados, defeitos na audição, ausência de orelhas, anomalias renais e oculares. Todavia, o fenótipo que mais chamou a atenção foi a focomelia, uma síndrome caracterizada pela aproximação ou encurtamentos dos membros ao tronco do feto (SMITHELLS; NEWMAN, 1992). A ciência que trata do estudo das malformações congênicas é a teratologia. Wilson (1977) definiu a teratologia como “a ciência interessada em determinar as causas, mecanismos e as manifestações dos erros no desenvolvimento, sejam eles estruturais ou funcionais, que podem ser iniciados em qualquer período entre a fertilização e a maturação pós-natal”.

As anomalias congênitas podem ser resultantes de fatores genéticos ou ambientais, podendo ser também, pela combinação destes dois fatores, apresentando uma etiologia multifatorial. Podem existir dois fatores genéticos: o gênico, envolvendo a herança dos genes que causam a anomalia e o cromossômico, abordando as aberrações cromossômicas representadas pelo número anormal de cromossomos. Entre os fatores ambientais existem os agentes infecciosos, como por exemplo, o vírus da rubéola, citomegalovírus e o parasita *Toxoplasma gondii*; os agentes químicos, envolvendo fármacos, por exemplo, talidomida, ácido retinóico, álcool e ácido valpróico; e os agentes físicos, como raios-X e radiação atômica (FAVERO, 2006).

O termo toxicologia reprodutiva é recente, refere-se a uma área do conhecimento relativamente nova, que tem suas raízes fortemente relacionadas à teratologia. Estudos envolvendo toxicologia reprodutiva incluem malformações estruturais, retardo no crescimento, dano no desenvolvimento e a morte do organismo (ROGERS; KAVLOCK, 2001). Esta área da toxicologia também se preocupa com o estudo da cinética, mecanismo de ação tóxica, patogênese e as conseqüências da exposição aos agentes tóxicos ou condições que levem ao desenvolvimento anormal do animal (ROGERS; KAVLOCK, 2001).

Os ensaios pré-clínicos de toxicologia reprodutiva estão sob a portaria número 116/96 da Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde (SVS/MS), e envolvem vários testes, tais como toxicidade de longo prazo (carcinogenicidade), efeitos na reprodução e prole em duas gerações sucessivas (teratogênese, neurotoxicidade tardia, entre outros). Essa portaria estipula que os testes de toxicidade para avaliação de risco de um novo medicamento sejam realizados em três espécies mamíferos, sendo uma delas não-roedora (BRASIL, 2009d). Os estudos em reprodução são considerados de longo prazo e em geral, a positividade de um destes testes, em qualquer espécie, exclui a utilização do produto na espécie humana, durante a gravidez (LAPA *et al.*, 2003).

A avaliação da performance reprodutiva, consiste na administração da substância a ser avaliada, em fêmeas gestantes, desde a implantação até o final da gestação, que corresponde a um dia antes do parto. Diante disso, torna-se fundamental o conhecimento das etapas do desenvolvimento embrionário, pois alguns estágios do desenvolvimento são mais vulneráveis que outros (ROGERS; KALVLOCK, 2001).

A gestação em mamíferos pode ser dividida em três períodos: pré-implantação, organogênese e fetal (FRITZ; GIESE, 1990). A fase de pré-implantação compreende o período que vai desde a fecundação até a implantação do blastocisto no útero, na espécie

humana, esse período vai até o 17º dia pós-fecundação, enquanto que em ratos e camundongos, até o 6º dia (FRITZ; GIESE, 1990). Esta fase é caracterizada pela presença de células totipotentes em divisão e a exposição a um agente tóxico pode impedir a implantação do blastocisto, levando a um aborto espontâneo (ROGERS; KALVLOCK, 2001). Após a implantação, inicia-se a fase de organogênese, que na espécie humana vai do 18º ao 57º dia de gestação, e no rato, do 7º ao 14º. Esse período é caracterizado por uma intensa proliferação e migração celular, remodelamento tissular e formação rudimentar das estruturas do corpo. É o período de maior susceptibilidade, à ação de agentes teratogênicos e embriofetotóxicos, no qual o maior número de malformações pode ser induzido, sendo considerado o período teratogênico clássico (BRENT, 1993).

Após fase de organogênese, dá-se início a terceira fase, conhecida como fase fetal, caracterizada por diferenciação e crescimento tissular, maturação fisiológica dos diferentes sistemas e crescimento ponderal do feto. Compreende o período que vai do 57º dia pós-fertilização até o término em humanos, e do 16º ao 21º em ratos (FRITZ; GIESE, 1990; ROGERS; KALVLOCK, 2001). Nesse período, a sensibilidade frente a malformações anatômicas é extremamente baixa, porém a exposição a agentes químicos pode produzir morte celular e inibição da divisão celular. Essas alterações podem interferir com a formação dos sistemas nervoso, endócrino e imunológico, promovendo desordens funcionais e de comportamento (FRITZ; GIESE, 1990; ROGERS; KALVLOCK, 2001).

3.6. 1. Toxicologia Reprodutiva de Produtos Naturais

O uso popular e mesmo o tradicional, não são suficientes para validar, eticamente, os produtos naturais como eficazes e seguros. Nesse sentido, eles não se diferenciam de qualquer outro xenobiótico sintético. Sua preconização ou autorização oficial do seu uso medicamentoso deve ser fundamentada em evidências experimentais comprobatórias e a segurança do seu uso deve ser comprovada, inclusive, durante o período gestacional (SIMÕES *et al.*, 2000). Os estudos de toxicologia reprodutiva de produtos naturais ainda são incipientes no Brasil, contudo, são necessários, para que a classe médica possa prescrever o uso desses produtos naturais (CALIXTO, 2005).

Segundo Dantas (2004), algumas espécies de plantas são reconhecidas pela sua elevada toxicidade e, conseqüentemente, um potencial abortivo, como a espírradeira (*Nerium oleander* L.) e a comigo-ninguém-pode (*Dieffenbachia picta picta* L. Shott). Outras espécies

são usadas pela população sem, na maioria das vezes, ter o conhecimento de que podem levar ao aborto ou a anomalias congênitas, se forem consumidas durante a gravidez, tal como, artemísia (*Artemisia vulgaris* L.), alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), erva moura (*Salanum americanum* Mill.), melão de são caetano (*Momordica charantia* L.), quebra pedra (*Phyllanthus* sp.), arruda (*Ruta groveolens* L.) e boldo (*Peumus boldus* Mol.) (LEMÔNICA *et al.*, 1996; MENGUE *et al.* 2001).

A utilização de qualquer medicamento, mesmo os produtos naturais, durante a gestação, deve sempre ser considerada a relação risco-benefício. Lyra *et al.* (2005) avaliaram o efeito tóxico, do óleo de sementes de neem (*Azadirachta indica* A. Juss), utilizado na medicina popular como repelente, em ratas prenhas. Esse estudo não demonstrou toxicidade materna e efeito anti-implantação; contudo, houve a redução de massa corporal fetal, que pode indicar possível embriofetotoxicidade.

Aragão (2009) avaliou a toxicidade reprodutiva, em ratas Wistar prenhas, tratadas por via oral, nas doses de 250 mg/kg e 500 mg/kg, com extrato seco de *Cassia occidentalis* L., não sendo observado diferenças estatísticas significativas, contudo, foi observado a presença de natimortos nas duas doses utilizadas, indicando que sua utilização não deve ser recomendada durante o período gestacional.

Borges *et al.* (2005) avaliaram a toxicidade do *Hypericum perforatum* (erva de São João), administrado em ratas, no período de organogênese, não sendo apresentadas manifestações tóxicas para ratas prenhas, nesse período. Uma preparação fitoterápica, Kava Kava® (*Piper methysticum* Forst) também foi avaliada quanto a sua toxicidade sistêmica e reprodutiva, não sendo observado, hepatotoxicidade, toxicidade sistêmica, reprodutiva nem o aparecimento de teratogenicidade na dose de 35 mg/kg (PINTO, 2004).

Os efeitos do óleo extraído das sementes da *Carapa guianensis* (Andiroba) foram investigados sobre variáveis reprodutivas e, ainda, sobre o desenvolvimento da prole de ratas Wistar. Esse estudo conduzido por Costa-Silva *et al.* (2006) demonstrou que não houve interferência na fertilidade de ratas Wistar no desenvolvimento da prole, entretanto, o aumento da atividade motora dos recém-nascidos indica uma possível ação sobre o desenvolvimento do sistema nervoso central.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Obtenção do Óleo-resina

O óleo-resina de copaíba para o desenvolvimento farmacêutico foi obtido da empresa Beraca, situada em Ananindeua, no estado do Pará, que tem como foco o uso dos produtos da biodiversidade Amazônica. A pesquisa e o desenvolvimento de seus produtos são realizados em parceria com universidades localizadas na região. Segundo o laudo da empresa, o óleo-resina obtido foi da espécie *C. duckei* Dwyer.

4.2. Análise do Óleo-resina de Copaíba por Cromatografia Gasosa

A análise do óleo-resina foi realizada em São Paulo, no Laboratório Farmacêutico Almeida Prado Ltda, situado na cidade de São Paulo, São Paulo, Brasil. Para a determinação dos componentes do óleo-resina de *C. duckei*, utilizou-se cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-MS), segundo o método descrito por Adams (1995).

Para fins de controle de qualidade foi necessário definir um marcador para ser monitorado e poder garantir a qualidade do produto em questão. O marcador utilizado no monitoramento da qualidade do produto foi a substância, que segundo dados da literatura, é a substância responsável pela ação farmacológica preconizada e ainda, que tem disponibilidade de padrões comerciais, pois trata-se do desenvolvimento de metodologias de análises que servirão para controle de qualidade na rotina da indústria de medicamentos.

A substância considerada marcadora do óleo-resina é o sesquiterpeno *trans*-cariofileno (C₁₅H₂₄; PM 204).

4.2.1. Parâmetros do Equipamento CG-MS

Dados do equipamento: Cromatógrafo Gasoso 6850 Agilent® acoplado a Espectrômetro de Massa 5973 (CG-EM).

As condições da análise: Gás carreador Hélio, fluxo de 1,5 mL/min., temperatura do injetor 270° C, forno 120° C, detector 300° C. Coluna capilar DB -1,25 m x 0,32 mm, 0,25 µm. Volume de injeção de 1,0 µL, modo split 20:1. Rampa de aquecimento: 120° C por 2

min., aquecimento de 3° C por min até 160° C, e 8° C/min até 290° C mantendo-se por 5 min. A amostra foi lida em modo Scan, com 40 - 600 AMU.

Para se chegar a estes valores, foram testados empiricamente vários valores de rampa de aquecimento e volume de injeção, divisão de amostra, até se obter um cromatograma com os picos bem resolvidos e com reprodutibilidade de abundância entre as injeções.

4.2.2. Identificação dos Compostos

Após a injeção da amostra foi gerado um cromatograma que relaciona tempo e abundância do sinal obtido, ou seja, do pico cromatográfico. O tempo em que cada pico foi gerado é referido como tempo de retenção (TR) e é característico para cada composto em condições constantes de análise. Utilizando o detector espectrômetro de massas, obteve-se o perfil de fragmentação dos compostos.

As figuras 3 e 4 representam o cromatograma do padrão de *trans*-cariofileno e seu respectivo espectro de fragmentação.

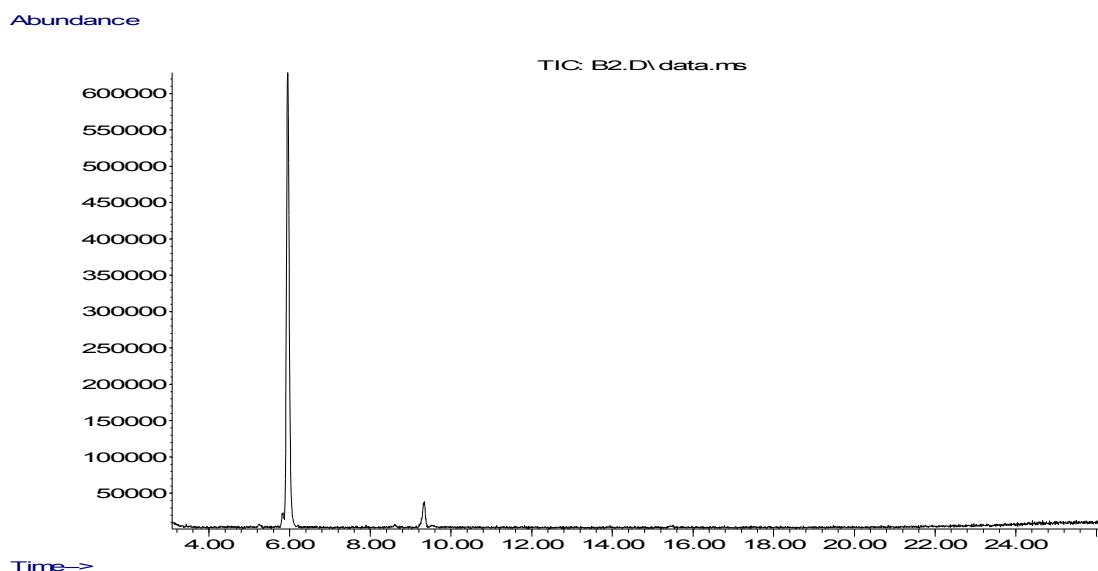


Figura 3. Cromatograma do padrão *trans*-cariofileno obtido em Cromatógrafo Gasoso 6850 (Agilent®) acoplado a Espectrômetro de Massa 5973 (CG-EM).

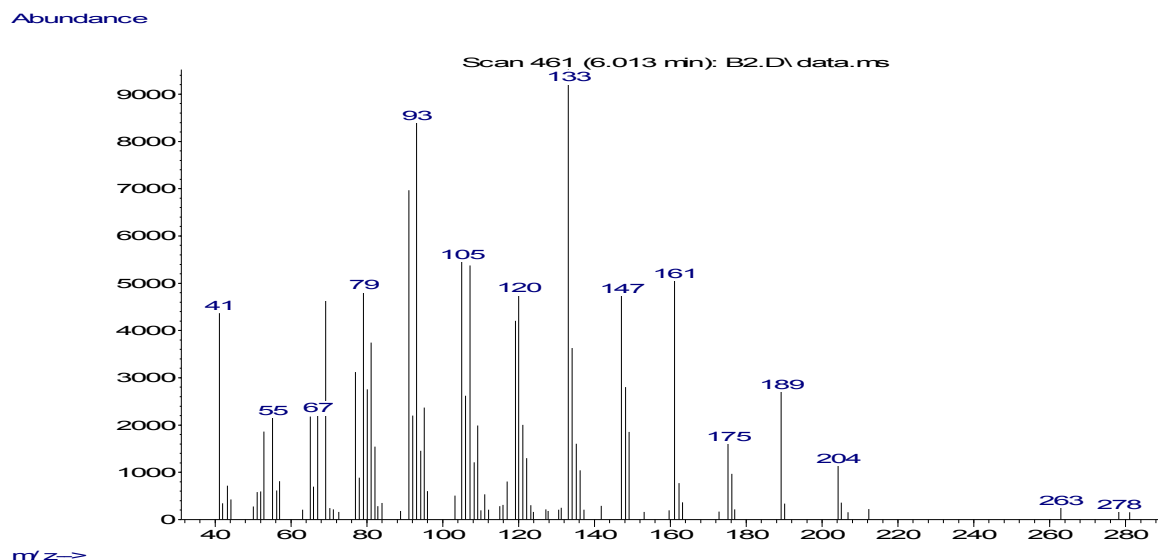


Figura 4. Perfil de fragmentação do padrão *trans*-cariofileno, obtido em Cromatógrafo Gasoso 6850 (Agilent®) acoplado a Espectrômetro de Massa 5973 (CG-EM).

4.2.3. Preparo da Amostra

Os produtos naturais necessitam de um preparo prévio antes de ser injetado no CG-EM, pois é necessário que a substância seja volátil e apolar para que seja arrastada pela fase móvel, caso contrário, ficará retida na coluna do equipamento. No caso do óleo-resina de copaíba, os sesquiterpenos já possuem volatilidade e característica apolar adequada à análise, porém os ácidos diterpênicos, que representam a fração resinosa do óleo, necessitam ser esterificados para se tornarem mais voláteis e apolares. Geralmente as técnicas de preparo de amostra visam uma pré-purificação que direciona a análise ao composto alvo, concentrando-o ou eliminando interferentes ou produtos que possam causar danos ao equipamento. Ao mesmo tempo, é necessário que o preparo da amostra não interfira no composto alvo, ou seja, que preserve o marcador *trans*-cariofileno.

No presente estudo foram avaliados dois métodos de esterificação, um descrito por Hartman e Lago (2003) (H&L) e outro pela IUPAC, n. 2.301 (1987), com algumas adaptações descritas no Método 2 do Manual de Métodos Analíticos do Instituto Adolfo Lutz (2005).

Para quantificar o óleo-resina de copaíba, foi adotada a técnica de “padrão externo”, utilizando como marcador o padrão de *trans*-cariofileno, grau analítico (análise quantitativa) obtido da empresa Sigma Aldrich. A quantificação foi realizada pelo método de

padronização externa, que consiste na construção de uma curva de calibração com um padrão de um composto presente na amostra, e assim determinar a concentração do determinado composto na amostra através de cálculos matemáticos.

Quantidade de partida: 100 mg de óleo de copaíba (0,100 g), submetida a esterificação pelo método IUPAC. O volume final obtido foi de 25 mL, que corresponde teoricamente a uma concentração de 4 mg/mL do óleo-resina. Essa análise foi realizada em triplicata, e o resultado final foi expresso pela média das leituras obtidas.

4.2.4 Construção da Curva de Calibração

Para construção da curva de calibração, foram realizadas seis diluições com o padrão *trans*-cariofileno, como se segue:

Foram preparadas quatro “soluções estoques” com o padrão de *trans*-cariofileno (Quadro 1). A partir destas soluções foram preparadas outras diluições denominadas “soluções de trabalho” (Quadro 2). Tanto as “soluções estoque” quanto as “soluções de trabalho” foram utilizadas na construção da curva de calibração (Quadro 3).

As concentrações propostas para construção da curva de calibração apresentaram linearidade adequada (Figura 5). Estas concentrações também estão dentro do limite de quantificação do método, que foi de 2,5 ng/mL.

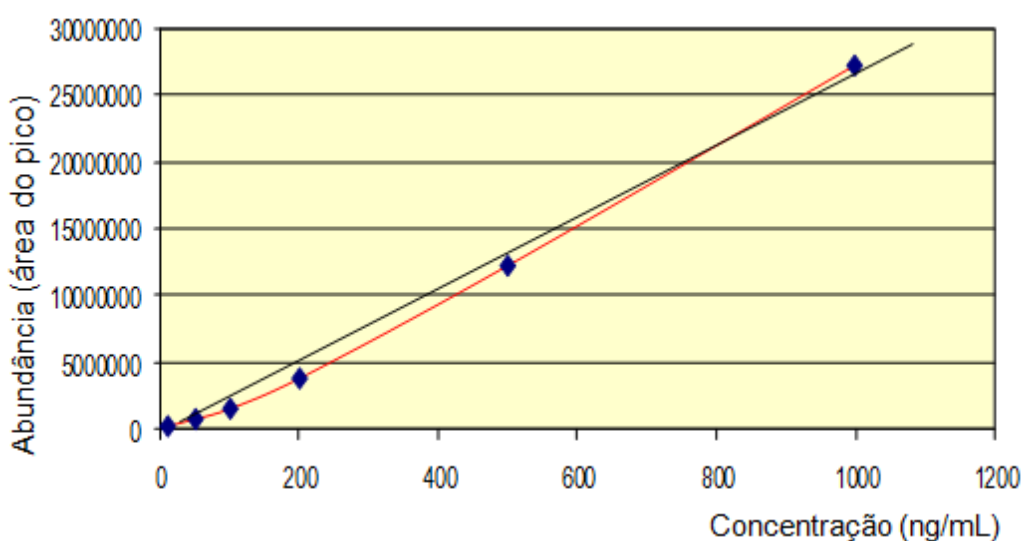


Figura 5. Curva de calibração do padrão *trans*-cariofileno, coeficiente de correlação 0,997975237; inclinação da reta 3,58189E-05.

Quadro 1. Correspondência entre volume de *trans*-cariofileno e hexano

Solução estoque de <i>trans</i> -cariofileno	Padrão de <i>trans</i> -cariofileno puro (a ser adicionado)	Hexano (a ser adicionado)		[] em μL de <i>trans</i> -cariofileno padrão por mL de hexano
A	1 μL	1,000 μL	1 mL	1,00 $\mu\text{L}/\text{mL}$
B	1 μL	10,000 μL	10 mL	0,10 $\mu\text{L}/\text{mL}$
C	1 μL	5,000 μL	5 mL	0,20 $\mu\text{L}/\text{mL}$
D	1 μL	2,000 μL	2 mL	0,50 $\mu\text{L}/\text{mL}$

Quadro 2. Correspondência entre volume de *trans*-cariofileno e hexano

Soluções de trabalho	Tipo e quantidade de Solução estoque a ser adicionada		Hexano (a ser adicionado)	[] em μL de <i>trans</i> -cariofileno padrão por mL de hexano
1	A	10 μL	1 mL	0,01 $\mu\text{L}/\text{mL}$
2	B	1 mL	1 mL	0,05 $\mu\text{L}/\text{mL}$
3	B	B	B	0,10 $\mu\text{L}/\text{mL}$

Quadro 3. Pontos da curva de calibração e suas correspondentes concentrações

Pontos da curva	Soluções	[] de <i>trans</i> -cariofileno em nL/mL	[] μL de <i>trans</i> -cariofileno padrão por mL de hexano
1	1	10,0	0,010 $\mu\text{L}/\text{mL}$
2	2	50,0	0,050 $\mu\text{L}/\text{mL}$
3	3 ou B	100,0	0,10 $\mu\text{L}/\text{mL}$
4	C	200,0	0,2 $\mu\text{L}/\text{mL}$
5	D	500,0	0,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$
6	A	1000,0	1,0 $\mu\text{L}/\text{mL}$

Estas soluções foram armazenadas em refrigerador (4° C) até o momento da análise. As diluições do padrão foram preparadas em triplicata e injetadas. Com os valores das médias de cada ponto, construiu-se a curva utilizando o software *chemstation*, que integra os picos cromatográficos (correlacionando a área obtida com a concentração correspondente do padrão) e a partir daí, calculou-se a concentração do marcador na amostra. Os dados da relação área/concentração ficam a disposição para serem utilizados em outras bases de dados para cálculos mais específicos, como análise estatística.

4.3. Preparação do Creme Vaginal de Copaíba

O creme vaginal de copaíba e o creme base foram obtidos no Laboratório Farmacêutico Almeida Prado Ltda, situado na cidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, na concentração de 2,5% e disponibilizado em frascos de polietileno.

Para determinação do provável Equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) do óleo-resina de copaíba, foi utilizada a concentração de 2,5 % do óleo-resina e dois grupos de emulsificantes, lipofílico e hidrofílico, de acordo com a escala de Griffen, combinados entre si. As emulsões foram preparadas, variando-se a proporção entre os emulsificantes em tubos de ensaio. O óleo, os emulsificantes e a água deionizada (q.s.p.) foram aquecidos (70-75° C), agitados em vórtex, durante 15 minutos, até completar a emulsificação. Decorridas 24 horas, testes preliminares de estabilidade, temperatura e centrifugação foram realizados para seleção da emulsão mais estável, admitindo-se que o valor de EHL da emulsão mais estável corresponda ao do óleo-resina em ensaio (PRISTA, 1995).

Para a preparação das bases utilizou-se técnica usual de preparação de emulsões, dividindo-se os constituintes de acordo com hidro ou lipossolubilidade e aquecendo-se independentemente as duas fases, a cerca de 70° C. Em um bécker, a parte, foi misturado o óleo-resina de copaíba, o emulsificante e antioxidante que foram previamente misturados sem aquecimento. Após a fusão dos componentes oleosos, a dissolução dos componentes hidrófilos, procedeu-se a adição lenta da fase aquosa à fase oleosa e em seguida a mistura dos óleos, agitando-se manualmente (por \pm 20 min.) para a emulsão com monoestearato de glicerila.

Para a emulsão hidrofílica a agitação foi realizada em moinho coloidal com diferentes tempos de agitação (10, 20, 30, 40 e 50 min.). As bases foram acondicionadas em

frascos de polietileno com tampa rosqueável, previamente sanitizadas com solução de álcool 70 %.

4.4. Ensaio Biológico

Antes do início das atividades no Laboratório de Pesquisa em Fármacos, este projeto foi submetido à aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amapá, recebendo o registro 003A/2007.

4.4.1. Animais

Foram utilizados ratas e ratos albinos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, pesando em torno de 250 g, provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório (CEMIB), da Universidade de Campinas/Unicamp, São Paulo.

4.4.2. Grupos Experimentais

As fêmeas foram distribuídas aleatoriamente em três grupos experimentais:

- Grupo Controle ou Não-Tratado (NT): Ratas prenhes não tratadas, que receberam por via intravaginal, 0,5 mL de soro fisiológico, por 30 dias e durante toda a prenhez (n = 5);
- Grupo Tratado com Creme Vaginal Base (TCVB): Ratas prenhes, que receberam por via intravaginal somente o creme vaginal base, baseado na mesma quantidade usada no grupo tratado com creme vaginal de copaíba, por 30 dias e durante toda a prenhez (n = 5);
- Grupo Tratado com Creme Vaginal de Copaíba (TCVC): Ratas prenhes, que receberam por via intravaginal, a dose de 28,6 mg/kg de creme vaginal de copaíba, correspondente a 10 vezes a dose que será utilizada em humanos, por 30 dias e durante toda a prenhez (n = 06).

4.4.3. Seqüência Experimental

4.4.3. 1. Período de Adaptação

As ratas foram adaptadas no Laboratório de Pesquisa em Fármacos, da Universidade Federal do Amapá, durante sete dias. Permaneceram em caixas de polietileno com capacidade máxima de cinco animais, sob temperatura mantida em $23^{\circ} \text{C} \pm 2^{\circ} \text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas. Após o período de adaptação, as ratas foram sorteadas para comporem os três grupos: NT, TCVB e TCVC.

4.4.3. 2. Período de Acasalamento

Após o período de adaptação e ao atingirem a maturidade sexual, as ratas foram tratadas por 30 dias de acordo com seu grupo experimental. Após este período, iniciou-se a fase de acasalamento com duração de aproximadamente 20 dias. Para o acasalamento, observou-se, primeiramente, qual era a fase do ciclo estral de cada rata pela manhã, por meio de um esfregaço vaginal (Quadro 4).

Quadro 4. As quatro fases do ciclo estral, mediante exame de citologia vaginal

Fase	Caracterização do esfregaço
Proestro (12 h)	Grande número de células epiteliais nucleadas, algumas células epiteliais queratinizadas (sem núcleo) e ausência total de leucócitos.
Estro (14 h)	Presença de células queratinizadas e ausência total de leucócitos. A ovulação ocorre espontaneamente na metade do ciclo escuro durante esta fase.
Metaestro (21 h)	Inúmeros leucócitos, filamentos de muco e resíduos de células epiteliais queratinizadas.
Diestro (57 h)	Período de repouso em que a mucosa vaginal apresenta-se delgada, com leucócitos e algumas células nucleadas.

Após detectar a fase proestro, as ratas foram distribuídas duas a duas em gaiolas de polietileno, com cama de maravalha, na presença de um rato macho ao final da tarde. Na manhã subsequente, os machos foram retirados e os esfregaços vaginais foram coletados introduzindo e aspirando com uma pipeta 10µL de soro fisiológico 0,9%. (MARCONDES *et al.*, 2002). Foi considerado indicativo de prenhez a presença de espermatozóides, associado ao diagnóstico da fase estro do ciclo estral. Esta fase é caracterizada como a fase estrogênica máxima, na qual são encontradas apenas células queratinizadas. Confirmada a prenhez, esse dia foi considerado como o dia zero (CALDERON, 1988).

4.4.3. 3. Período de Prenhez

Os três diferentes grupos, grupos Controle, TCVC e TCVB, de ratas prenhes receberam por via intravaginal, solução fisiológica 0,5 mL, 28,6 mg/kg de creme vaginal copaíba e creme vaginal base, respectivamente, até o 20º dia. O tratamento foi realizado sempre pelo período da manhã, sendo ajustadas as doses a cada cinco dias, de acordo com o peso das ratas.

Durante a prenhez, as fêmeas foram mantidas em gaiolas individuais por 21 dias, pesadas nos dias 0, 5º, 14º e 21º e observadas quanto ao comportamento e a ingestão hídrica e alimentar.

4.4.3. 4. Cesárea

No 21º dia, as ratas foram anestesiadas com 50 mg/kg de tiopental sódico (THIOPENTAX[®]) para realizar a laparotomia, com exposição dos cornos uterinos para observação dos nódulos de reabsorção e retirada dos ovários para contagem de corpos lúteos (Figura 6). Fetos e placentas foram imediatamente retirados (Figura 7). As mães, após esse procedimento, foram submetidas à eutanásia por esgotamento da volemia. Os recém-nascidos (RNs) foram imediatamente analisados e, posteriormente, pesados e medidos (CALDERON, 1988).

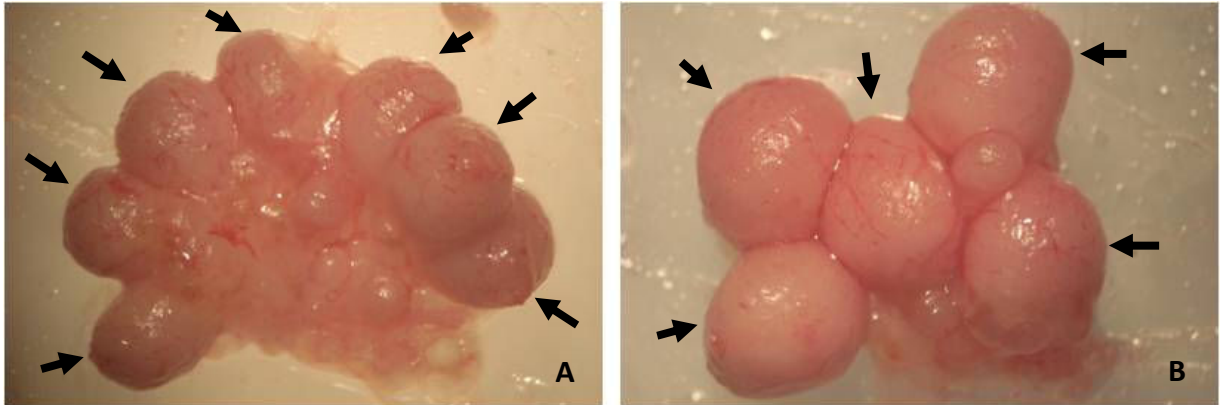


Figura 6. Ovário direito (A) e esquerdo (B) de ratas retirados para a contagem de corpos lúteos (observar a ponta da seta).

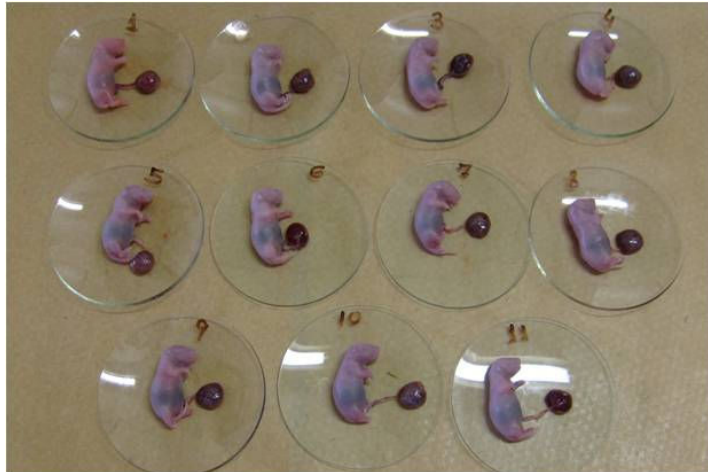


Figura 7. Fetos de ratas e suas respectivas placentas após a laparotomia.

4.4.3. 5. Métodos de Avaliação

4.4.3. 5.1. Peso Materno

Para a avaliação diária do peso, foi utilizada balança Gehaka BG4000, com capacidade de 4200 g e precisão de 0,1 g. O ganho de peso foi calculado pela diferença entre os pesos corpóreos observados nos dias 0, 5^o, 14^o e 21^o da prenhez.

4.4.3. 5.2. Performance Reprodutiva Materna

Foram observados e contados pontos de implantação, nódulos de reabsorção, números de fetos vivos e mortos. Os ovários também foram observados para fazer a contagem de corpos lúteos, com auxílio de uma lupa NIKOW[®], modelo SMZ 645 (C-W 10x A/22).

A taxa de perda de embriões no período que antecede a implantação foi denominada de porcentagem de perda pré-implantação e foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\frac{n^{\circ} \text{de implanta\c{c}ões} - n^{\circ} \text{de fetos vivos}}{n^{\circ} \text{de implanta\c{c}ões}} \times 100$$

A morte dos embriões após seu processo de implantação (porcentagem de perda pós-implantação) foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\frac{n^{\circ} \text{de corpos lúteos} - n^{\circ} \text{de implanta\c{c}ões}}{n^{\circ} \text{de corpos lúteos}} \times 100$$

4.4.3. 5.3. Teste para Confirmação dos Sítios de Implantações e de Reabsorções

No caso de ausência de desenvolvimento fetal ou de pontos de implantações visíveis, o útero foi colocado em solução de NaOH 0,2 %, para revelar se houve ou não algum ponto de implantação naquele útero. Se a solução de NaOH 0,2 % revelar a presença de algum sítio de implantação invisível, será então considerado NaOH positivo (+).

4.4.3. 5.4. Peso e Classificação dos Recém-nascidos

Após a laparotomia, os RNs foram pesados utilizando-se balança Marte com capacidade de 500 g e precisão de 0,001 g. Os recém nascidos foram classificados em AIP (Adequado para Idade de Prenhez), PIP (Pequeno para Idade de Prenhez) e GIP (Grande para Idade de Prenhez), de acordo com os pesos corpóreos, segundo os parâmetros estabelecidos por Calderon (1988):

- AIP: Peso corpóreo compreendido entre a média de peso do grupo controle mais ou menos o desvio-padrão;
- PIP: Peso corpóreo inferior à média de peso do grupo controle menos o desvio-padrão;
- GIP: Peso corpóreo superior à média do peso do grupo controle mais o desvio-padrão.

4.4.3. 5.5. Peso das Placentas e Índice Placentário

As placentas, livres de membrana e cordão umbilical, foram pesadas em balança Marte com capacidade de 500 g e precisão de 0,001 g. O índice placentário (IP) foi determinado pela relação entre o peso placentário (PP) e o peso fetal (PF) (CALDERON, 1994).

$$IP = \frac{PP}{PF}$$

4.4.3. 5.6. Análise das Malformações Externas

Após a pesagem, os recém-nascidos foram examinados externamente, com análise minuciosa dos olhos, boca, implantação das orelhas, conformação craniana, membros anteriores e posteriores, perfuração anal e cauda (WILSON, 1965).

4.4.3. 5.7. Análise das Anomalias e Malformações Viscerais

Imediatamente após o exame externo, metade dos RNs de cada ninhada foi colocada em solução de Bouin por 4 dias para fixação das estruturas viscerais e descalcificação dos ossos; após, foi colocado em álcool 80 % por dois dias, depois trocou-se por álcool 90 % até o dia da análise. O método de secção seriada de Wilson (1965) foi utilizado para observar anomalias e/ou malformações viscerais (Figura 8), de acordo com o quadro 5. As análises foram realizadas com o auxílio de uma lupa NIKOW[®], modelo SMZ 645 (C-W 10 x A/22).

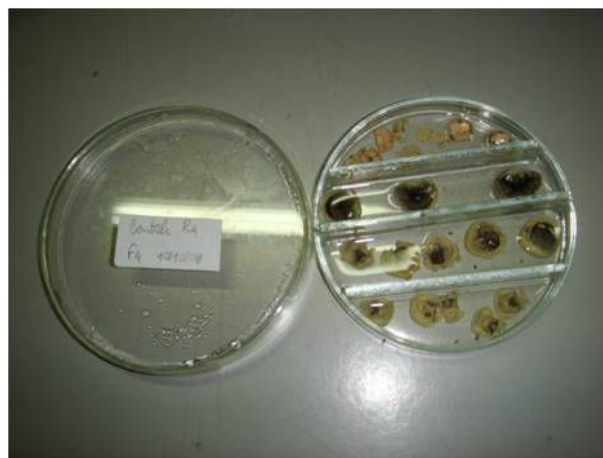


Figura 8. Secções seriadas de um feto, de rata, processado para análise das vísceras, conforme Wilson (1965).

Quadro 5. Anomalias e malformações investigadas no exame de víscera (WILSON, 1965)

Estruturas	Malformações	Anomalias
Boca	Palatosquese, Língua bífida	
Nariz	Alterações do septo nasal	
Olho	Retinocele, Microftalmia mono ou bilateral, Macroftalmia mono ou bilateral, Anoftalmia, Catarata e Degeneração do cristalino	
Cérebro	Hidrocefalia, Anencefalia	Hemorragia cerebral, Dilatação do ventrículo cerebral
Coração	Arco aórtico duplo ou voltado para o lado direito, Cardiomegalia, Comunicação intra-atrial, Comunicação intra-ventricular, Destrocardia Sinistrocardia, Ausência de septos, Presença de 4 vasos ou a sub-clávia girando em torno do esôfago	
Rins	Agenesia renal, Ectopia renal, Hibronefroze, Fusão renal, Fusão suprarenal Hiper ou hipoplasia renal	Implantação da pelve renal mono ou bilateral Hemorragia renal
Ureteres	Agenesia de ureter, Fusão do ureter, Duplicação do ureter	Ureter sinuoso mono ou bilateral Dilatação mono ou bilateral
Bexiga		Hiper ou hipoplasia vesical

4.4.3. 5.8. Análise das Anomalias e/ou Malformações Esqueléticas e Contagem dos Pontos de Ossificação

Para análise das anomalias e/ou malformações esqueléticas foi utilizado o método de Staples e Schnell (1964). A metade restante dos RNs de cada ninhada foi colocada em álcool 70 % por 12 horas; após, os RNs foram colocados em acetona P.A por 24 horas, eviscerados, diafanizados e corados com vermelho de alizarina (Figura 9). As análises foram realizadas de acordo com o quadro 6. Os pontos de ossificação foram observados e contados na ninhada processada para a análise das malformações esqueléticas, segundo método proposto por Aliverti *et al.* (1979). Foram avaliados os pontos de ossificação nos seguintes

locais: esterno, falanges anteriores e posteriores, metacarpos, metatarsos e vértebras cervicais e caudais.

Quadro 6. Anomalias e malformações investigadas no exame esquelético

Estruturas	Malformações	Anomalias
Crânio	Fusão frontal	Ossificação reduzida
Esterno	Esterno bífido	Esternóbrio atrofiado, bipartido, supranumerário, rudimentar e assimétrico (“ <i>shaped</i> ”, “borboleta”)
Vértebras	Agenesia vertebral, Fusão de vértebras	Corpo vertebral sem ossificação, Anomalias semelhantes as dos esternóbrios
Costelas	Agenesia de costelas, Duplicação de costelas, Hipoplasia de costelas e Fusão de vértebras	Costela ondulada, Costela extra uni ou bilateral e 13 ^a costela reduzida
Bacia	Hipoplasia de bacia	Ossificação reduzida (ílio, ísquio e púbis)
Clavícula	Agenesia de clavícula	
Falanges	Agenesia de falanges, Fusão de falanges, Hiperfalangia	
Metacarpo	Fusão do metacarpo	
Metatarso	Fusão do metatarso	



Figura 9. Feto de uma rata processado para análise esquelética, conforme o método de Staples e Schell (1964).

4.5. Análise Estatística

Para comparação dos valores de peso corpóreo, foi empregada a análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey (BERQUÓ *et al*, 1981). Para comparação dos valores médios dos parâmetros de performance reprodutiva, pesos fetal e placentário e índice placentário dos grupos experimentais, foi empregado o teste estatístico não paramétrico de Kruskal-Wallis (SIEGEL, 1970). Para a comparação das porcentagens de PIP, AIP e GIP foi usado o teste do Qui-quadrado (BERQUÓ *et al.*, 1981). Para avaliar a incidência de malformações ou de anomalias fetais, dentro dos grupos não tratados e tratados, foi utilizado o teste de Goodman (GOODMAN, 1964). Foi considerado, como nível de significância estatística, o limite de 5 % ($p < 0,05$). Os gráficos foram construídos no software SigmaPlot 10.0[®] (2006).

5. RESULTADOS

5.1. Análise do Óleo-resina de Copaíba por Cromatografia Gasosa

As amostras esterificadas foram comparadas com uma amostra não esterificada, diluída apenas em hexano, para avaliar se ocorrem perdas ou degradações das substâncias pelo método empregado. Na Figura 10, está representado o cromatograma obtido pelo método H&L. O marcador cariofileno está evidenciado em um pico de baixa resolução e pouca abundância em relação aos outros componentes da amostra.

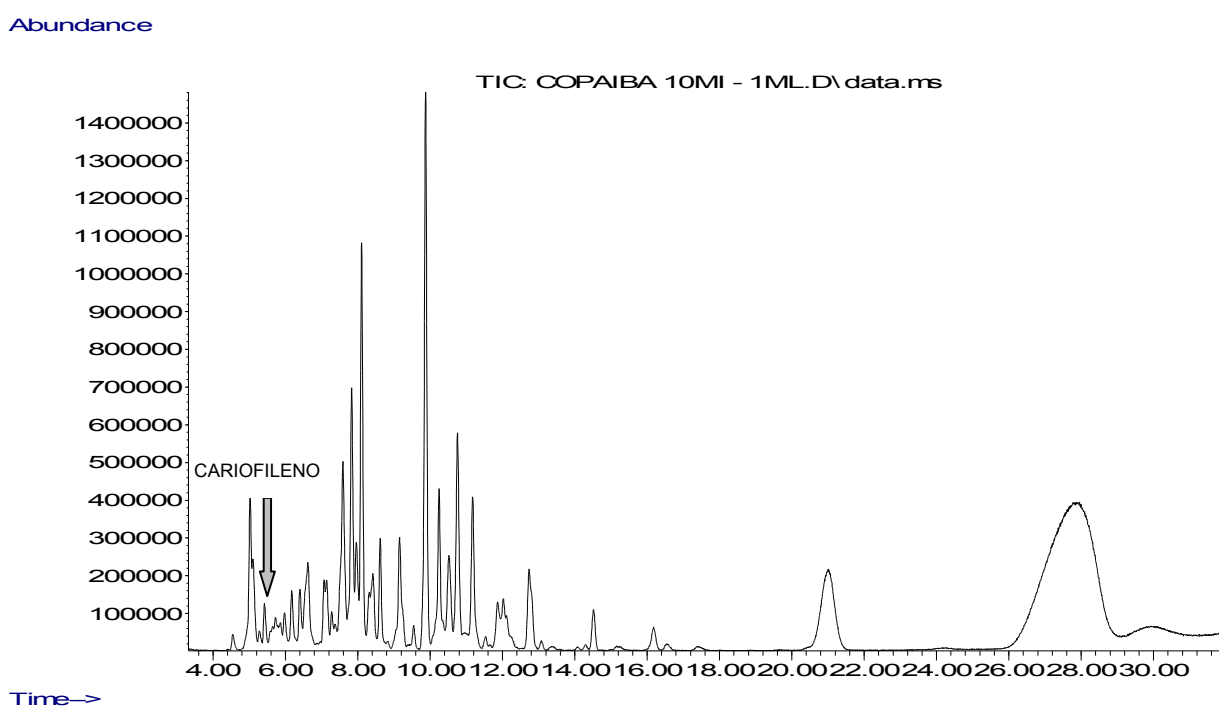


Figura 10. Cromatograma do óleo-resina de copaiba (FR 3340) esterificada pelo método H&L, obtido em Cromatógrafo Gasoso 6850 (Agilent®) acoplado a Espectrômetro de Massa 5973 (CG-EM).

A Figura 11 representa o cromatograma da amostra esterificada pelo método IUPAC e a Figura 12 a amostra do óleo-resina sem esterificar. É possível observar que as aparências destes dois cromatogramas são muito semelhantes e ambos apresentam como pico mais abundante e bem resolvido, o cariofileno.

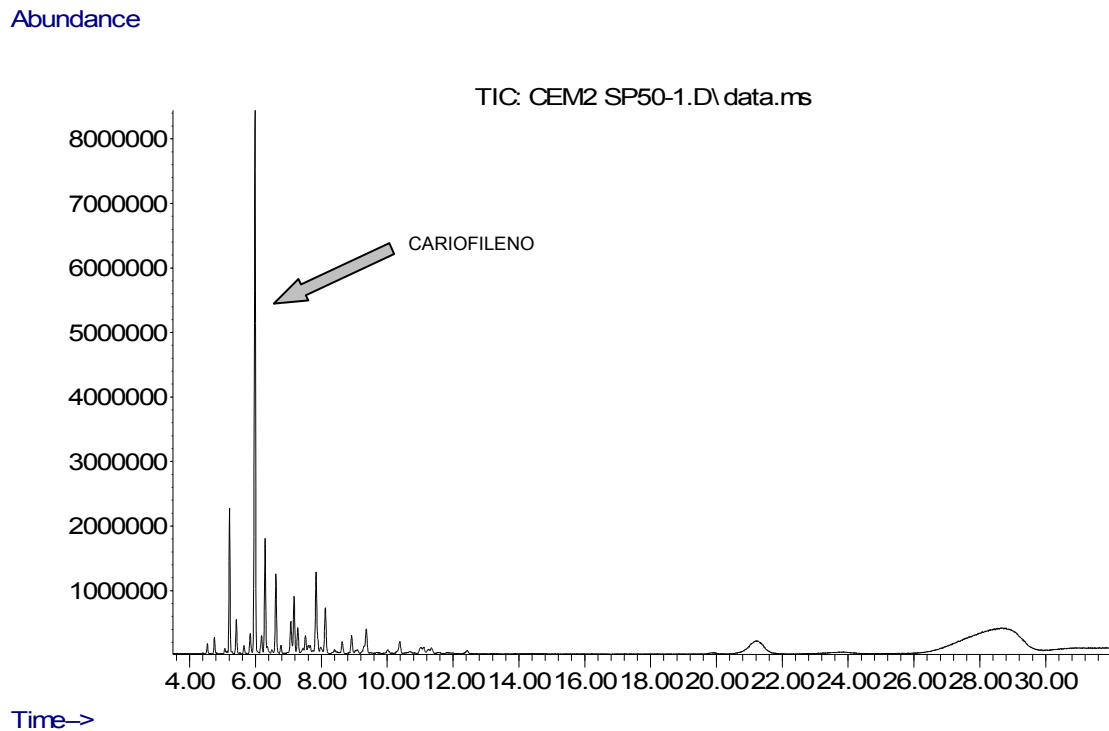


Figura 11. Cromatograma do óleo-resina de copaíba (FR 3340) esterificado pelo método IUPAC, obtido em Cromatógrafo Gasoso 6850 (Agilent®) acoplado a Espectrômetro de Massa 5973 (CG-EM).

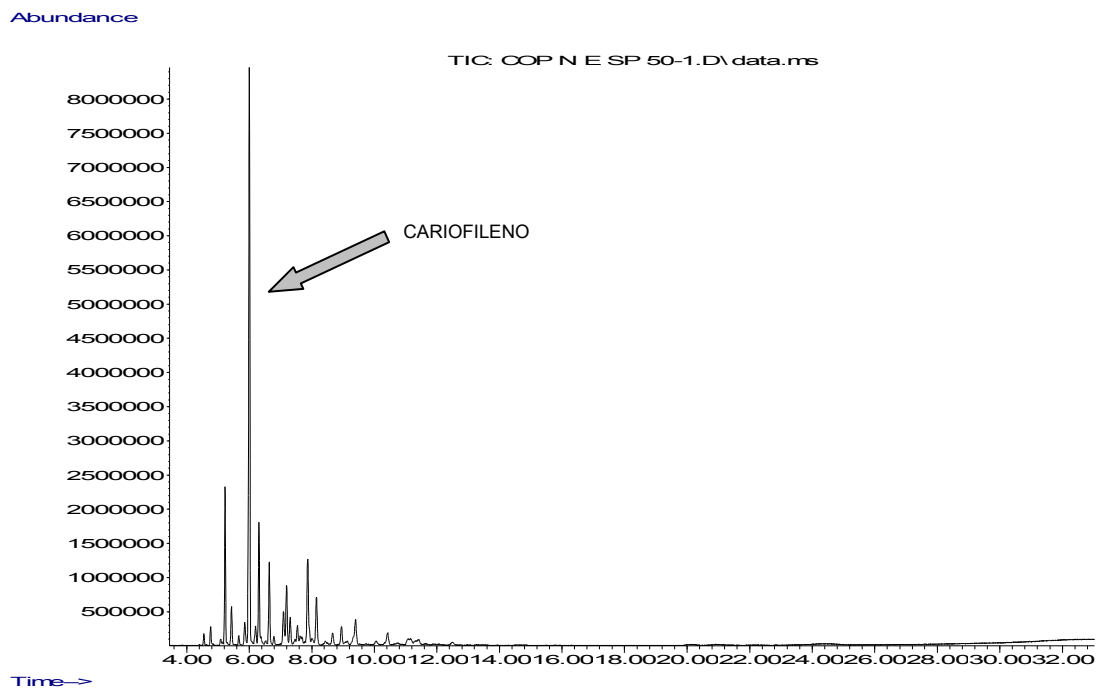


Figura 12. Cromatograma do óleo-resina de copaíba (RF 3340) não esterificado, obtido em Cromatógrafo Gasoso 6850 (Agilent®) acoplado a Espectrômetro de Massa 5973 (CG-EM).

O método de esterificação descrito por H&L apresentou baixa resolução para o *trans*-cariofileno e de acordo com os dados da espectroteca Wiley, a amostra esterificada pelo método H&L difere quanto a composição das amostras não esterificadas e das esterificadas pelo método IUPAC, as quais possuem composição muito semelhantes (Quadro 7). Portanto, o Método H&L foi descartado para o preparo de amostra do óleo-resina de copaíba, pois se mostrou insatisfatório quanto ao isolamento do marcador e existem indícios que tal método cause degradação dos componentes. Já o método IUPAC, apesar de aparentemente não causar alterações nos componentes da amostra e apresentar ótima resolução do marcador, foi necessário avaliar sua interferência no marcador *trans*-cariofileno.

Para isto foi submetido 1 μ L do padrão de *trans*-cariofileno à esterificação por tal método, sendo comparado o cromatograma obtido com o cromatograma do padrão diluído apenas em hexano. Este ensaio revelou que o padrão de *trans*-cariofileno não sofreu alteração significativa quando submetido a esterificação pelo método IUPAC (Figuras 13 e 14).

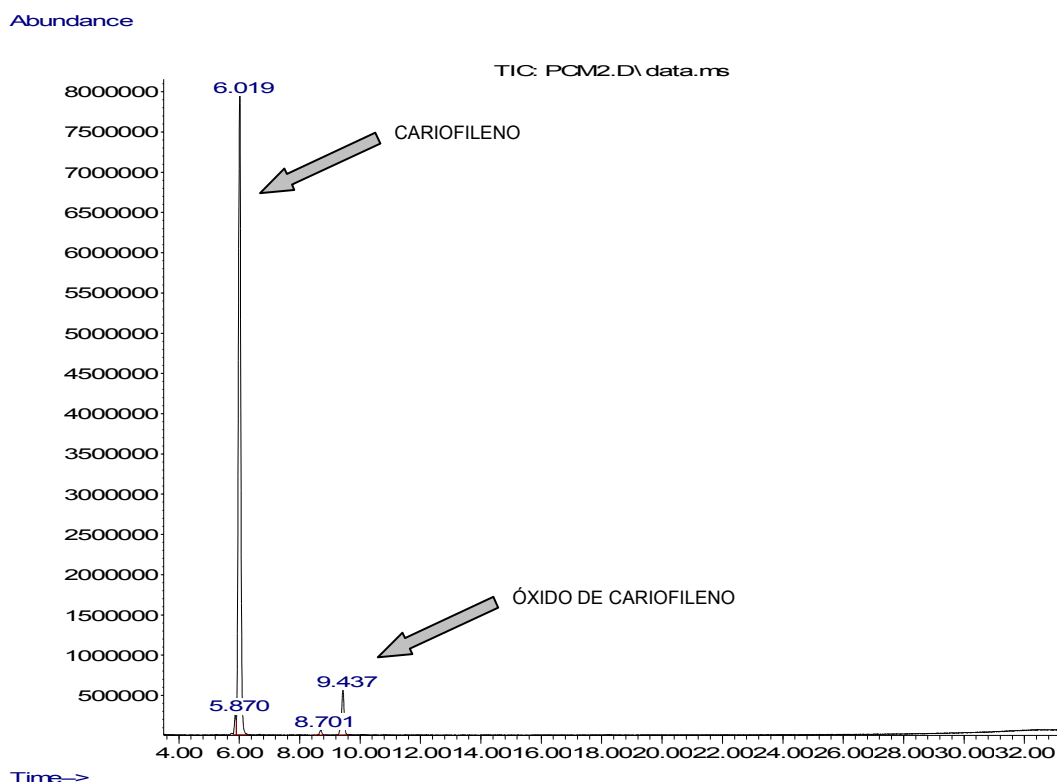


Figura 13. Cromatograma do padrão *trans*-cariofileno, esterificado pelo método IUPAC, obtido em Cromatógrafo Gasoso 6850 (Agilent®) acoplado a Espectrômetro de Massa 5973 (CG-EM).

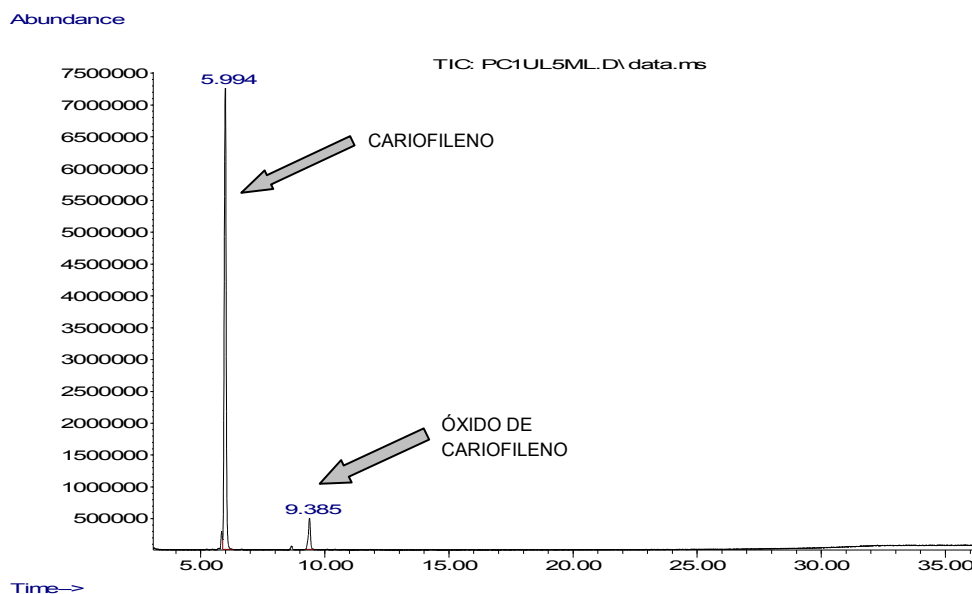


Figura 14. Cromatograma do padrão *trans*-cariofileno, não esterificado, obtido em Cromatógrafo Gasoso 6850 (Agilent®) acoplado a Espectrômetro de Massa 5973 (CG-EM).

Analisou-se possíveis interferências do método de esterificação IUPAC, pela leitura de uma amostra branco do mesmo, ou seja, procedendo a metodologia de esterificação sem adicionar nenhum componente e realizando a leitura da fração hexânica no cromatógrafo. Este ensaio demonstrou que não existem substâncias do método que interferem na análise cromatográfica (Figura 15).

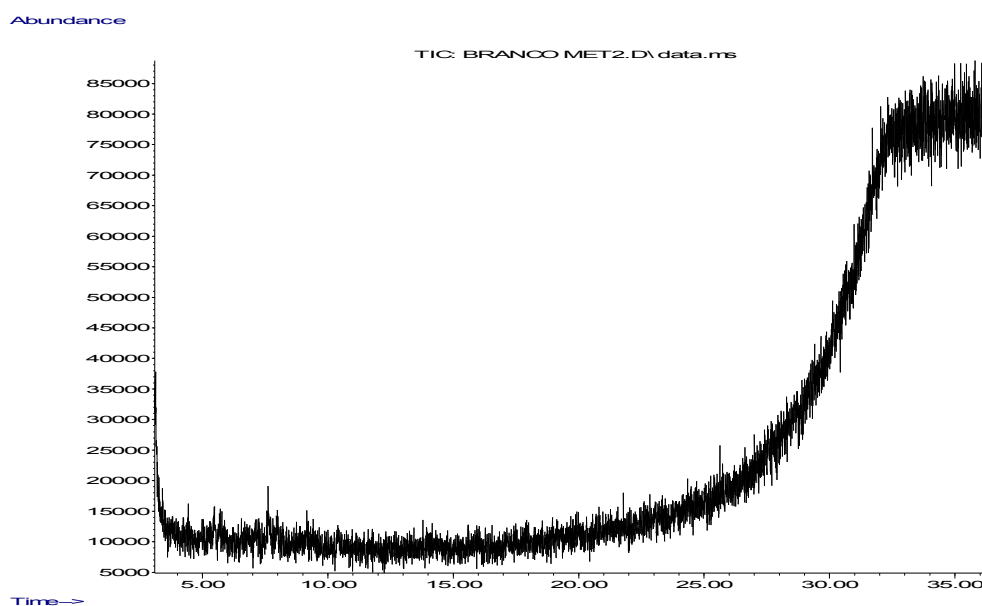


Figura 15. Cromatograma do Branco utilizado no método de esterificação IUPAC, obtido em Cromatógrafo Gasoso 6850 (Agilent®) acoplado a Espectrômetro de Massa 5973 (CG-EM).

Quadro 7. Composição do óleo-resina de *C. duckei* e os respectivos tempo de retenção (TR) conforme o tratamento da amostra: esterificado (H&L), esterificado (IUPAC) e não esterificado.

Óleo-resina - H&L		Óleo-resina – IUPAC		Óleo-resina - Não esterificado	
RT	COMPOSTO	RT	COMPOSTO	RT	COMPOSTO
5,027	Benzene	4,544	Cyclohexene	4,556	Cyclohexene
5,422	β -ememeno /ciclohexano	4,754	α -Cubebene	4,766	α -Cubebene
6,179	1R,3Z,9S-2,6,10,10-Tetramethylbicyclo [7.2.0]undeca-2,6-diene	5,218	α -Copaene	5,231	α -Copaene
6,402	Caryophyllene	5,422	Cyclohexane	5,434	Cyclohexane/ β -elemene
6,624	γ -1-cadinene	5,651	3H-3a,7-Methanoazulene,	5,670	α -Gurjunene
7,076	Naphthalene	5,842	<i>Trans</i> -Caryophyllene	5,861	<i>Trans</i> -Caryophyllene
7,140	α -Muurolene; Naphthalene	5,988	Caryophyllene	6,007	Caryophyllene
7,591	α -Muurolene; Naphthalene	6,185	1-ethenyl-1-methyl-2-(1-methylethenyl)-4-(1-methylethylidene)-bicyclogermacrene	6,204	γ -Elemene
7,833	β -Bisabolene; Cyclohexene	6,293	<i>trans</i> - α -Bergamotene	6,312	<i>trans</i> - α -Bergamotene
7,967	1H-Benzocycloheptene	6,624	α -Caryophyllene	6,643	α -Humulene
8,107	δ -Cadinene; Naphthalene	6,777	1H-Cycloprop[e]azulene	6,789	1H-Cycloprop[e]azulene
8,418	δ -Selinene	7,076	Naphthalene	7,095	Naphthalene
8,622	cis- α -bisabolene	7,171	Germacrene D	7,197	Germacrene-D
9,156	-	7,286	α -Selinene	7,311	1H-Cycloprop[e]azulene, decahydro-1,1,7-trimethyl-4-methylene
9,875	-	7,521	4,7-Methanoazulene	7,540	4,5-dimethyl-11-methylenetricyclo[7.2.1.0(4.9)]dodecane
1,251	-	7,846	β -Bisabolene	7,629	α -Muurolene
10,524	-	8,126	δ -Cadinene	7,871	δ -Bisabolene
10,759	-	8,635	cis- α -bisabolene	8,151	γ -Cadinene
11,179	γ -Cadinene	8,921	Germacrene B	8,666	cis- α -bisabolene
11,873	Patchoulene / α -Copaene	9,366	Caryophyllene oxide	8,953	Germacrene B
12,025	-	10,384	-	9,398	Caryophyllene oxide
12,738	-	21,225	Palmitic acid-methyl Ester	10,422	Fonenol
14,519		28,687	Linoleic acid, methyl Ester		
21,002	Palmitic acid-methyl Ester				

As amostras do óleo-resina de copaíba apresentaram teor de cariofileno em torno de 500 ng/mL (0,5 %), o que representa uma faixa adequada para quantificação pelo método proposto. Na Figura 16 pode ser observado o cromatograma e a análise quantitativa de uma das amostras.

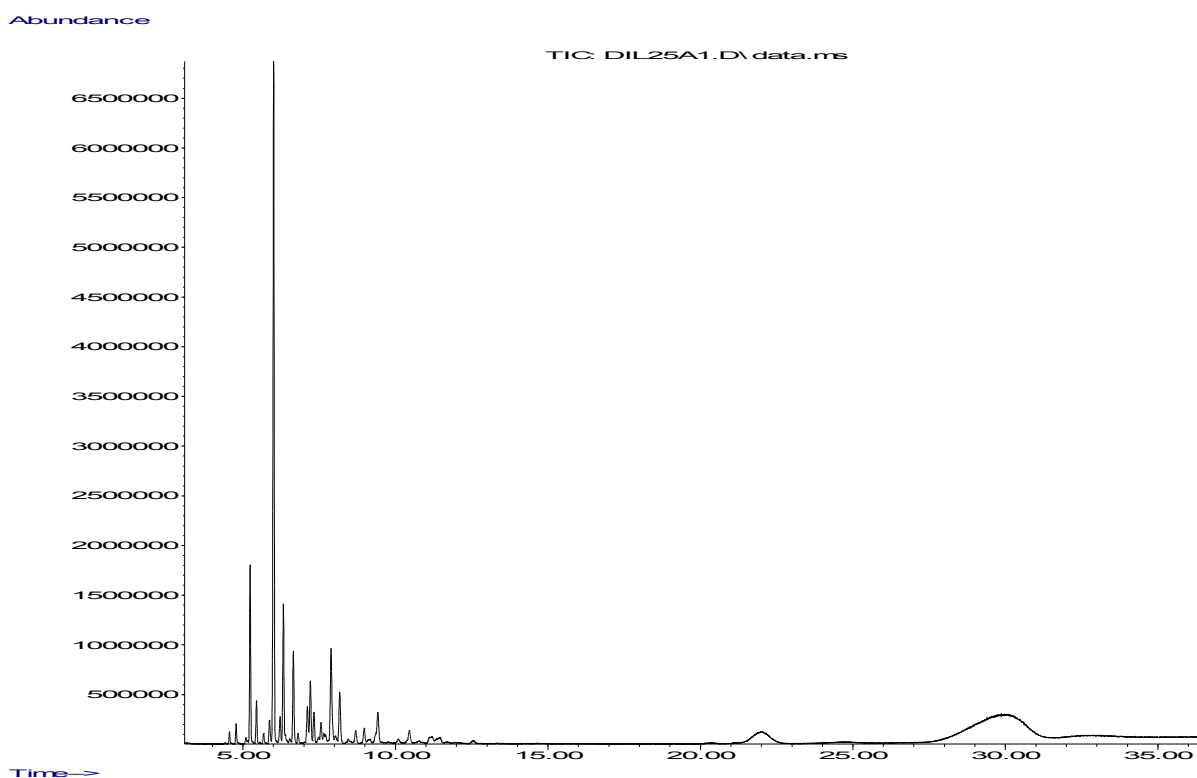


Figura 16. Cromatograma e análise quantitativa do óleo-resina de *C. duckei* Dwyer, obtido em Cromatógrafo Gasoso 6850 (Agilent®) acoplado a Espectrômetro de Massa 5973 (CG-EM).

5.2. Peso Materno

Durante o período de tratamento (30 dias) e no período de gestação (do zero ao 21º dia) não foram registrados mortes e sinais clínicos visíveis de toxicidade materna, tais como: perda de peso e redução do consumo de ração.

O peso médio das ratas do grupo Controle, TCVB e TCVC apresentaram valores muito próximos, não sendo observada diferença estatística significativa entre esses grupos, desde o dia Zero até o 21º dia de prenhez. O tratamento com o creme vaginal do óleo-resina de copaíba não interferiu no peso materno em qualquer período da prenhez (Tabela 1).

Tabela 1. Pesos (g) das ratas, dos grupos Controle, Creme Vaginal Base e Creme Vaginal de Copaíba, expresso em média \pm desvio padrão, de acordo com o dia de prenhez.

	CONTROLE	TCVB	TCVC
Dia Zero	251,4 \pm 23,3	252,8 \pm 15,6	252,1 \pm 19,8
Dia 5	266,6 \pm 20,6	270,6 \pm 17,3	267,8 \pm 16,1
Dia 14	293,2 \pm 20,2	296,8 \pm 17,2	294,5 \pm 19,4
Dia 21	344,4 \pm 22,0	363,4 \pm 18,3	346,0 \pm 37,2

n=5-6/grupo. Os valores não diferem entre si ao nível de 5 %. ANOVA, seguido do teste de Tukey.

A evolução do ganho de peso materno foi progressiva durante o período de prenhez, em todos os grupos estudados. Algumas ratas do grupo TCVB e TCVC atingiram ganho de peso superior a 80 g no final da prenhez. No grupo Controle esse aumento foi menor, com valores menores que 75 g (Figura 17). Não foi observada diferença significativa entre os três grupos.

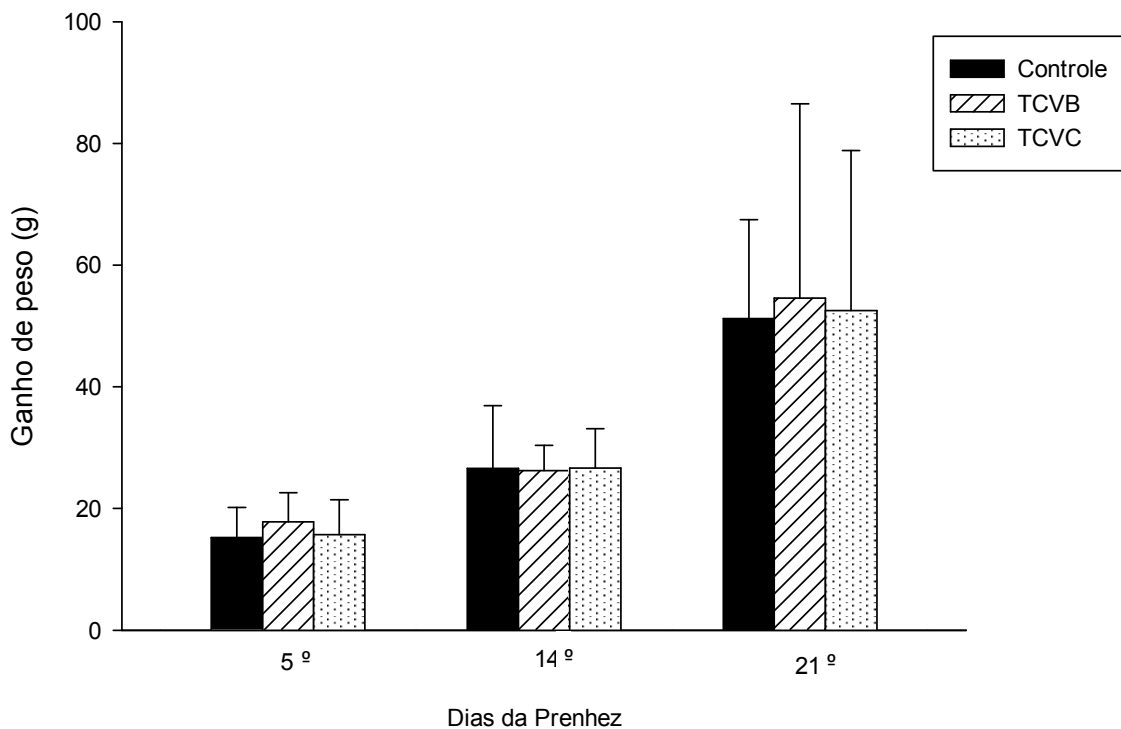


Figura 17. Evolução do ganho de pesos das ratas, expresso em gramas (g), dos grupos Controle, TCVB e TCVC, de acordo com o dia de prenhez. As colunas representam as médias e o desvio padrão da variável peso de n = 5-6/grupo.

5.3. Performance Reprodutiva Materna

Das cinco e seis ratas acasaladas, do grupo Controle e TCVC, respectivamente, todas levaram a prenhez a termo (100 %). Entretanto, das seis ratas acasaladas do grupo TCVB, somente cinco levaram a prenhez a termo (83,33 %). Essa diferença não foi significativa ao comparar com os grupos Controle e TCVC (Tabela 2).

Tabela 2. Número de ratas acasaladas, prenhez a termo e taxas de perda (%) pré e pós-implantação do blastocisto nas ratas prenhes dos grupos Controle, TCVB e TCVC.

	CONTROLE	TCVB	TCVC
Ratas acasaladas	5	6	6
Prenhez a termo	5	5	6
Taxa de Prenhez a termo (%)	100,00	83,33	100,00
Perda pré (%)	30,76	6,66	45,53
Perda pós (%)	22,22	0,00	3,33

n=5-6/grupo. Os valores não diferem entre si ao nível de 5%. Teste de Kruskal-Wallis.

5.4. Peso dos Fetos, das Placentas e Índice Placentário

Após a laparotomia não se constatou, entre os três grupos, a presença de natimortos. No grupo tratado com creme vaginal do óleo-resina de copaíba (TCVC) o peso médio fetal foi 4,82 g e o placentário ficou em torno de 0,5 g, determinando índice placentário médio de 0,08 g. Não se observou diferença significativa desses parâmetros em relação ao tratamento com o creme vaginal base (TCVB), que contém apenas os componentes da formulação, e ao grupo controle (NT), que recebeu somente solução fisiológica 0,9%. Esses parâmetros de avaliação podem ser observados nas Tabelas 3, 4 e 5.

Tabela 3. Peso dos filhotes (Peso Fetal), expresso em média e desvio padrão, das ratas dos grupos Controle, TCVB e TCVC.

	Controle	TCVB	TCVC
Mínimo	2.93	3.85	3.98
Máximo	6.24	5.42	7.25
Mediana	4.77	4.85	4.78
p25	4.63	4.60	4.54
p75	5.00	5.03	4.97
Média Aritmética	4.82	4.81	4.82
Desvio Padrão	0.52	0.35	0.56

n/grupos: Controle (n = 34); TCVB (n = 51) e TCVC (n = 43). Os valores não diferem entre si ao nível de 5 %.
Teste de Kruskal-Wallis.

Tabela 4. Peso das Placentas (Peso Placentário), expresso em média e desvio padrão, das ratas dos grupos Controle, TCVB e TCVC.

	Controle	TCVB	TCVC
Mínimo	0.31	0.28	0.28
Máximo	0.61	0.6	0.94
Mediana	0.40	0.38	0.38
p25	0.36	0.35	0.35
p75	0.43	0.42	0.43
Média Aritmética	0.40	0.39	0.41
Desvio Padrão	0.07	0.06	0.12

n/grupos: Controle (n = 34); TCVB (n = 51) e TCVC (n = 43). Os valores não diferem entre si ao nível de 5 %.
Teste de Kruskal-Wallis.

Tabela 5. Índice Placentário (IP), obtido pela razão entre cada Peso Placentário e respectivo Peso Fetal das ratas dos grupos Controle, TCVB e TCVC.

	Controle	TCVB	TCVC
Mínimo	0,06	0,00	0,05
Máximo	0,13	0,11	0,16
Mediana	0,08	0,08	0,08
p25	0,07	0,07	0,07
p75	0,09	0,08	0,08
Média Aritmética	0,08	0,07	0,08
Desvio Padrão	0,01	0,01	0,02

n/grupos: Controle (n = 34); TCVB (n = 51) e TCVC (n = 43). Os valores não diferem entre si ao nível de 5 %.

Teste de Kruskal-Wallis.

5.5. Teste para Confirmação dos Sítios de Implantações e de Reabsorções

Ao colocar o útero na solução contendo hidróxido de sódio 0,2 %, os nódulos de reabsorção invisíveis foram revelados e após a observação, foram identificados como positivos, NaOH (+) (Figura 18). Essa revelação ocorreu no útero de três ratas (3/6) tratadas com o creme vaginal do óleo-resina de copaíba (TCVC) e no útero de todas as ratas (5/5) do grupo controle. Apesar das reabsorções terem sido elevadas no grupo controle (Figura 19), não houve diferença significativa entre os três grupos.



Figura 18. Útero de uma rata do grupo TCVC. Após duas horas em solução NaOH 0,2 %, um ponto de implantação invisível foi revelado, NaOH (+) (observar a ponta da seta).

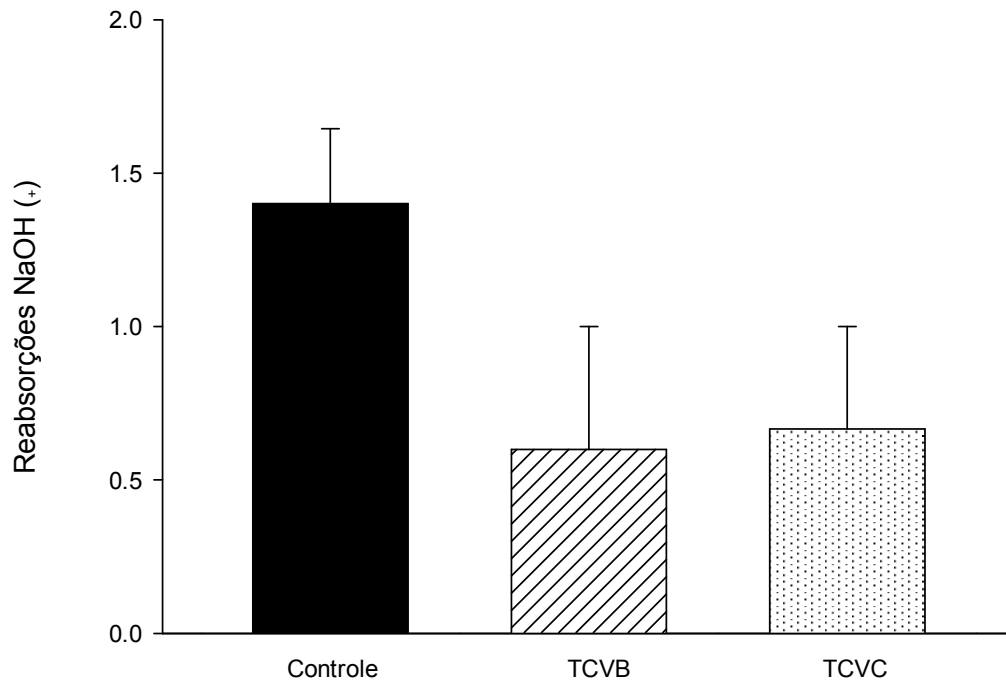


Figura 19. As colunas representam as médias \pm erro padrão da média da variável reabsorção das ratas do grupo Controle, TCVB e TCVC de $n = 5-6$ /grupo. Não foi significativo para $p < 0,05$.

5.6. Peso e Classificação dos Recém-nascidos

A maioria dos RNs de ratas dos grupos TCVC e TCVB apresentou peso Adequado para a Idade de Prenhez (AIP) com 72,1 % e 72,5 %, respectivamente. A porcentagem de RNs Pequenos para Idade de Prenhez (PIP) foi maior no grupo TCVC, todavia, essa diferença não foi estatisticamente significativa, ao nível de 5 %, quando comparado com os outros grupos, Controle e TCVB (Tabela 6).

Tabela 6. Porcentagem (%) de recém-nascidos Pequenos (PIP), Adequados (AIP) e Grandes (GIP) para Idade de Prenhez, de ratas Tratadas com Creme Vaginal de Copaíba (TCVC), Creme Base (TCVB) e Controle.

	Controle	TCVB	TCVC
PIP	2,9 %	9,8 %	14,0 %
AIP	82,4 %	72,5 %	72,1 %
GIP	14,7 %	17,6 %	14,0 %

Os valores não diferem entre si ao nível de 5%. Teste do Qui-Quadrado.

O predomínio de recém-nascidos AIP (Figura 20), com igual proporção de GIP e PIP, não esteve relacionado com a utilização do creme vaginal do óleo-resina de copaíba, embora tenha sido observado que a porcentagem de filhotes pequenos (PIP) tenha sido menor no grupo controle, não foi observada diferença estatística significativa (Figura 21).



Figura 20. Recém-nascido Adequado para a Idade de Prenhez - AIP (A) e Pequeno para Idade de Prenhez - PIP (B).

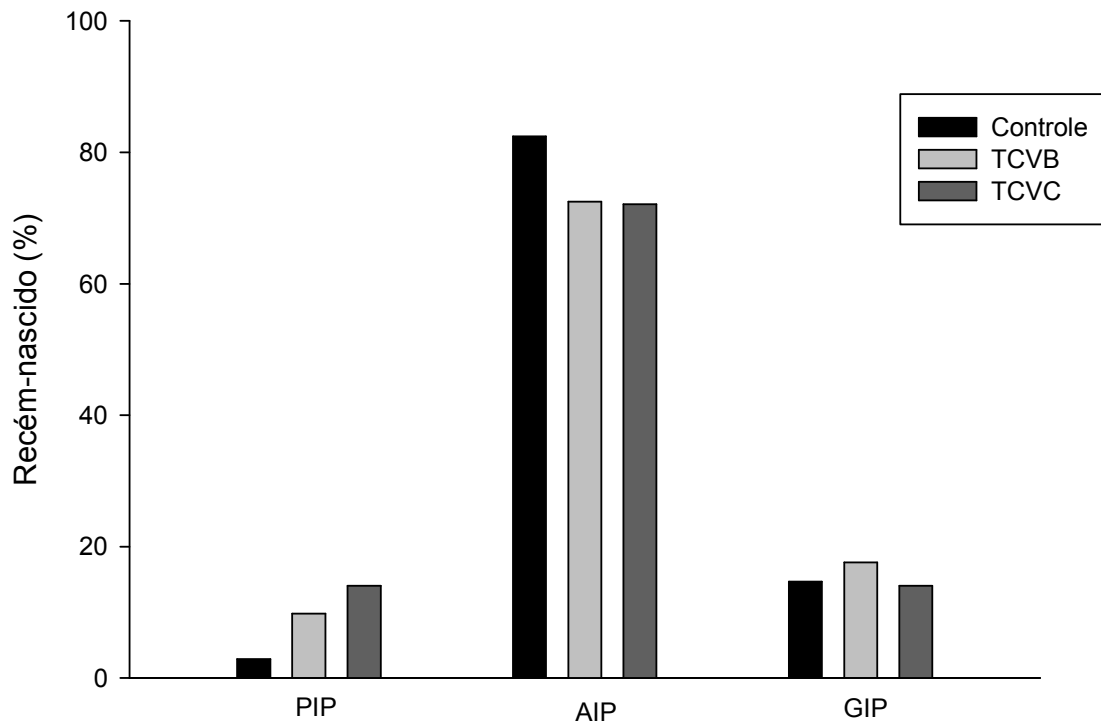


Figura 21. Porcentagem (%) de recém-nascidos pequenos (PIP), adequados (AIP) e grandes (GIP) para idade de prenhez em ratas tratadas com creme vaginal de copaíba (TCVC), creme base (TCVB) e controle.

5.7. Contagem dos Pontos de Ossificação

A contagem total dos pontos de ossificação foi, em média, 42,3, 39,6 e 39,9, respectivamente, nos grupos Controle, TCVB, TCVC. O tratamento com creme vaginal do óleo-resina de copaíba não evidenciou diferença significativa na contagem total ou diferencial desses pontos de ossificação, quando comparado com os grupos TCVB e Controle (Tabela 7).

Tabela 7. Média e desvio-padrão dos pontos de ossificação de recém-nascidos de ratas do grupo Controle, TCVB e TCVC.

	Controle	TCVB	TCVC
Falanges anteriores	6,0 ± 2,4	4,9 ± 2,2	3,0 ± 1,7
Metacarpos	7,8 ± 0,4	8,0 ± 0,0	7,8 ± 0,5
Falanges posteriores	6,6 ± 2,3	5,3 ± 3,2	5,7 ± 2,9
Metatarsos	9,7 ± 0,6	10,0 ± 0,0	10,0 ± 0,0
Vértebras caudais	3,9 ± 1,0	3,8 ± 1,1	3,8 ± 1,4
Esternébrios	3,9 ± 1,0	3,8 ± 1,1	3,8 ± 1,4
Ossificação Total	42,3 ± 9,8	39,6 ± 7,7	39,9 ± 5,5

n/grupo: Controle (n = 18), TCVB (n = 26) e TCVC (n = 23). Os valores não diferem entre si ao nível de 5 %. – Teste de Kruskal-Wallis.

5. 8. Análise das Anomalias e Malformações Externas e Internas (esqueléticas e viscerais)

No grupo Controle não foram diagnosticados malformações ou anomalias externas. Apesar da ocorrência de anomalias e/ou malformações detectadas nos grupos TCVB e TCVC, a diferença não foi considerada significativa. Com relação às malformações e/ou anomalias esqueléticas e viscerais, todos os grupos foram afetados, sem diferença estatística significativa, ao nível de 5 %. O número de ninhadas afetadas também não apresentou diferença significativa entre os grupos. Desta forma, o tratamento tópico com óleo-resina de copaíba não aumentou a frequência das malformações e anomalias esqueléticas e viscerais (Tabela 8).

Tabela 8. Frequências de anomalias e malformações externas, esqueléticas e viscerais conforme em ninhadas e recém-nascidos de ratas dos grupos Controle, TCVB e TCVC.

	Controle	TCVB	TCVC
Malformações externas			
Recém-nascidos afetados	0/36	1/51	2/43
Ninhadas afetadas	0/5	1/5	2/6
Anomalias externas			
Recém nascidos afetados	0/36	0/51	1/43
Ninhadas afetadas	0/5	0/5	1/6
Malformações esqueléticas			
Recém-nascidos afetados	2/18	4/26	7/23
Ninhadas afetadas	1/5	3/5	3/6
Anomalias esqueléticas			
Recém-nascidos afetados	8/18	15/26	12/23
Ninhadas afetadas	3/5	5/5	3/6
Malformações viscerais			
Recém-nascidos afetados	8/18	5/25	7/21
Ninhadas afetadas	4/4	3/5	5/5
Anomalias viscerais			
Recém-nascidos afetados	1/18	4/25	4/21
Ninhadas afetadas	1/4	3/5	3/5

Os valores não diferem entre si ao nível de 5 %. - Teste de Goodman.

A análise diferencial das malformações e anomalias não comprovou diferença significativa do efeito do tratamento com óleo-resina de copaíba, veiculado em creme vaginal. Entre as malformações esqueléticas detectadas, a mais visível, nos três grupos, foi agenesia de falanges (Figura 22) e entre as anomalias foi encontrado com maior frequência o esternóbrio “em borboleta” (Figura 23). Não obstante, as diferenças encontradas não foram significativas entre os três grupos (Tabela 9).

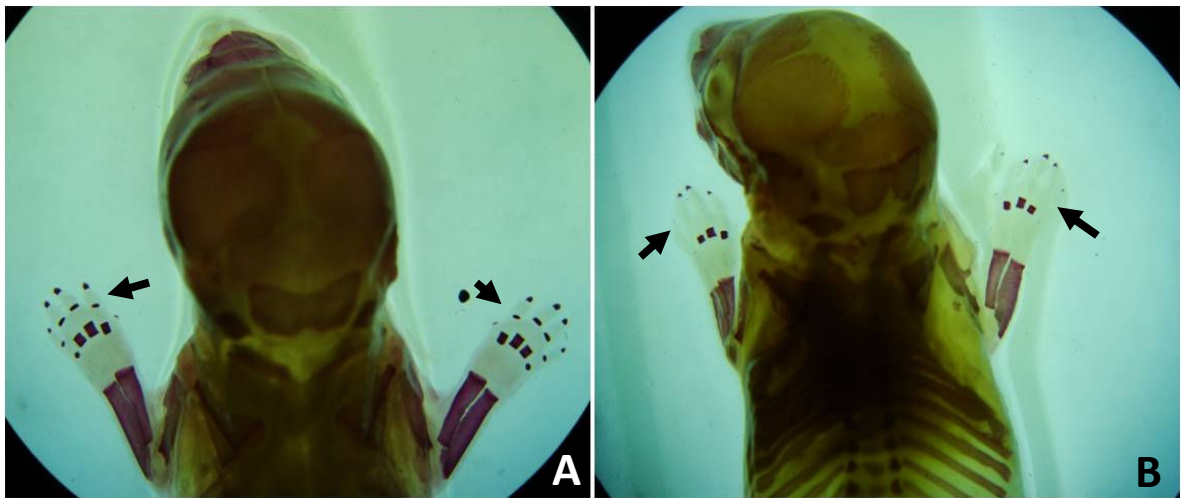


Figura 22. Recém-nascido do grupo TCVB com falanges normais (A) e com agenesia de falanges (B) (observar a ponta da seta).

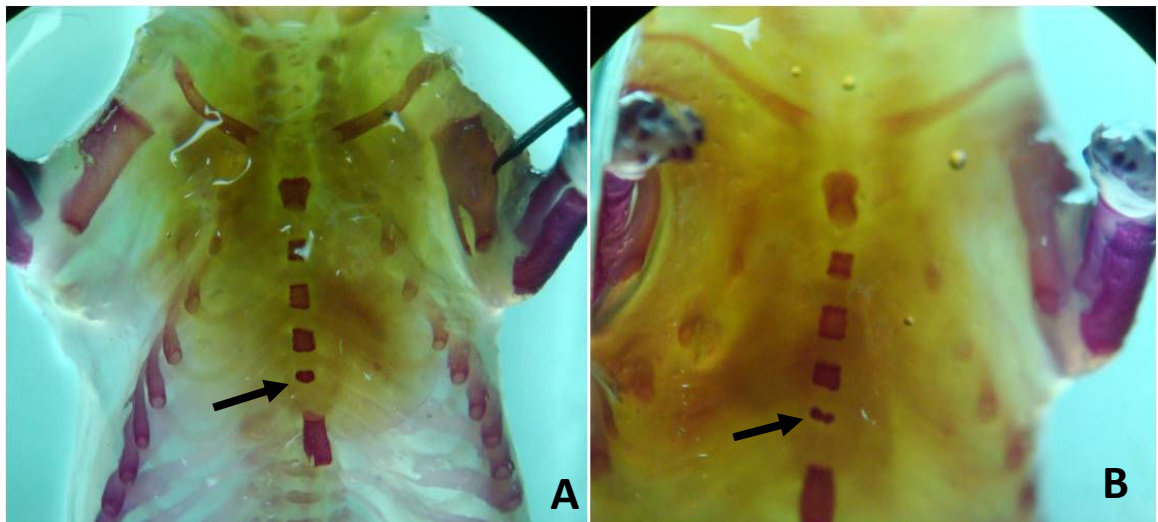


Figura 23. Recém-nascido do grupo Controle com esternébrios normais (A) e com o 5º esternébrio em borboleta (B) (observar a ponta da seta).

Tabela 9. Percentual (%) de malformações e anomalias externas e esqueléticas de recém-nascidos das ratas do grupo Controle, TCVB e TCVC.

	CONTROLE	TCVB	TCVC
Malformações e/ou Anomalias Externas (%)			
Olhos mal posicionados	0,0	2,0	0,0
Calda malformada	0,0	0,0	2,3
Malformações esqueléticas (%)			
Metacarpo	5,6	0,0	8,7
Metatarso	11,1	0,0	0,0
Agenesia de falanges	27,8	30,8	30,4
Agenesia de costela	0,0	3,8	0,0
Hipoplasia de Costela	0,0	3,8	0,0
Anomalias esqueléticas (%)			
Esternébrio atrofiado	5,6	0,0	4,3
Esternébrio rudimentar	5,6	3,8	17,4
Esternébrio em <i>shaped</i>	0,0	0,0	4,3
Esternébrio em borboleta	22,2	11,5	8,7
Crânio - Ossificação reduzida	0,0	3,8	4,3

Os valores não diferem entre si ao nível de 5 %. - Teste de Goodman.

Ao observar os detalhes das anomalias e malformações viscerais, nota-se que o percentual de criptorquidismo, no grupo controle foi maior (22,2 %) que no grupo TCVC (14,3 %), contudo, essa diferença não foi significativa entre os três grupos analisados. O grupo TCVB apresentou maior percentual de anomalia visceral, localizada no ventrículo lateral (Figura 24), porém essa diferença não foi significativa (Tabela 10).

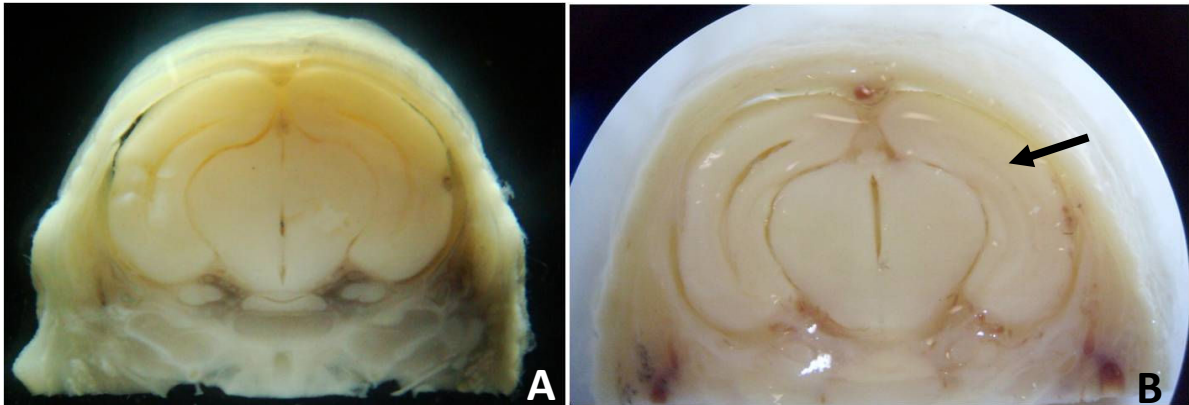


Figura 24. Secção da cabeça, evidenciando os dois ventrículos laterais normais, de um recém-nascido do grupo Controle (A), e de um do grupo TCVB, com ventrículo lateral fechado (B) (observar a ponta da seta).

Tabela 10. Percentual de malformações e anomalias viscerais de recém-nascidos de ratas do grupo Controle, Creme Vaginal Base (TCVC) e Creme Vaginal de Copaíba (TCVC).

	CONTROLE	TCVB	TCVC
Malformações Viscerais (%)			
Criptorquidismo	22,2	4,0	14,3
Rim Hipoplástico	5,6	0,0	0,0
Rim supranumerário	5,6	0,0	0,0
Microftalmia	5,6	4,0	0,0
Analfthalmia	0,0	0,0	4,8
Alteração no septo nasal	5,6	0,0	9,5
Inversão de pulmões	0,0	8,0	0,0
Defeito na Aorta	0,0	4,0	0,0
Destrocardia	0,0	4,0	0,0
Alteração no septo interventricular	0,0	0,0	4,8
Anomalias Viscerais (%)			
Ventrículo lateral	5,6	12,0	4,8
Alteração na retina	0,0	4,0	4,8
Olhos mal posicionados	0,0	4,0	9,5
Hemorragia cerebral	5,6	0,0	0,0
Hérnia do Diafragma	5,6	0,0	0,0

Os valores não diferem entre si ao nível de 5%. - Teste de Goodman.

6. DISCUSSÃO

A etnobotânica e etnofarmacologia são importantes no processo de desenvolvimento de novos fitomedicamentos (ALVES, 2005). A cadeia produtiva desses tipos de medicamentos tem, normalmente, como ponto de partida o conhecimento popular e a obtenção da matéria-prima (PETROVICK *et al.*, 1997). Desta forma, o emprego farmacêutico dessa matéria-prima dependerá, inicialmente, da determinação de métodos analíticos para avaliar sua composição química.

Após a eleição dos métodos analíticos, o próximo passo relaciona-se com a validação das técnicas qualitativas e quantitativas apropriadas aos marcadores escolhidos. Os protocolos de validação consideram aspectos de reprodutibilidade, robustez, precisão e limites de detecção, além de avaliarem a presença e a causa de erros (BASSANI *et al.*, 2005). Nesse sentido, na literatura, já foi relatado o desenvolvimento de vários protocolos de validação metodológica para a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Souza *et al.* (2002) validaram o protocolo de identificação e quantificação dos flavonóides presentes em *Achyrocline satureioides* e *Phyllanthus niruri*. Os protocolos para *Passiflora edulis* (PETRY *et al.*, 1998) e *Baccharis trimera* (PALAZZO DE MELO; PETROVICK, 2000) também já foram validados.

A Cromatografia a Gás acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM) é uma das técnicas mais importantes que se dispõe para análise de misturas complexas voláteis e de baixo peso molecular. Vários trabalhos científicos relatam a utilização da técnica de CG-EM para análise qualitativa e quantitativa do óleo-resina de copaíba (VEIGA-JÚNIOR, 1997; RIGAMONTE-AZEVEDO, 2004; TAPPIN, 2004; BIVALTI, 2006). Devido a sua rapidez e reprodutibilidade, a CG-EM está cada vez mais presente nas análises de rotina dos laboratórios de química de produtos naturais e no setor de controle de qualidade dos laboratórios farmacêuticos (SIQUEIRA, 2003).

Neste estudo essa técnica cromatográfica foi eficaz, pois possibilitou a separação dos componentes da amostra, e o espectrômetro de massas forneceu o perfil de fragmentação, sendo possível identificar os constituintes presentes no óleo-resina *C. Duckei* Dwyer, utilizado na produção do creme vaginal do óleo de copaíba. O marcador pesquisado, o β -cariofileno, além de estar disponível comercialmente, é utilizado como padrão em diversos trabalhos de quantificação do óleo-resina de copaíba. Ele é apontado como responsável por várias ações farmacológicas descritas ao óleo-resina de copaíba (VEIGA-JÚNIOR; PINTO, 2002; TAPPIN 2004).

Segundo a pesquisa realizada por Rigamonte-Azevedo (2004), o cariofileno é o terpenóide encontrado com maior frequência (100 %) nos óleos de copaíba estudados. Por isso, o teor de cariofileno nos óleos de copaíba deve ser monitorado, para certificar a qualidade desse produto. Contudo, ainda não há estudos envolvendo a padronização desse teor no óleo-resina utilizado como matéria-prima, sendo este, um estudo pioneiro.

O teor encontrado foi de 0,5 % (500 ng/mL), que corresponde a um teor adequado, tanto para ser utilizada como marcador do fitomedicamento como para ser detectado pelo método proposto, o de esterificação da IUPAC. A análise do óleo-resina em CG-EM, portanto, certifica a qualidade desse produto (CASCON; GILBERT, 2000).

Estudo realizado por Lameira *et al.* (2009), com *C. duckei* Dwyer, detectou o β -cariofileno, variando de 13,0-15,5%, 25,1-50,2% e 50,1-61,8%, nas amostras de óleos-resina de três árvores. Apesar desse estudo ter demonstrado uma variação sazonal, na composição química da fração volátil dessa espécie, este composto está presente em todas as espécies de *Copaifera*, sendo assim, foi escolhido como marcador de qualidade do produto aqui estudado.

O β -cariofileno é um sesquiterpeno bicíclico natural que está presente, como maior constituinte, em alguns óleos essenciais, utilizados na medicina popular, especialmente, óleo de cravo (GOIRIS *et al.*, 2002; GRAMOSA; SILVEIRA, 2005). Esses óleos essenciais inibem o crescimento de algumas bactérias, leveduras e fungos (ALMA *et al.*, 2003; HONG *et al.*, 2004; LOURENS *et al.*, 2004; SABULAL *et al.*, 2006; SAROGLU *et al.*, 2007) e, portanto, têm sido usados em uma variedade de produtos alimentares (GOIRIS *et al.*, 2002).

Shafin *et al.* (2002) avaliaram a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Aristolochia indica*, que demonstrou moderada atividade contra seis organismos testados. Segundo o autor, esta atividade pode ser atribuída à presença do β -cariofileno, α -humuleno, óxido de cariofileno e linalol. Alguns constituintes presentes no óleo essencial de *Abies balsamea* L. foram isolados e testados quanto ao seu potencial antimicrobiano, revelando MIC (Concentração Inibitória Mínima) de 13,6 μ g/mL, 5,1 μ g/mL e 2,6 μ g/mL, respectivamente, ao α -pineno (14,6 %), β -cariofileno (0,4 %) e α -humuleno (0,2 %) frente a *S. aureus* (PICHETTE *et al.*, 2006). Sabulal *et al.* (2006), em estudo levado a efeito, demonstraram a atividade antimicrobiana de *Zingiber nimmonii*, um rizoma rico em cariofileno.

Na literatura, vários estudos com óleos essenciais têm apresentado boa atividade antibacteriana, que são atribuídas aos compostos voláteis presentes, incluindo o β -cariofileno (SABULAL *et al.*, 2006; DELAMARE *et al.*, 2007). Por outro lado, Muroi e Kubo (1993) indicaram que o β -cariofileno tem fraca à moderada atividade antibacteriana. Todavia, é importante lembrar que a ação farmacológica de um produto natural, comumente, depende da

ação conjunta dos seus constituintes (CARVALHO, 2004). Desta forma, a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais, que contêm o β -cariofileno, pode ser dada a uma sinergia entre este e os demais constituintes presentes naqueles óleos, resultando em diferentes graus de atividade antimicrobiana (TYLER, 1997; CARVALHO, 2004).

Um exemplo importante de sinergismo é o efeito analgésico da *Croton urucurana*, planta popularmente utilizada no tratamento da dor e inflamação. Alguns compostos isolados do extrato de acetato de etila desta planta, catequina e a galocatequina, também foram testados quanto ao seu efeito analgésico em camundongos, demonstrando serem menos potentes do que a própria fração. O mesmo ocorreu com o glicosídeo do β -sitosterol, presente na fração metanólica daquela planta, que possui uma baixa atividade analgésica e isoladamente não justificaria o potente efeito analgésico observado para esta fração. Desta forma, o efeito analgésico de *C. urucurana* se deve a uma associação de vários fitoconstituintes, incluindo campesterol, stigmasterol, β -sitosterol, ácido acetil-aleuritólico, catequina, galocatequina e glicosídeo do β -sitosterol. É importante ressaltar que nestes exemplos, os compostos isolados, apesar de se encontrarem em concentrações baixas, atuam sinergicamente, provavelmente através do mesmo mecanismo de ação ou por mecanismos diferentes (PERES *et al.*, 2008).

Os sesquiterpenos compreendem cerca de 80 % dos óleos de copaíba estudados, e os mais comuns são α -copaeno, β -cariofileno, β -bisaboleno, α e β -selineno, α -humuleno e δ e γ -cadideno (VEIGA-JÚNIOR; PINTO, 2002). Devido ao crescente aumento da resistência microbiana aos tratamentos medicamentosos de rotina; de fato, se faz necessário a busca de novos agentes antimicrobianos, que sejam efetivos e com um grau de toxicidade baixo ou inexistente (ORLANDO, 2005).

Avaliações iniciais dos testes de sensibilidade (*screenings*) possibilitam a descoberta da efetividade das ações de fitoterápicos, frente aos diversos micro-organismos, independente da técnica de extração utilizada. Os métodos de teste para diversos micro-organismos são similares, sendo mais utilizados os testes de microdiluição em meio líquido e os testes de difusão em meio sólido, com discos ou poços (COWAN, 1999), o que em função da potencialidade do extrato, o mesmo pode apresentar resultados tanto positivos como negativos (GONÇALVES *et al.*, 2005). Santos *et al.* (2008) estudaram a atividade antimicrobiana de óleos de *Copaifera sp.*, sendo relatada boa atividade contra bactérias gram-positivas. Frente aos resultados obtidos, o autor sugere os óleos de copaíba como potencial novo agente terapêutico, seletivo, para tratar importantes doenças infecciosas.

Os medicamentos tópicos são produtos usados externamente, visando sua ação local na pele e mucosas. Embora a pele possa funcionar como depósito de substâncias ativas, acredita-se que o desenvolvimento de toxicidade seja mínimo na administração tópica, pois raramente o fármaco é absorvido de forma sistêmica, em quantidade significativa, se a pele estiver íntegra (GOODMAN *et al.*, 1990; ROBERT; SCIALLI, 1994). No entanto, existem fatores que tornam variável a transposição da barreira cutânea, tal como, dermatopatias, trauma físico, umidade, temperatura e extensão da área de aplicação do fármaco (LEITE *et al.*, 1997). Segundo Robert e Scialli (1994) as mudanças fisiológicas da gravidez, como aumento do volume extracelular, circulação e hidratação cutânea, resultam em maior absorção e modificação da distribuição de agentes aplicados topicamente.

A exposição materna a agentes químicos, durante o período de gestação, pode resultar em alterações no desenvolvimento do conceito. Essas alterações dependem de fatores inerentes ao organismo materno, à funcionalidade placentária ou a uma ação direta no próprio organismo embriofetal, que por vez, pode ocasionar a morte do conceito, malformações e/ou anomalias, ou ainda, prejuízo no desenvolvimento físico e/ou comportamental do recém-nascido (CALLIARI-MARTIN *et al.*, 2001).

O uso de plantas medicinais na gestação, mesmo de uso tópico, pode resultar em diferentes alterações no desenvolvimento embriofetal, devido à interferência na implantação embrionária, com efeito abortivo (embriofetalidade) ou embriofetotoxicidade (ALMEIDA; LEMÔNICA, 2000; LYRA *et al.*, 2005). Neste estudo, avaliou-se a performance reprodutiva materna, através da observação de alguns parâmetros, tal como, peso materno, número de fetos vivos e porcentagem de perda pré e pós-implantação.

Poucos estudos experimentais têm sido realizados para testar os efeitos teratogênicos de plantas medicinais, embora a extrapolação desses dados tenha fundamental importância para a prevenção de riscos tóxicos, tanto para a gestante como para o conceito. Um exemplo de efeito tóxico ao conceito, foi descrito no estudo com extrato aquoso de boldo (*Coleus barbatus*) administrado em ratas prenhes, nas doses de 440 e 880 mg/kg/dia, durante o período organogênico, que resultou em alterações vertebrais e diminuição do número de centros de ossificação (ALMEIDA; LEMÔNICA, 2000).

Levando em consideração a maior possibilidade de absorção do medicamento no período gestacional, durante a realização dos ensaios toxicológicos, deve-se ficar atento aos sinais clínicos, evidentes, de toxicidade materna, resultante da morte ou redução no ganho de peso corporal (CALLIARI-MARTIN, 1998).

É importante ressaltar que a avaliação ponderal da gestante é um dos parâmetros mais relevante, isso porque, avalia de modo indireto o grau de comprometimento materno e fetal. Desta forma, podemos dizer que, a perda de massa corporal é um dos principais indicadores de toxidade materna (LYRA *et al.*, 2005), pois o ganho de peso insuficiente pode acarretar a restrição de crescimento intra-uterino (SCHWAREZ *et al.*, 1996). Neste estudo, não houve diferença significativa de peso entre as ratas dos grupos controle, tratadas com creme vaginal base e de copaíba, tanto no período de pré-implantação como na gestação total, o que sugere ausência de toxidade materna.

No período pré-implantação, o embrião se encontra com células indiferenciadas em divisão mitótica. A redução do número de células no embrião, durante essa fase, pode induzir retardo na formação do blastocisto (KOLA; FOLB, 1986) e, conseqüentemente, aumento nas perdas pré e pós-implantação (LEMÔNICA *et al.*, 1996). Segundo Almeida e Lemônica (2000), a taxa de perda pré-implantação é a correlação entre o número de ovos liberados e aqueles que, depois de fecundados, conseguiram ser implantados no útero. Já a perda pós-implantação refere-se à relação entre o número de blastocistos implantados e aqueles que não conseguiram se desenvolver. Ao blastocisto implantado, que não conseguiu se desenvolver, dá-se o nome de “reabsorção” e isso indica falha no desenvolvimento do embrião.

Os resultados desse trabalho indicam que o óleo-resina de copaíba, veiculado em creme vaginal a 2,5 %, não interfere nas fases pré e pós-implantação, na dose testada que a correspondeu 10 vezes a dose proposta para ser utilizada em humanos. Segundo Calliari-Martin (1998), a escolha de uma dose adequada da substância teste é fundamental, pois a administração de doses elevadas pode levar a intoxicação materna, alterando os padrões de homeostase materna, necessários para o bom desenvolvimento embrionário.

A redução significativa da massa dos fetos nos grupos tratados pode apontar um possível efeito fetotóxico (LYRA *et al.*, 2005). No presente estudo não foi observado, em relação à massa dos filhotes, diferença estatística significativa entre os três grupos. Portanto, o óleo-resina de copaíba, veiculado em creme vaginal, na concentração empregada, não determinou o aparecimento de fetotoxicidade, apesar do número de filhotes pequenos para idade gestacional (PIP) ser maior nesse grupo.

No período de organogênese, há uma intensa proliferação e migração de células, remodelamento dos tecidos e formação dos órgãos rudimentares (BRENT *et al.*, 1993). Este período é caracterizado como mais susceptível a agentes teratogênicos, havendo uma maior probabilidade de ocorrência de malformações fetais. O tipo de malformação irá depender do

estágio embrionário e da afinidade do agente por algum tecido embrionário (CHANG *et al.*, 2002). O presente estudo não evidenciou relação entre a frequência das anomalias e malformações externas e internas (análises esqueléticas e viscerais) com a utilização do creme vaginal do óleo-resina de copaíba. Portanto, o uso do óleo-resina de *C. Duckei* Dwyer veiculado em creme vaginal a 2,5 %, administrado em ratas prenhes, linhagem Wistar, durante o período pré-implantação e organogênese, demonstrou ser seguro nesta espécie.

Não obstante, esses resultados sobre os efeitos tóxicos do óleo-resina de copaíba, corroboram com o estudo de Lourenço *et al.* (2008a), apesar das diferenças, em relação à espécie animal (camundongo, Swiss) e a via de administração (gavagem). Esse estudo conduzido por Lourenço *et al.* (2008a) consistiu na avaliação dos efeitos do óleo de copaíba, em relação às alterações morfofisiológicas causadas pela ciclofosfamida (malformações externas, viscerais e esqueléticas) nos fetos. O resultado do estudo demonstrou que os camundongos do grupo controle negativo (triglicerol de cadeia média, solvente do óleo de copaíba) e grupos tratados com três doses de óleo de copaíba (0,3 mL/kg, 0,6 mL/kg e 0,9 mL/kg) não produziram nenhuma malformação, já os grupos associados (óleo de copaíba + ciclofosfamida) e controle positivo (ciclofosfamida 30 mg/kg) apresentaram alterações nos fetos, como: olhos abertos, exoftalmia, oligodactilia, polidactilia, fenda palatina, hidrocefalia e malformações esqueléticas, associadas à cabeça, vértebras, costelas, esterno, cinturas escapular e pélvica. Segundo os resultados de Lourenço *et al.* (2008a), o óleo de copaíba não apresentou potencial tóxico e, além disso, observou-se um efeito protetor contra hidrocefalia e malformação de vértebras.

Na mesma linha, Lourenço *et al.* (2008b) avaliaram os efeitos do óleo de copaíba em relação às alterações morfofisiológicas causadas pela ciclofosfamida, nos fetos de camundongos, durante o desenvolvimento intra-uterino, e se o óleo de copaíba causava algum tipo de toxicidade nesse período. Lourenço *et al.* (2008b) observaram que óleo de copaíba não apresentou fetotoxicidade nas doses administradas. Contudo, em relação ao efeito protetor do óleo de copaíba, não foi observado proteção na diminuição do peso fetal, causada pela ciclofosfamida, nas doses administradas.

A ciclofosfamida, utilizado como controle positivo nos estudos de Lourenço *et al.* (2008a; 2008b) é um medicamento citotóxico, potencialmente, mutagênico, carcinogênico e teratogênico, por isso seu uso é contraindicado durante o período gestacional (KIRSHON *et al.*, 1988). Por outro lado, um constituinte presente nos óleos-resinas de copaíba, o ácido caurenóico, em estudo conduzido por Costa-Lotufo *et al.* (2006) revelou ser, potencialmente, citotóxico. Os efeitos atribuídos ao ácido caurenóico foram: parada do desenvolvimento

embrionário de ouriços do mar, inibição do crescimento de células tumorais, bem como a hemólise de eritrócitos de ratos e humanos. Esses achados refletem na citotoxicidade desse constituinte, de natureza não-específica.

Legault *et al.* (2003) descreveram a atividade antitumoral do óleo essencial de abeto balsâmico (*Abies balsamea*) contra as linhagens de células de tumor sólido. A citotoxicidade, depois de testar os compostos puros do óleo, foi associada ao α -humuleno e γ -cariofileno. Gomes *et al.* (2008) estudaram o efeito antineoplásico do óleo de *C. multijuga* sobre o tumor ascítico e sólido de Ehrlich. A atividade antineoplásica foi atribuída aos sesquiterpenos β -cariofileno, bisaboleno, e γ -cariofileno, corroborando outros estudos (OHSAKI *et al.*, 1994; LIMA *et al.*, 2003). Contudo, Maistro *et al.* (2005) realizaram teste *in vivo* para avaliar o potencial mutagênico do óleo-resina de *C. duckei* Dwyer, não sendo detectados efeitos mutagênicos em células da medula óssea ou nos reticulócitos periféricos, avaliados por aberrações cromossômicas e teste do micronúcleo, respectivamente, mas mostrou atividade citotóxica em doses elevadas. Desta forma, fazem-se necessários mais estudos em relação ao potencial citotóxico e avaliar se existem efeitos mutagênicos, carcinogênicos e teratogênicos, associados aos óleos de copaíba.

A definição de efeito teratogênico proposta pela OMS engloba “qualquer defeito morfológico (estrutural), bioquímico (funcional) ou de conduta, produzido em qualquer etapa da gestação e descoberto ao nascer ou logo depois”. Alterações morfológicas são aquelas que, ao nascimento, interferem na viabilidade ou no bem-estar físico do recém-nascido. Acredita-se que 3 % dos neonatos possuam defeitos teratogênicos, constituindo o aspecto mais destacado na pesquisa de fármacos utilizados durante o período gestacional (GOODMAN *et al.*, 1990; ROBERT; SCIALLI, 1994).

Apesar do uso clínico de muitos medicamentos, ainda não há informações suficientemente confiáveis a respeito do potencial teratogênico de muitos deles, sendo até mesmo controversos. Rosa (1996) analisou 70 mulheres grávidas, expostas a uma dose única de itraconazol, durante o primeiro trimestre, e não encontrou nenhuma evidência de efeitos teratogênicos. Outro estudo, coorte retrospectivo, com mulheres grávidas expostas ao itraconazol, durante o primeiro trimestre de gravidez, a prevalência foi 13 % (14 de 108) (BAR-OZ *et al.*, 1999).

Os efeitos adversos potenciais do itraconazol sobre o embrião/feto foram investigados pelo laboratório fabricante, utilizando o teste padrão para avaliar os parâmetros reprodutivos. Ratas grávidas receberam itraconazol, via oral (gavagem), nas doses de 10 mg/kg, 40 mg/kg ou 160 mg/kg, do 6º ao 16º dia de prenhez (VAN-CAUTEREN *et al.*,

1987). Considerando os efeitos das doses, 10 mg/kg, não foi embriotóxico; porém, nas doses de 40 mg/kg e 160 mg/kg, apresentaram-se embriotóxicos. As malformações mais comuns observadas estiveram relacionadas aos ossos (VAN-CAUTEREN *et al.*, 1987). No mesmo estudo, coelhas prenhas, também, receberam itraconazol, via oral, por gavagem, nas doses de 5 mg/kg, 20 mg/kg e 80 mg/kg uma vez por dia, a partir do 6º até 18º dia de gravidez, não sendo observados efeitos embriotóxicos ou teratogênicos (VAN-CAUTEREN *et al.*, 1987). Em camundongos, a exposição ao itraconazol, na dose de 80 mg/kg, durante a organogênese (dias 8-14 de prenhez), induziu o aparecimento de malformações (encefalocele e/ou macroglossia) (TIBONI *et al.*, 2006).

A diferença genética, entre as espécies, faz com que se torne necessário a utilização de mais de uma espécie nos ensaios de toxicologia reprodutiva (SCHÜLER-FACCINI *et al.*, 2001; BRASIL, 2009d). O estudo realizado por VAN-CAUTEREN *et al.* (1987) é levado a efeito, pois a utilização de três diferentes espécies de animais (ratos, coelhos e camundongos) nos ensaios, possibilitou observar as diferentes respostas toxicológicas a cada espécie. Outro fator importante é o período gestacional exposto a esse agente, pois, a susceptibilidade de cada órgão a uma determinada anomalia ou malformação dependerá da etapa em que se encontra o desenvolvimento, de forma que o conceito seja sensível a diferentes períodos (CALLIARI-MARTIN, 1998; ROGERS; KAVLOCK, 2001).

No contexto dos medicamentos antimicrobianos tópicos, é necessário considerar o potencial risco e o benefício, tanto para mãe como para o conceito, se a infecção for ou não tratada. Neste caso, é importante considerar o tratamento dessas infecções no trato genital, durante a gestação. Assim, vale ressaltar alguns estudos, epidemiológicos e de toxicologia reprodutiva, acerca dos cremes vaginais disponíveis no mercado farmacêutico.

A utilização do clotrimazol durante o segundo e terceiro trimestres da gravidez é seguro (KING *et al.*, 1998). Czeizel *et al.* (1999) estudaram a possibilidade de teratogenicidade na terapia tópica vaginal com clotrimazol, usando um estudo caso-controle de fiscalização com 18,515 grávidas expostas, durante três intervalos de tempo específico; nos primeiro, segundo e terceiro meses, e do quarto até o nono mês. Usando 32,804 controles, eles determinaram que o uso do clotrimazol não foi associado com um aumento de anomalias congênitas.

O Miconazol é um dos medicamentos mais usados para tratar infecções fúngicas. O uso vaginal proporciona absorção sistêmica mínima (1,4 %) (KING *et al.*, 1998). A vigilância Médica de Michigan relatou em 2.236 grávidas expostas e 144 com defeitos de

nascimento. Contudo, o número de malformações fetais não foram significativas na população estudada (ROSA *et al.*, 1987).

A nistatina, após aplicação tópica na mucosa, não é, sistemicamente, bem absorvida. Os estudos em animais não mostram um aumento de malformações congênitas (ROSA *et al.*, 1987). O Tioconazol também apresenta absorção sistêmica mínima (5 %-16 %). Os ensaios clínicos sugerem relativa segurança de uso, durante o segundo e terceiro trimestre da gravidez (KING *et al.*, 1998).

A utilização da clindamicina, durante a gestação, tem demonstrado ser segura (KURKINEN-RIITY *et al.*, 2000). Contudo, o uso do metronidazol na gravidez, ainda é algo controverso, pois vários estudos de revisão e meta-análise têm relatado o potencial teratogênico do metronidazol em humanos (BURTIN *et al.*, 1995; CARO-PATON *et al.*, 1997; CZEIZEL; ROCKENBAUER, 1998), em qualquer via de administração. O uso vaginal do metronidazol, durante os segundo e terceiro meses de gestação, foi prevalente em mães de crianças afetadas com hidrocefalia congênita (KAZY *et al.*, 2005a).

Kazy *et al.* (2005b) recentemente observaram elevado risco teratogênico no tratamento vaginal, associação entre miconazol e metronidazol, durante os segundo e terceiro meses de gravidez. Os efeitos teratogênicos foram seis vezes maiores, polidactilia e sindactilia. Dos 61 casos identificados, no estudo, de anomalias nos dígitos, 31 casos foram polidactilia, 20 foram sindactilia e 10 apresentaram ambas as anomalias na mesma criança.

Contudo, os estudos envolvendo animais apoiam o conceito de que a uma única exposição ao miconazol ou metronidazol seja livre de potencial teratogênico. Em ratos, nenhum efeito teratogênico resultou do tratamento com doses diárias de metronidazol até 200 mg/kg, administradas por gavagem ou administradas na dieta com 0,13 % (ROE, 1983). Em consonância, não foram encontrados efeitos teratogênicos em coelhos tratados com metronidazol (200 mg/kg/dia) do 3º ao 13º dia de gestação (ROE, 1983), e em ratos, administrados por gavagem, do 6º ao 15º de prenhez (20 mg/kg/dia) (CELLA *et al.*, 1969). O miconazol também não induziu efeitos teratogênicos em animais experimentais nas doses orais de 80 mg/kg (ITO *et al.*, 1976a; 1976b), contudo, foi embriotóxico (TIBONI *et al.*, 2008). Não há indicação de embriotoxicidade ou teratogenicidade, resultante de estudos de reprodução em ratos e coelhos, que receberam doses intravenosas de miconazol de 40 e 20 mg/kg, respectivamente (TIBONI *et al.*, 2008).

Embora os dados demonstrados no estudo de Kazy *et al.* (2005b) não sejam equivalentes, várias questões devem ser consideradas. Como ponto principal, a divergência

sobre as manifestações teratogênicas em humanos (com anormalidades nos membros) e em camundongos (defeitos nas extremidades do esqueleto) (TIBONI *et al.*, 2008). Essas diferenças fenotípicas podem refletir, como primeira hipótese, uma diferença de sensibilidade entre espécies ao teratígeno. Este é um fenômeno bem conhecido em teratologia.

Por isso, o fato de o creme vaginal do óleo-resina de copaíba não interferir na performance reprodutiva e não causar efeitos teratogênicos em ratas Wistar, não se descarta a necessidade de maiores estudos, utilizando outras doses e outras espécies de animais, para aumentar a segurança desse produto em relação à embriotoxicidade e teratogênese.

7. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- O tratamento com o creme vaginal do óleo-resina de copaíba não interferiu no peso materno em qualquer período da prenhez. Por conseguinte, a dose utilizada, não foi capaz de causar toxicidade materna;
- O óleo-resina de copaíba, veiculado em creme vaginal, não influenciou na perda do blastocisto antes ou após a implantação. Portanto, o creme vaginal, na dose usada, não foi embriofetotóxico;
- O uso do creme vaginal do óleo-resina de copaíba, durante a prenhez, não impossibilitou que as mesmas fossem levadas a termo;
- O creme vaginal do óleo-resina de copaíba não interferiu no peso médio dos RNs, das placentas e do índice placentário. Logo, não interferiu na performance reprodutiva;
- A utilização do creme vaginal do óleo-resina de copaíba durante a prenhez, na dose testada, não influenciou no aparecimento de anomalias e/ou malformações externas;
- O aparecimento de anomalias e/ou malformações internas (esquelética e visceral) não esteve relacionado ao uso do creme vaginal do óleo-resina de copaíba, durante o período de prenhez.
- O uso do creme vaginal, com óleo de copaíba a 2,5 %, demonstrou ser seguro, durante a gestação de ratas (*Rattus norvegicus*), linhagem Wistar.

8. REFERÊNCIAS

- ADAD, S.J. *et al.* Frequency of *Trichomonas vaginalis*, *Candida sp* and *Gardnerella vaginalis* in cervical-vaginal smears in four different decades. **São Paulo Med. J.**, v. 119, n. 6, p.200-205, 2001.
- ADAMS R.P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/ion trap mass spectrometry**. Carol Stream: Allured Pub., 1995. 469p.
- ALBAGLI, S. Amazônia: fronteira geopolítica da biodiversidade. Biodiversidade, pesquisa e desenvolvimento na Amazônia. **Parcerias Estratégicas**, n. 12, set. 2001.
- ALENCAR, J. C. Estudos silviculturais de uma população natural de *Copaifera multijuga* Hayne – Leguminosae, na Amazônia Central. **Acta Amaz.**, v. 1, p. 75-89, 1982.
- ALENCAR, J. C. Estudos silviculturais de uma população natural de *Copaifera multijuga* Hayne (Leguminosae) na Amazônia Central IV. Interpretacão de dados fenológicos em relação a elementos climáticos. **Acta Amaz.**, v. 18, p. 109–209, 1988.
- ALIVERTI, V. *et al.* The extent of fetal occification as an index of delayed developmment in teratogenic studies on the rat. **Teratol.**, v. 20, p. 237-242, 1979.
- ALMA, M. H. *et al.* Screening chemical composition and in vitro antioxidant and antimicrobial activities of the essential oils from *Origanum syriacum* L. growing in Turkey. **Biol. PharmBull**, v. 26, p. 1725–1729, 2003.
- ALMEIDA, F. C. G.; LEMONICA, I. P. The toxic effects of *Coleus barbatus* B. on the different periods of pregnancy in rats. **J. Etnnoph.**, v. 73, p. 53-60, 2000.
- ALVES, F. N. R. Desafio para a Inovação em fitomedicamentos no contexto da Indústria Farmacêutica Nacional. **Rev. Fitos.**, v. 1, n. 1, p. 18-29, 2005.
- ANDRADE-JÚNIOR, M. A.; FERRAZ, I. D. K.; VEIGA-JÚNIOR, V. F. Eventos Fenológicos de Copaíba (*Copaifera officinalis* L. - Caesalpiniaceae) em Mata de Galeria do Rio Branco, Boa Vista/Roraima, Brasil: Uma primeira aproximação. **Acta Amaz.**, v. 30, p. 523-533, 2000.
- ARAGÃO, T. P *et al.* Toxicological reproductive study of *Cassia occidentalis* L. in female Wistar rats. **J. Etnnoph.**, v. 123, p. 163–166, 2009.
- ARRUDA, F. F. A.. **O Brasil Colonial**, São Paulo: Ática, 1980.

BAR-OZ, B. *et al.* Reporting bias in retrospective ascertainment of drug induced embryopathy. **Lancet.**, v. 354, p. 1700–1701, 1999.

BASILE, A. C. *et al.* Anti-inflammatory activity of oleoresin from Brazilian *Copaifera*. **J. Etnnoph.**, v. 22, p. 101, 1988.

BASSANI, V. L.; GONZALES, O. G.; PETROVICK, P. R. Desenvolvimento tecnológico de Produtos Fitoterápicos. **Rev. Fitos.**, v. 1, n. 1, p. 14-17, 2005.

BENDAZZOLI, W. S. Fitomedicamentos: perspectivas de resgate de uma terapia histórica. **O Mundo da Saúde**, v. 24, n. 2, p. 123-126, 2000.

BERQUÓ, E. S *et al.* **Bioestatística**, São Paulo: EPU, 1981.

BIAVATTI, M. W *et al.* Análise de óleos-resinas de copaíba: contribuição para o seu controle de qualidade, **Rev. Bras. Farmacog.**, v. 16, n. 2, p. 230-235, 2006.

BORGES, L. V *et al.* A Toxicidade do *Hypericum perforatum* administrado a Ratas Prenhes. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v.51, v. 4, p. 206-208, 2005.

BRASIL. Decreto nº 5.813 de 22 de Junho de 2006. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos.** Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/dab/docs/legislacao/decreto5813_22_06_06> Acesso em: 23 de ago. de 2008.

BRASIL. **Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária.** Legislação. Sistema de Legislação em Vigilância Sanitária (VISALEIS). Resolução RDC n. 48 de 16 de março de 2004. Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br/leisref/public/search.php>>. Acesso em: 20 jun. 2009a.

BRASIL. **Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária.** Legislação. Sistema de Legislação em Vigilância Sanitária (VISALEIS). Resolução RE n. 90 de 16 de março de 2004. Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br/leisref/public/search.php>>. Acesso em: 20 jun. 2009b.

BRASIL. **Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária.** Consultas Públicas. Áreas de Atuação. Medicamentos. Legislação. Resoluções. Resolução – RDC n. 17 de 24 de fevereiro de 2000. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/legis/resol.htm>>. Acesso em: 20 jun. 2009c.

BRASIL. **Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária.** Legislação. Sistema de Legislação em Vigilância Sanitária (VISALEIS). Portaria n. 116 de 8 de agosto de

1996. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/116_96.htm>. Acesso em: 20 jun. 2009d.

BRENT, R. L. What is the relationship between birth defects and pregnancy bleeding? New perspectives provided by the NICHD workshop dealing with the association of chorionic villous sampling and the occurrence of limb reduction defects. **Teratol.**, v. 48, p. 93–95, 1993.

BRITO, N. M. B. *et al.* Aspectos microscópicos da cicatrização de feridas abertas tratadas com óleo de copaíba em ratos. **Rev. Paraense Med.**, v. 13, p. 12-17, 1999.

BRUNETON, J. **Eléments de Phytochimie et de Pharmacognosie**. In Technique et Documentation. Paris: Lavoisier, 1993, p. 915.

BURTIN, P. *et al.* Safety of metronidazole in pregnancy: a meta-analysis. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 172, p. 525–529, 1995.

CALDERON, I. M. P. **Modelo experimental em ratas para estudo do binômio diabete e gravidez**. 1988. 125p. Dissertação (Bases Gerais de Cirurgia Experimental) – Medicina, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho/Botucatu, 1988.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America A personal view. **J. Ethnoph.**, v. 100, p. 131-134, 2005.

CALLIARI-MARTIN, R. T. *et al.* Embriotoxicidade da *Artemisia vulgaris* LINNÉ em ratas. **Rev. Médica HSVP**, v. 11, n. 28, p. 12-17, 2001.

CALLIARI-MARTIN, R. T. Effects of prenatal exposure to restraint stress and monochrotophos on behavioral and physical development in the rat. **Gen. Molecular Biol.**, v. 21, n. 3, p. 171, 1998.

CARO-PATON, T. *et al.* Is metronidazole teratogenic? A meta-analysis. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, v. 44, p. 179–182, 1997.

CARVALHO J.C.T. Considerações gerais sobre fitoterápicos. *In*: CARVALHO, J.C.T. Fitoterápicos anti-inflamatórios: **Aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**. São Paulo: Tecmedd; 2004, p.43-47.

CARVALHO, J. C. T. *et al.* Topical antiinflammatory and analgesic activities of *Copaifera duckei* dwyer. **Phytoth. Research**, v. 19, p. 946-950, 2005.

CARVALHO, J. C. T; CASCON, V. **Fitoterápicos: Nova Opção Terapêutica de Anti-inflamatórios (Aspectos Químicos, Farmacológicos e Aplicações Terapêuticas)**, São Paulo: Robe , 2003, p. 630.

CARVALHO, J. C. T. **Validação Química-Farmacológica da Espécie Vegetal *Pterodon emarginatus***. São. Paulo: USP, 1998, 184p. Tese (Doutorado em FÁRMACOS e MEDICAMENTOS)-USP- Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

CARVALHO, M. H. B *et al.* Associação da vaginose bacteriana com o parto prematuro espontâneo. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.** v. 23, p. 529-33, 2001.

CASCON, V. *et al.* Avaliação da composição química e da atividade tripanosomicida *in vitro* de óleo-resinas de *Copaifera* spp. SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 15, 1998, Águas de Lindóia. **Anais do XV SPMB**, São Paulo: 1998, p 199.

CASCON, V.; GILBERT, B. Characterization of the chemical composition of oleoresins of *Copaifera guianensis* Desf., *Copaifera duckei* Dwyer and *Copaifera multijuga* Hayne. **Phytochem.**, v. 55, n. 7, p. 773-778, 2000.

CELLA, P. L. Experimental studies on teratology of metronidazole. **Rev. Patol. Clin.**, v. 24, p. 529–537, 1969.

CHANG, C. V. *et al.* Fetal toxicity of *Solanum lycocarpum* (Solanaceae) in rats. **J. Etnnoph.**, v. 81, p. 265-269, 2002.

COLEMAN, T. *et al.* Antifungal therapy turing tregnancy. **Clin. Infec. Dis.**, v. 27, p. 1151-1160, 1998.

COSTA-LOTUFO, L. V. *et al.* The cytotoxic and embryotoxic effects of kaurenoic acid, a diterpene isolated from *Copaifera langsdorffii* oleo-resin. **Toxicon.**, v. 40, p. 1231–1234, 2002.

COSTA-SILVA, J. H *et al.* Estudo Toxicológico Reprodutivo da *Carapa guianensis* Aublet (Andiroba) em Ratas Wistar. **Acta Farm. Bon.**, v. 25, n. 3, p. 425-8, 2006.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clin. Microbiol. Ver.**, p. 564–582, v. 12, n. 4, 1999.

CRAVEIRO, A. A.; ALENCAR, J. W.; MACHADO, M. J. W. **Óleos Essenciais de Plantas do Nordeste**: UFC, Fortaleza, 1981, p. 79.

CZEIZEL, A. E.; ROCKENBAUER, M. A population-based case-control study of oral metronidazole treatment during pregnancy. **Br. J. Obstet. Gynec.**, v. 105, p. 322–327, 1998.

CZEIZEL, A., TOTH, M.; ROCKENBAUER, M. No teratogenic Effect After Clotrimazole Therapy. During Pregnancy. **Epidemiol.**, v. 10, p. 437-440, 1999.

DELAMARE, A. P. L *et al.* S. Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in South Brazil. **Food Chem.**, v. 100, p. 603–608, 2007.

DIAS, B. S. **A implementação da Convenção sobre Diversidade Biológica no Brasil. Desafios e oportunidades.** São Paulo: Fundação André Tosello, 2002. 10p.

DUFF, P. Antibiotic selection for infections in obstetric patients. **Semin. Perinatol.**, v. 17, n. 6, p. 367-78, 1993.

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

FAVEIRO, A. M. **Efeitos da exposição materna ou paterna ao disseleneto de difenila sobre o desenvolvimento intra-uterino da prole de ratas wistar.** Dissertação. 2006. 2006, Universidade Federal de Santa Maria, 2006.

FERNANDES, R.M.; PEREIRA, N, A.; PAULO, L. G. Anti-inflammatory activity of copaiba balsam (*Copaifera cearensis* Huber). **Rev. Bras. Farm.**, v. 73, n. 3, p. 53-56, 1992.

FERRARI, M. *et al.* Terpenoids from *Copaifera langsdorffii*. **Phytochem.**, v. 10, p. 905-907, 1971.

FERREIRA, J. L. P. ; ALMEIDA, M. B. S. ; GILBERT, B. Plant medicines of Amazônia-their study, legal protection and production for use in public Health. *In*: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON CHEMISTRY OF THE AMAZON, n. 1, 1993, Manaus. **Abstract- 1st. International Symposion on Chemistry of the Amazon**, 1993. p. 34.

FERREIRA, V. F. Biodiversidade, lei de recursos genéticos e política científica. **Quím. Nov.**, v. 23, n. 5, p. 579-579, 2000.

FRITZ, H.; GIESE K. Evaluation of the Teratogenic Potential of Chemicals in the Rat. **Pharmacol.**, v. 40, n. 1, p. 1-28, 1990.

GARCIA, E. S. Biodiversidade, Biotecnologia e Saúde. **Cad. Saúde Públ.**, Rio de Janeiro, v. 11, n. 3, p. 495-500, 1995.

GILBERT B. *et al.* A atividade anti-helmíntica de óleos essenciais e de seus componentes químicos. **An. Acad. Bras. Ciên.**, v. 44, p. 423-428, 1972.

GOIRIS, K. *et al.* The oxygenated sesquiterpenoid fraction of hops in relation to the spicy hop character of beer. **J. Inst. Brew.**, v. 108, p. 86–93, 2002.

GONÇALVES, A. L.; FILHO, A. A.; MENEZES, H. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. **Arq. Inst. Biol. São Paulo**, v. 72, n. 3, p. 353-358, 2005.

GOODMAN, L. A. Simultaneous confidence intervals for contrasts among multinomial populations. **Ann. Math. Statist.**, v. 35, p. 716-725, 1964.

GOODMAN, L. S; RALL, T. W.; NIES, A. S. TAYLOR, P. **The pharmacological basis of therapeutics**. 8th ed. New York: Mac Millan, 1990, p. 1572-1591

GRAMOSA N. V.; SILVEIRA, E. R. Volatile constituents of *Copaifera langsdorffii* from the Brazilian Northeast. **J. Essent. Oil. Res.**, v. 17, p. 130–132, 2005.

HANCOCK, R. L. *et al.* Providing information regarding exposures in pregnancy: A survey of North American Teratology Information Services . **Reprod. Toxicol.**, v. 25, p. 381–387, 2008.

HARTMAN, L.; LAGO R.C. A., Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Lab. Pract.**, v. 22, p. 475-476, 1973.

HILLIER, S. L. *et al.* Association between bacterial vaginosis and preterm delivery of a low-birth-weight infant. The Vaginal Infections and Prematurity Study Group. **N. Engl. J. Med.**, v. 333, p. 1737-1742, 1995.

HONG, E. J. *et al.*. Antibacterial and antifungal effects of essential oils from coniferous trees. **Boil. PharmBull.**, v. 27, p. 863–866, 2004.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos**. 4^aed, 2005.

ITO C. *et al.* Toxicological studies of miconazole. 2. Teratological studies of miconazole in rats. **Iyakuin Kenkyu**, v. 7, p. 367–376, 1976a.

ITO C. *et al.* Toxicological studies of miconazole. 3. Teratological studies of miconazole in rabbits. **Iyakuin Kenkyu**, v. 7, p. 377–378, 1976b.

INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY – IUPAC. **Standard Methods for Analysis of Oils, Fats and Derivatives**. Method 2.301; Report of IUPAC Working Group WG 2/87. 7 ed. [S.L.]: Blackwell Scientific Publications, 1987.

KAZY, Z.; PUHÓ, E.; CZEIZEL, A. E. Teratogenic potential of vaginal metronidazole treatment during pregnancy. **Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.**, v. 123, n. 1, p. 174–178, 2005a.

KAZY, Z.; PUHÓ, E.; CZEIZEL, A. E. The possible association between the combination of vaginal metronidazole and miconazole treatment and polysyndactyly. Population-based case-control teratologic study. **Reprod Toxicol.** v. 20, p. 89–94, 2005b.

KIRSHON, B. *et al.* Teratogenic effects of first trimester cyclophosphamide therapy. **Obstet Gynecol.** v. 72, p. 462, 1988.

KOLA, I.; FOLB, P. Chlorpromazine inhibits the mitotic index, cell number, and the formation of blastocyst, and delays implantation of CBA mouse embryos. **J. Reprod. Fert.**, v. 76, p. 527-536, 1986.

KOROLKOVAS, A. **Dicionário Terapêutico Guanabara**, 14^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

KURKINEN-RIITY, M. *et al.* A randomised controlled trial of vaginal clindamycin for early pregnancy bacterial vaginosis. **Brit. Jour. Obst. Gyna.**, v. 107, p. 1427-1432, 2000.

LAMEIRA, O. A.; MARTINS-DA-SILVA, R. V. C.; ZOGHBI, M.G.B; OLIVEIRA, E. C. P. Seasonal Variation in the Volatiles of *Copaifera duckei* Dwyer Growing Wild in the State of Pará –Brazil. **J. Essen. Oil Res.**, v. 21, p. 105-107, 2009.

LANGENHEIM, J. H. Higher plant terpenoids: A phytocentric overview of their ecological roles **J. Chem. Ecol.**, v. 20, n. 6, p. 16, 1994.

LAPA, A. J. *et al.* Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. *In*: SIMÕES, C. M. O, SHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R (org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2003, p. 247-262.

LAWRENCE, B. M. Progress in essential oil. **Nat. Flav. Frag. Mat.**, v. 5, p. 32, 1980.

LE COINTE, P. **Árvores e Plantas Úteis: a Amazônia brasileira (III)**, Belém: Livraria Clássica, 1934, p. 131-132.

LEGAULT, J. *et al.* Antitumor activity of balsam fir oil: production of reactive oxygen species induced by α -humulene as possible mechanism of action. **Plant. Med.**, v. 69, p. 402–407, 2003.

LEITE, A. *et al.* **Recomendações para o manejo sustentável do óleo de copaíba**, UFAC/SEFE: Rio Branco, 2001.

LEITE, C. S. M. *et al.* Medicações de uso tópico e gestação. **An. Bras. Dermatol.**, v. 72, n. 2., p. 199-204, 1997.

LEMONICA, L. P; DAMASCENO, D. C; DI-STASI, I. C. Study the embryotoxic effects of na extract of Rosemary (*Rormarinus officinalis* L.). **Braz. J Med. Biol. Res.** v. 29, p. 223-227, 1996.

LIMA, S. R. M. *et al.* *In vivo* and *in vitro* studies on the anticancer activity of *Copaifera multijuga* Hayne and its fractions. **Phytother. Res.**, v. 17, p. 1048–1053, 2003.

LOURENÇO, A. C. S.; MIGUEL, L. K.; FARIA, M. J. S. S. Efeitos do óleo de copaíba na teratogenicidade causada pela exposição à ciclofosfamida em camundongos. *In*: I CONGRESSO DE TOXICOLOGIA CLÍNICO-LABORATORIAL, 2008, Porto Alegre/RS, 2008a.

LOURENÇO, A. C. S.; MIGUEL, L. K.; FARIA, M. J. S. S. Toxicidade da ciclofosfamida no desenvolvimento intra-uterino de camundongos e efeito protetor do óleo de copaíba. *In*: I CONGRESSO DE TOXICOLOGIA CLÍNICO-LABORATORIAL, 2008, Porto Alegre/RS, 2008b.

LOURENS, A. C. *et al.* *In vitro* biological activity and essential oil composition of four indigenous South African *Helichrysum* species. **J. Ethnopharmacol.**, v. 95, p. 253–258, 2004.

LYRA, M. M. A. *et al.* Estudo toxicológico reprodutivo da *Azadirachta indica* A JUSS. (Neem). **Rev. Fitos.** v. 1, n. 2, p. 53-57, 2005.

MACEDO, C. A.; LANGENHEIM, J. H. Intrand inter-plant sesquiterpene variability in *Copaifera langsdorfii*: elation to microlepidopteran herbivory. **Biochem. System. Ecol.**, v. 17, p. 551–557, 1989.

MACHADO, J. A. **Tendências Futuras da Biotecnologia: Perspectivas para o setor industrial.** setembro. São Paulo/SP, 2001.

MAIMOM, D. **Estudo de mercado de matéria-prima: Corantes naturais (cosméticos, indústria de alimentos), conservantes e aromatizantes, bioinsetisidas e óleos vegetais essenciais (cosméticos e oleoquímica)**. Belém/PA: SUDAM/PNUD, 2000. (Relatório Final).

MAISTRO, E. L. *et al.* *In vivo* evaluation of the mutagenic potential and phytochemical characterization of oleoresin from *Copaifera duckei* Dwyer. **Gen. Mol. Biol.**, v. 28, n. 4, p. 833-838, 2005.

MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F. J.; TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Braz. J. Bio.**, v. 62, n. 4, p. 609-614, 2002.

MARRAZZO, J. M. Bacterial vaginosis. **Current Treatment Options in Infectious Diseases**, v. 5, p. 63 -68, 2003.

MCCHESENEY, J. D.; VENKATARAMAN, S. K.; HENRI, J. T. Plant natural products: Back to the future or into extinction? **Phytochem.**, v. 68, p. 2015–2022, 2007.

MEDEIROS, R. S.; VIEIRA, G. Sustainability of extraction and production of copaiba (*Copaifera multijuga* Hayne) oleoresin in Manaus, AM, Brazil. **For. Ecol. Manag.**, v. 256, p. 282-283, 2008.

MENGUE, S. S.; MENTS, L. A.; SCHENKEL, E. P. Uso de plantas medicinais durante a gravidez. *In*: SANSEVERINO, M. T. V.; SPRITZEL, D. T.; SCHÜLER-FACCINI, L. **Manual de Teratogênese**. Porto Alegre: Ed. Universidade/UFRGS, 2001, p. 423-450.

MIRANDA, R. C. M. *et al.* Atividade Antimicrobiana do Óleo de Copaíba (*Copaifera spp.*) de Diferentes Procedências. *In*: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 16, 2000, Recife, Brasil. **Anais do 16º Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil**. Recife, 2000, p. 223.

MORAES-FILHO, C. A. V.; GOLDENBERG, S. Vaginose bacteriana e resultados perinatais. **Femin.**, v. 29, p. 509-512, 2001.

MORS, W.; RIZZINI, C. T.; **Useful Plants of Brazil**; Holden-Day Inc.: San Francisco, 1966, p. 45.

MUROI, H.; KUBO, I. Combination effects of antibacterial compounds in green tea flavor against *Streptococcus mutans*. **J. Agric. Food. Chem.** v. 41, p. 1102–1105, 1993.

MURTA, E. F. C.; SOUZA, M. A. H.; ARAUJO-JUNIOR, E. *et al.* Incidence of *Gardnerella vaginalis*, *Candida sp* and human papilloma virus in cytological smears. **Sao Paulo Med. J.**, v.118, n. 4, p.105 -108, 2000.

NEWMAN, D. J.; GRAG, G. Natural Products as Sources of a New Drugs over the last 25 years. **J. Nat. Prod.**, v. 70, p. 461-477, 2007.

ODALIA-RÍMOLI, A.; *et al.* Biodiversidade, biotecnologia e conservação genética em desenvolvimento local, **Rev. Inter. Desen. Local**, v. 1, n.1, p. 21- 30, 2000.

OHSAKI, A. *et al.* The isolation and in vivo potent antitumor activity of a clerodane diterpenoid from the oleoresin of the Brazilian medicinal plant, *Copaifera langsdorffii* Desf. **Bio. Med. Chem. Letters**, v. 4, n. 24, p. 2889-2892, 1994.

OLIVEIRA, E. C. P.; LAMEIRA, O. A.; ZOGHBI, M. G. B. Identificação da época de coleta do óleo-resina de copaíba (*Copaifera* spp.) no município de Moju, PA. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 8, n. 3, p. 14-23, 2006.

OPDYKE, D. L. Inhibition of sensitization reactions induced by certain aldehydes. **Food Cosmet. Toxicol.**, v. 14, p. 197-198, 1976.

ORLANDO, S. C. Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico bruto da casca do *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville (Barbatimão). 2005. 89 p. Dissertação – (Mestrado em promoção da Saúde) – Universidade de Franca, 2005.

PAIVA, L. A. *et al.* Anti-inflammatory effect of kaurenoic acid, a diterpene from *Copaifera langsdorffii* on acetic acid-induced colits in rats. **Vascul. Pharmacology**, v. 39, p. 303-307, 2003.

PAIVA, L. A. *et al.* Gastroprotective effect of *Copaifera langsdorffii* oleoresin on experimental gastric ulcer models in rats. **J. Ethnopharmacol.**, v. 62, p. 73-78, 1998.

PALAZZO DE MELO, J. C.; PETROVICK, P. R. Quality Control f *Baccharis trimera* (Less) DC. (Asteraceae) Hydroalcoholic extracts. **Acta Farm. Bon.**, v. 19, p. 211-215, 2000.

PELLEGRINO, J. Protection against human *Schistosoma cercariae*. **J. Exper. Parasitol.**, v. 21, p. 12, 1967.

PERES, M. T. L. P. *et al.* Analgesic compounds of *Croton urucurana* Baillon. Pharmaco-chemical criteria used in their isolation. **Phytother. Res.** v. 12, p. 209-214, 1998.

PERROT, E. **Matières premières usuelles du Règne vegetal**. Tomo II, Masson et Cie. Éditeurs: Paris, 1994, p. 2344.

PETROVICK, P. R.; ORTEGA, G. G.; BASSANI, L. From a Medicinal Plant to a Pharmaceutical Dosage Form. A (Still) Long Way for the Brazilian Medicinal Plants. **Ciênc. Cultura**, v. 49, n. 5/6, p. 364-369, 1997.

PETRY, R. D.; DE SOUZA, K. C. B.; BASSANI, V. L.; PETROVICK, P. R.; GONZÁLES ORTEGA, G. Doseamento do teor de flavonóides totais em extratos hidroalcoólicos de *passiflora alata* Dryander (maracujá). **Rev. Bras. Farm.**, v. 79, n. ½, p. 7-10, 1998.

PICHETTE, A. *et al.* Composition and Antibacterial Activity of *Abies balsamea* Essential Oil. **Phyther. Res.**, v. 20, p. 371-373, 2006.

PINTO, A. A. C.; MADURO, C. B. Produtos e subprodutos da medicina popular comercializados na cidade de Boa Vista, Roraima. **Acta Amaz.**, v. 33, p. 281-290, 2003.

PINTO, A. C. *et al.* Separation of acid diterpenes of *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke by flash chromatography using potassium hydroxide impregnated silica gel. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 11, p. 355-360, 2000.

PINTO, V. M. Avaliação toxicológica da preparação fitoterápica contendo *Piper methysticum* Forst, Piperaceae (Kava Kava®) sobre o desenvolvimento pré-natal em ratos Wista, 2004.. 71p. Dissertação – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

PIO-CORRÊA, M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas.** Ministério da Agricultura, IBAMA, v. 2, Brasília, 1998.

PIO-CORRÊA, M. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil;** Ministério da Agricultura; Rio de Janeiro, 1931, p. 370.

PLOURD, D. M. Practical guide to diagnosing and treating vaginitis. **Med. Wom. Heal. J.**, v. 2, n. 1, p. 293, 1997.

PRISTA, L. N.; ALVES, A. C.; MORGADO, R. **Técnica farmacêutica e farmácia galênica,** 5 ed. Lisboa: Fundação Calouste, 1995.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon.**, v. 39, p. 316-603, 2001.

RIGAMONTE-AZEVEDO, O. C. *et al.* Variabilidade química e física do óleo-resina de *Copaifera* spp. no sudoeste da amazônia brasileira, **Rev. bras. ol. fibros.**, v. 8, n. 2/3, p. 851-861, 2004.

ROBERT, E.; SCIALLI, A. R. Topical medications during pregnancy. **Rep. Toxicol.**, v. 8, n. 3, p. 197-202, 1994.

RODRIGUES, M. T. Biodiversidade: do planejamento à ação. **Ciê. Cultura.**, v. 55, n. 3, p. 47- 48, jul/sep, 2003.

RODRIGUES, R. M. **A flora da Amazônia**, Ed. Cejup: Belém, 1989, p. 463.

ROE, F. J. Toxicologic evaluation of metronidazole with particular reference to carcinogenic, mutagenic, and teratogenic potential. **Surg.**, v. 93, p. 158–164, 1983.

ROGERS, J. M.; KAVLOCK, R. J. Developmental toxicology. *In*: KLAASEN, C. D. (Ed.) **Cassarett and Doull's toxicology: The basic science of poisons**. 6th ed. New York: Mc Graw-Hill, 2001. p. 107-132.

ROSA, F., **Azole fungicide pregnancy risks**. *In*: PROCEEDINGS ON THE NINTH INTERNATIONAL CONFERENCE OF THE ORGANIZATION OF TERATOLOGY INFORMATION SERVICES, 1996. Salt Lake City, Utah, May, p. 2–4, 1996.

ROSA, L.; BAUM, C.; SHAW, M. Pregnancy Outcome After First-Trimester Vaginitis Drug Therapy. **Obstet. Gyne.** v. 69, n. 5, p. 751-55, 1987.

SABULAL, B. *et al.* Caryophyllene-rich rhizome oil of *Zingiber nimmonii* from South India: chemical characterization and antimicrobial activity. **Phytochem.**, v. 67, p. 2469–2473, 2006.

SALVADOR, V. **História do Brasil: 1500-1627**, 6^a ed., Melhoramentos: São Paulo, 1975, p. 65.

SANDES, A. R. R.; DI BLASI, G. Biodiversidade e diversidade química e genética, **Biotechnol.**, n. 13, p. 28- 32, 2000.

SANT'ANA, P. J. P.; ASSAD, A. L. O Contexto brasileiro para a bioprospecção: a competência científicotecnológica brasileira, **Biotechnol.**, n. 29, p. 32-37, 2001.

SANT'ANA, P. J. **Bioprospecção no Brasil – Contribuições para uma gestão Ética**, 1^a Ed. Brasília, Paralelo 15 editores, 2002.

SANTOS, A. O. *et al.* Antimicrobial activity of Brazilian copaíba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus. **Mem. Inst. Oswaldo cruz**, v. 103, n. 3, p. 277-281, 2008.

SANTOS, F. *et al.* **Biodiversidade Brasileira e Produtos Industriais**. Universidade Federal de Minas Gerais – Departamento de Biologia Geral. Março/2003. Informação disponível em: <<http://www.icb.ufmg.br/~lbem/aulas/grad/tge/biodiv/2002/peoindust/>>. Acesso em abril 2009.

SANTOS, F. C. *et al.* **Demandas Tecnológicas para o Sistema Produtivo do Óleo de Copaíba (*Copaifera spp*) no Estado do Acre**. EMBRAPA, Acre, Brasil. (Documentos, 69), 2001.

SAROGLOU, V. *et al.* Composition and antimicrobial activity of the essential oil of six *Hypericum* species from Serbia. **Biochem. Syst Ecol.**, v. 35, p. 146–52, 2007.

SCHWAREZ, R. L. *et al.* Relato Del crecimiento intrauterino. In: _____. **Obstetrícia**. Buenos Aires: El Ateneo, 1996, p. 232-244.

SHAFIN, P. M. Antibacterial activity of the essential oil from *Aristolochia indica*. **Fito.** v. 73, n. 5, p. 439-441, 2002.

SIEGEL, S. **Estatística não paramétrica (para ciência do comportamento)**. São Paulo: Mac Graw-Hill do Brasil Ltda, 1970, p. 350.

SILVA, R. C.; PEREIRA, J. F.; LIMA, H. C. O Gênero *Copaifera* (Leguminosae-cesalpinoideae) na Amazônia Brasileira. **Rodriguésia**, v. 59, n. 3, p. 45-476, 2008.

SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Universidade/UFRGS/UFSC, 2000.

SIQUEIRA, D. S. *et al.*, Determinação de compostos de massa molecular alta em folhas de plantas da amazônia, **Quim. Nova**, v. 26, n. 5, p. 633-640, 2003.

SMITHELLS, R. W.; NEWMAN, C .G. H. Recognition of thalidomide defects. **J. Med. Genet.**, v. 29, p. 716-723, 1992.

SOBEL, J.D. Vaginal infections in adult women. **Med. Clin. N. Amer.**, v. 74, n. 6, p. 100, 1990.

SOUZA, K. C. B.; SCHAPOVAL, E. E. S.; BASSANI, V. L. LC determination of flavonoids: separation of quercetin, luteolin and 3-O-methylquercetin in *Achyrocline satureioides* preparations. **J. Pharma. Biom. anal.**, v. 28, p. 771-777, 2002.

STAPLES, R. E; SCHNELL, V. L. Refinements in rapid clearing technic in the KOH-alizarin red s method for fetal bone. **Stain. Technol.**, v. 39, p. 61-63, 1964.

TAPPIN, M. R. R. *et al.* Análise química quantitativa para a padronização do óleo de copaíba por cromatografia em fase gasosa de alta resolução. **Quim. Nov.**, v. 27, n. 2, p. 236-240, 2004.

TIBONI, G. M. *et al.* Defining critical periods for itraconazole-induced cleft palate, limb defects and axial skeletal malformations in the mouse. **Toxicol. Letters**, v. 167, p. 8–18, 2006.

TIBONI, G. M. ; MAROTTA, F.; CASTIGLIEGO, A. P. Teratogenic effects in mouse fetuses subjected to the concurrent in útero exposure to miconazole and metronidazole **Reprod. Toxicol.**, v. 26, p. 254–261, 2008.

TINCUSI B. M. *et al.* Antimicrobial terpenoids from the oleoresin of the Peruvian medicinal plant *Copaifera paupera*. **Plant. Med.**, v. 68, p. 808- 812, 2002.

TUROLLA, M. S. R.; NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Ver. Bras. Ciên. Farm.**, v. 42, n. 2, p. 289 – 306, 2006.

TYLER, V. E. The secrets of Saint-John's-wort. **Prevention**. v. 49, p. 74, feb., 1997.

TYLER, V. E. Natural products and medicine: an overview. *In*: BALICK, M.J.; ELISABETSKY, E.; LAIRD, S.A., eds. **Medicinal resources of the tropical forest, biodiversity and its importance to human health**. New York: Columbia University Press, 1996. p. 3-10. (Biology and resource management series).

VAN-CAUTEREN, H. The toxicological properties of itraconazole. *In*: FROMTLING, R.A. (Ed.), **Recent Trends in the Discovery, Development, and Evaluation of Antifungal Agents**. JR Prous, Barcelona, 1987, p. 263–271.

VASCONCELOS, A. F. F.; GODINHO, O. E. S. Uso de métodos analíticos convencionados no estudo da autenticidade do óleo de copaíba. **Quim. Nov.**, v. 25, p. 1057-1060, 2002.

VEIGA-JÚNIOR, V. F, *et al.* Phytochemical and antiedematogenic studies of commercial copaiba oils available in Brazil. **Phytot. Res.** v. 15, p. 476-480, 2001.

VEIGA JÚNIOR, V. F. **Controle de Qualidade de Óleos de Copaíba por Cromatografia Gasosa de Alta Resolução**. 1997. 89 p. Dissertação (Mestrado em química orgânica) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, 1997.

VEIGA-JÚNIOR, V. F.; PINTO, A. C. O gênero *Copaifera* L. **Quím. Nov.**, v. 25. n. 2, p. 273-286, 2002.

VEIGA-JÚNIOR, V. F. *et al.* Utilização de cromatografia gasosa de alta resolução na detecção de classes de terpenos em extratos brutos vegetais. **Quim. Nov.**, v. 18, n. 03, p. 262-266, 1995.

VEIGA-JÚNIOR, V. F.; PINTO, A. C. Plantas medicinais: cura segura? **Quim. Nov.**, v. 28, n. 3, 519-528, 2005.

VEIGA-JÚNIOR, V. F.; PATITUCCI, M. L.; PINTO A. C. Controle de autenticidade de óleos de copaíba comerciais por cromatografia gasosa de alta resolução. **Quim. Nov.**, v. 20, n. 6, p. 612-615, 1997.

WENNINGER, J. A.; YATES, R. L.; DOLINSKY, M. Sesquiterpene hydrocarbons of commercial copaiba balsam and American cedarwood oil. **J. Amer. Oil. Chem. Soc.**, v. 50, p. 1304-1313, 1967.

WILSON, J. D. Current status of toxicology. *In*: WILSON, J. D.; FRASER, F. C. **Handbook of teratology**. (Ed.), London: Plenum Press, 1977. v. 1, p. 47-74.

WILSON, J. C. Methods for administering agents and detecting malformations in experimental animal. *In*: WILSON, J.C.; WARKANY. **Teratology: principles and techniques**. Chicago: Univ. of Chicago Press, 1965. p. 262-277.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Traditional medicine strategy 2002-2005. Geneva: **Organização Mundial de Saúde**, 2002.

WU, K. M; GHANTOUS, H.; BIRNKRANT. Current regulatory toxicology perspectives on the development of herbal medicines to prescription drug products in the United States. **Food Drug Toxicol.**, v. 46, n. 46, p. 2606-2610, 2008.

9. BIBLIOGRAFIA

WILSON, J.C.; WARKANY, J. **Teratology: principles and techniques**. Chicago: Univ. of Chicago Press, 1965.

HODGSON, E.; LEVI, P. E. **A Textbook of Modern Toxicology**. 2^a ed. U.S.A, 1997.

HAYES, A. W. Reviews and Notes: Toxicology: Principles and Methods of Toxicology, *In*: MILDRED, S. C. **Test Methods for assessing female reproductive and developmental toxicology**, 3rd edition. New York: Raven, 1301-1373, p. 2001.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)