

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA  
CELULAR

**José Wagner Cavalcante Muniz**

**ESTUDO DA AÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA DO ÓLEO-RESINA DA  
*COPAIFERA RETICULATA* EM MODELOS FARMACOLÓGICOS  
EXPERIMENTAIS EM CAMUNDONGOS.**

BELÉM  
2009

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

José Wagner Cavalcante Muniz

**ESTUDO DA AÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA DO ÓLEO-RESINA DA  
*COPAIFERA RETICULATA* EM MODELOS FARMACOLÓGICOS  
EXPERIMENTAIS EM CAMUNDONGOS.**

Tese apresentada ao Doutorado no  
Programa de Pós-Graduação em  
Neurociências e Biologia Celular da  
Universidade Federal do Pará.  
Área de Concentração: Biologia Celular.  
Orientador: Prof<sup>o</sup>. Dr. José Luiz Martins  
do Nascimento.

BELÉM  
2009

Dados Internacionais da Catalogação-na-Publicação (CIP)  
Biblioteca de Pós-Graduação do ICB-UFPA – Belém (PA)

---

Muniz, José Wagner Cavalcante

Estudo da ação anti-inflamatória do óleo-resina da *Copaifera reticulata* em modelos farmacológicos experimentais em camundongo / José Wagner Cavalcante Muniz; orientador, José Luiz Martins do Nascimento. – 2009.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, Belém, 2009.

1. Plantas medicinais. 2. Copaiba. 3. Anti-inflamatórios. I. Título.

---

CDD – 20. ed. 615.3233

José Wagner Cavalcante Muniz

**ESTUDO DA AÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA DO ÓLEO-RESINA DA  
*COPAIFERA RETICULATA* EM MODELOS FARMACOLÓGICOS  
EXPERIMENTAIS EM CAMUNDONGOS.**

Tese apresentada ao Doutorado no  
Programa de Pós-Graduação em  
Neurociências e Biologia Celular da  
Universidade Federal do Pará.  
Área de Concentração: Biologia Celular.

Banca examinadora

---

Prof. Dr. José Luiz Martins do Nascimento  
(Orientador)

---

Prof. Gil Lúcio Almeida

---

Prof. Manoel Gionovaldo Feire Lourenço

---

Prof. Mauro José Pantoja Fontelles

---

Profª Maria Lúcia da Silva Ribeiro

Apresentado em: 11 / 12 / 2009  
Conceito: APROVADO

BELÉM  
2009

**À minha família.**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, que me permitiu chegar até aqui.

Ao Professor José Luiz Martins do Nascimento, por toda a confiança depositada nas minhas atitudes de condução da tese e o apoio incondicional em todos os momentos de correção de rumos nos experimentos realizados; além da base segura e firme de apoio na realização deste trabalho. Obrigado por ter sido meu ORIENTADOR.

À Doutora Patrícia Alves Reis. Apesar de todas as dificuldades ocorridas no período de desenvolvimento da tese, se manteve firme e no apoio na minha orientação com toda a paciência e gentileza, o que resultou em toda a minha admiração pelo seu profissionalismo e dedicação como pesquisadora. Obrigado pela oportunidade e pelos conselhos valorosos nestes três anos de convívio.

À Doutora Patrícia Torres Bozza, uma profissional, pesquisadora e mulher admirável e exemplo de profissionalismo. Obrigado pela oportunidade de realizar a parte experimental da tese no seu laboratório sob o guarda-chuva de toda a sua sabiência, gentileza e bondade. Obrigado por ter sido minha Coorientadora.

Ao professor Antônio Sérgio Lima da Silva, pelo apoio nos experimentos no tocante a identificação da espécie *Copaifera Reticulata* objeto de estudo desta tese. Em seu nome agradeço a toda a equipe do Museu Paraense Emílio Goeldi – MPEG pela contribuição dada na realização desta pesquisa.

À Daniela, que sempre foi minha fonte de apoio, que sempre me ajudou e esteve ao meu lado, principalmente, nas horas mais difíceis.

Ao amigo Prof<sup>o</sup> Manoel Gionovaldo, pela oportunidade de me introduzir no maior centro de pesquisa do Brasil, a FIOCRUZ.

Aos amigos que convivi e compartilhei nos momentos agradáveis e difíceis durante a caminhada do doutorado, a lembrança e o carinho.

A Socorro, secretária do Programa de Neurociências e Biologia Celular – UFPA, por toda a paciência e presteza nas solicitações feitas na secretária e as orientações proferidas nos ritos processuais da Instituição.

A todos que, de uma forma ou outra, contribuíram para este trabalho. Muito Obrigado.

"Se pude ver mais longe é porque eu estava sobre os ombros de gigantes".

**Isaac Newton** (04/01/1643 – 31/03/1727).



## RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a ação do óleo-resina de copaíba da espécie *copaifera reticulata* na inflamação aguda monitorando o seu efeito pela atividade anti-inflamatória. Para o teste da atividade biológica do óleo-resina de copaíba da espécie *copaifera reticulata* foi diluído em etanol 15%, tween 20 1,25% em solução de salina fisiológica. As doses testadas foram de 10, 100 e 500 mg/kg/p.c., preparadas em diluição seriada e administradas via oral e *in natura* para a dose teste administrada de forma tópica com veiculação do ultrassom. O efeito anti-inflamatório do óleo-resina foi avaliado em modelos de inflamação aguda induzida por carragenina (edema de pata e *air pouch*), modelo de inflamação aguda induzida por bradicinina, modelo de pleuresia por LPS e modelo nociceptivo de contorção abdominal induzida por ácido acético. Os resultados obtidos foram analisados pelo teste de ANOVA com *post-hoc* teste de Tukey com nível de significância alfa = 0,05. O óleo-resina de copaíba em suas doses (C10mg, C100mg e C500mg) reduziram o edema de pata induzido por carragenina após 1, 3, e 6 horas, no grupo C500mg no intervalo T3 se evidenciou com o menor volume e menor índice de edema. No modelo de pleuresia induzida por LPS no estudo realizado foi observado um número de neutrófilos com significativa diferença entre os grupos Dexametasona, C10mg, C100mg e C500mg em relação ao grupo Salina o que evidenciou a migração de neutrófilos para o local da injúria ( $p < 0.001^*$ ). Na veiculação do ultrassom no edema de pata nas doses (500mg (v.o.) e *in natura* (tópica c/ u.s), foi observada redução significativamente estatística ( $p < 0.05^*$ ) do índice de edema entre as doses de tratamento e controle (Cg). No modelo de *air pouch* ocorreu redução do número de neutrófilos ocorrida nos grupos copaíba ( $0.6063 \pm 0.32$ ). Na análise do número de contorções abdominais ocorreu evidência estatisticamente significativa de um número menor de contorções diante do tratamento com AAS, dipirona e copaíba 500mg. Na conclusão foi possível evidenciar que a atividade anti-inflamatória do óleo-resina foi confirmada pelos modelos farmacológicos testados.

**PALAVRA CHAVE:** Óleo-resina de copaíba, *copaifera reticulata*, anti-inflamatório.

## ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the action of the oil-resin of *Copaiba* *Copaifera reticulata* in acute inflammation by monitoring its effect on anti-inflammatory activity. To test the biological activity of the oil-resin of *Copaiba* *Copaifera reticulata* was diluted in ethanol 15%, 1.25% Tween 20 in saline solution. The doses tested were 10, 100 and 500 mg / kg / p.c, prepared in serial dilution and administered orally and in nature to the test dose administered topically serving with the ultrasound. The anti-inflammatory effect of the oil-resin was evaluated in models of acute inflammation induced by carrageenan (paw edema and air pouch) model of acute inflammation induced by bradykinin, a model of pleurisy by LPS and nociceptive model of abdominal writhing induced by acid acid. The results were analyzed by ANOVA test with post-hoc Tukey test with significance level  $\alpha = 0.05$ . The oil-resin of *Copaiba* in their doses (C10mg, C100mg and C500mg) reduced the paw edema induced by carrageenan after 1, 3 and 6 hours, the group C500mg the range to T3 showed the lowest volume and a lower rate of edema. In the model of pleurisy induced by LPS in the study noted a number of neutrophils with significant differences between groups Dexamethasone, C10mg, C100mg and C500mg compared to Saline group showed that the migration of neutrophils to the site of injury ( $p < 0.001$  \*). When running the ultrasound in paw edema at doses (500 mg (po) and fresh (topical c / us), a decrease significantly ( $p < 0.05$  \*) index of edema between the rates of treatment and control (CG). In the model of air pouch caused a reduction in the number of neutrophils occurred in groups *copaiba* ( $0.6063 \pm 0.32$ ). Analysis of the number of writhing was statistically significant evidence of a smaller number of contortions before treatment with AAS, dipyrone and *copaiba* 500mg. In conclusion it became clear that the anti-inflammatory activity of oil-resin was confirmed by pharmacological models tested.

KEY WORD: Oleoresin *copaiba*, *Copaifera reticulata*, anti-inflammatory.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 01- Distribuição geográfica das espécies de *Copaifera* da Amazônia brasileira
- Figura 02- Regiões onde o gênero *Copaifera* é encontrado no mundo
- Figura 03- Vias da cascata de sistema complemento
- Figura 04- Integração da resposta da imunidade inata e adquirida
- Figura 05- Sinais cardinais da inflamação
- Figura 06- Primeiras manifestações locais da inflamação aguda comparadas com o tecido normal
- Figura 07- Etapas principais da migração de células imunes no local da inflamação
- Figura 08- Desenho esquemático do metabolismo do ácido araquidônico.
- Figura 09- Via das Ciclooxygenases: produtos finais e tipos de receptores aos quais se ligam
- Figura 10- Cascada da 5-LOX
- Figura 11- Principais ações biológicas das lipoxinas (LXs), lipoxinas aspirinas-ativadas (ATLs) e seus análogos estáveis em células específicas pertinentes a inflamação e sua resolução
- Figura 12- Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e suas principais atividades
- Figura 13- Efeito da *Copaifera reticulata* e suas concentrações no edema agudo de pata induzido por carragenina
- Figura 14- Índice do Edema conforme os Instantes (T1, T3, T6) e os Grupos (Cg, Indo, C10, C100, C500)
- Figura 15- Índice de Inibição do Edema conforme os Instantes (T1, T3, T6) e os Grupos (Indo, C10, C100, C500)
- Figura 16- Índice do Edema (%) na pata do animal no T120
- Figura 17- Índice do Edema (%) na pata do animal nos tempos T10, T30 e T60
- Figura 18- Desenvolvimento longitudinal do experimento
- Figura 19- Efeito do tratamento com as doses da *copaifera reticulata* na migração de leucócitos induzida por LPS no modelo de pleurisia.
- Figura 20- Efeito do tratamento com as doses da *copaifera reticulata* na migração de monócitos induzida por LPS no modelo de pleurisia.
- Figura 21- Efeito do tratamento com as doses da *copaifera reticulata* na migração de neutrófilos induzida por LPS no modelo de pleurisia.
- Figura 22- Efeito comparativo do tratamento com a *copaifera reticulata* e suas doses (500mg e *in natura*) no índice de inibição de edema, calculado em relação ao pico do edema (1 horas).
- Figura 23- Efeito comparativo do tratamento com a *copaifera reticulata* e suas doses (500mg e *in natura*) no índice de inibição de edema, calculado em relação ao pico do edema (3 horas).
- Figura 24- Efeito do tratamento com as doses da *copaifera reticulata* (500mg e tópico *in natura*) no edema agudo de pata induzida por carragenina. As doses foram administradas por via oral e tópica.
- Figura 25- Efeito do tratamento com as doses da *copaifera reticulata* na contagem total do número de células, no número de proteínas, na migração de monócitos e neutrófilos induzida por carragenina no modelo de *air pouch*.

Figura 26- Número de contorções abdominais resultante do tratamento com *copaifera reticulata* nas doses (10, 100 e 500mg) em modelo nociceptivo induzido por ácido acético.

## LISTA DE QUADROS

- Quadro 01- Percentual sesquiterpenos contidos em óleos de copaíba.
- Quadro 02- Percentual de diterpenos contidos nos óleos de copaíba.
- Quadro 03- Tipos de quimiocinas e células que recrutam.
- Quadro 04- Atividade biológica dos produtos da COX.

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1- Inibidores de COX e suas classes
- Tabela 2- Atenuação das ondas ultrassônicas em diferentes tecidos.
- Tabela 3- Comportamento da absorção do ultrassom em relação a frequência.
- Tabela 4- Atividade antiedematogênica da *Copaifera reticulata* relativa ao volume, após estímulo com Carragenina na pata.
- Tabela 5- Atividade da *Copaifera reticulata* relativa ao Índice do Edema, após estímulo com carragenina na pata, conforme os Instantes (T1, T3, T6) e os Grupos (Cg, Indo, C10, C100, C500)
- Tabela 6- Índice de Inibição do Edema, conforme os Instantes (T1, T3, T6) e os Grupos (Cg, Indo, C10, C100, C500)
- Tabela 7- Índice de edema de pata induzido por bradicina nos intervalos de tempo – T10, T30, T60 e T120
- Tabela 8- Número de Leucócitos conforme os grupos (Sal, LPS, Dexa, C10, C100, C500).
- Tabela 9- Número de monócitos conforme os grupos (Sal, LPS, Dexa, C10, C100, C500).
- Tabela 10- Número de neutrófilos conforme os grupos - Sal, LPS, Dexa, C10, C100, C500.
- Tabela 11- Índice de edema de pata induzido pela carragenina com a veiculação do ultrassom
- Tabela 12- Avaliação do efeito da fonoforese da Copaíba *In natura*, sobre o Air pouch, natura em relação a três grupos controles: Salina, Carragenina, e Diclofenaco
- Tabela 13- Número de contorções conforme a aplicação de AAS
- Tabela 14- Número de contorções conforme a aplicação de Dipirona

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>AA</b> -	Ácido araquidônico
<b>a.C.</b> -	Antes de Cristo
<b>ADA</b> -	Adenosina deaminase
<b>ANOVA</b> -	Análise de variância
<b>ANVISA</b> -	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>ATLs</b> -	Lipoxinas aspirinas-ativadas
<b>AP-1</b> -	Proteína de ativação -1
<b>APHS</b> -	Hepata-2 inil-sulfideo
<b>BLT<sub>1,2</sub></b> -	Receptor específico do tipo proteína G
<b>C</b> -	<i>Copaifera</i>
<b>Ca</b> -	Calcio
<b>CaCl<sub>2</sub></b> -	Cloreto de cálcio
<b>cAMP</b> -	Adenosina 3', 5'-cíclica monofosfato
<b>CCB</b> -	Centro de ciências biológicas
<b>CG</b> -	Cromatografia gasosa
<b>cGMP</b> -	Guanosina 3', 5'-cíclica monofosfato
<b>CINC-1</b> -	<i>Citokine-induced neutrophil chemoattractant 1</i>
<b>C-NMR</b> -	Ressonância nuclear magnetic de C
<b>COBEA</b> -	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
<b>COX<sub>1,2,3</sub></b> -	Ciclooxigenase
<b>CXC</b> -	Família de quimiocinas
<b>cyPGs</b> -	Prostaglandinas ciclopentenonas
<b>CYP450</b> -	Citocromo P 450
<b>DHETs</b> -	Ácidos diidroieicosatrienóicos
<b>DNA</b> -	Ácido desoxirribonucléico
<b>DTT</b> -	Ditiotritol
<b>ECFPn</b> -	Estação Científica Ferreira Penna
<b>EDTA</b> -	Ácido etilenodiamintetracético
<b>EDRF</b> -	Fator de relaxamento derivado do endotélio
<b>EETs</b> -	Ácidos epoxieicosatrienóicos
<b>ELISA</b> -	Ensaio imunoenzimático
<b>ELR</b> -	Sequência ácido glutâmico, leucina e arginina
<b>ENA-78</b> -	<i>Epithelial cell-derived neutrophil-activating peptide</i>
<b>eNOS</b> -	Óxido nítrico sintase endotelial
<b>ERA</b> -	Área efetiva de emissão
<b>FAINES</b> -	Fármacos anti-inflamatórios não-esteróides
<b>FIOCRUZ</b> -	Fundação Instituto Oswaldo Cruz
<b>FLAP</b> -	Enzima ativadora de 5-LOX
<b>FLAP</b> -	Enzima ativadora de 5-LOX
<b>GLC</b> -	Cromatografia gás - líquido
<b>GM-CSF</b> -	Fator estimulador de colônia granulócito - macrófago
<b>GRO-<math>\alpha</math></b> -	<i>Growth-regulated oncogene</i>
<b>HETEs</b> -	Ácidos hidroxieicosatrienóicos
<b>HLA</b> -	Moléculas do Complexo Maior de Histocompatibilidade
<b>H<sub>2</sub>O</b> -	Água destilada
<b>HPETE</b> -	Hidroperóxido eicosatetraenóico
<b>HPLC</b> -	Cromatografia líquida de alta eficiência
<b>ICAM<sub>1</sub></b> -	Molécula de adesão intercelular

<b>IEC</b> -	<i>International Electrotechnical Commission</i>
<b>Ig</b> -	Imunoglobulina
<b>IL</b> -	Interleucina
<b>INF<sub>α</sub></b> -	Interferon
<b>iNOS</b> -	Óxido nítrico sintase induzida
<b>IR</b> -	Radiação infra-vermelho
<b>Kda</b> -	Quilodalton
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b> -	<i>Potassium dihydrogen phosphate</i>
<b>L</b> -	<i>Leguminosae</i>
<b>LOX</b> -	Lipoxigenase
<b>LPS</b> -	Lipossacarídeos
<b>LT</b> -	Leucotrieno
<b>LTA<sub>4</sub></b> -	Leucotrieno A <sub>4</sub>
<b>LTB<sub>4</sub></b> -	Leucotrieno B <sub>4</sub>
<b>LTC<sub>4</sub></b> -	Leucotrieno C <sub>4</sub>
<b>LTD<sub>4</sub></b> -	Leucotrieno D <sub>4</sub>
<b>LTE<sub>4</sub></b> -	Leucotrieno E <sub>4</sub>
<b>LXs</b> -	Lipoxina
<b>MAPK</b> -	<i>Mitogen activated protein kinase</i>
<b>MCP-1</b> -	Molécula quimiotática de monócitos
<b>MHC</b> -	Moléculas do complexo de histocompatibilidade
<b>MIG</b> -	<i>Monokine induced by interferon-gamma</i>
<b>MIP-1</b> -	<i>Macrophage inflammatory protein</i>
<b>MPEG</b> -	Museu Paraense Emilio Goeldi
<b>MPO</b> -	Mieloperoxidase
<b>MS</b> -	Ministério da Saúde
<b>MS</b> -	Espectrometria de massa
<b>MyD88</b> -	Mielóide
<b>NADPH</b> -	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
<b>NAP-2</b> -	<i>Neutrophil-activating protein-2</i>
<b>NF-κB</b> -	Fator nuclear-κB
<b>NK</b> -	<i>Natural Killer</i>
<b>nm</b> -	Nanômetro
<b>NO</b> -	Óxido nítrico
<b>NO<sub>2</sub></b> -	Nitrito
<b>NO<sub>3</sub></b> -	Nitrato
<b>nNOS</b> -	Óxido nítrico sintase neuronal
<b>NOS</b> -	Óxido nítrico sintase
<b>PAF</b> -	Fator de ativação plaquetária
<b>PAMPs</b> -	Pathogen-associated molecular patterns
<b>PBS</b> -	Tampão fosfato com salina
<b>p.c.</b> -	Peso corporal
<b>PGD<sub>2</sub></b> -	Prostaglandina D
<b>PGE<sub>2</sub></b> -	Prostaglandina E
<b>PECAM-1</b> -	Molécula de adesão celular plaqueta-endotélio
<b>PGF<sub>2</sub></b> -	Prostaglandina F
<b>PGG<sub>2</sub></b> -	Prostaglandina G
<b>PGHS</b> -	Prostaglandina H sintetase
<b>PGI<sub>2</sub></b> -	Prostaglandina I
<b>pH</b> -	Potencial hidrogeniônico



<b>PKC</b> -	Proteína quinase C
<b>PMNs</b> -	Neutrófilos polimorfonucleares
<b>PRR</b> -	<i>Pattern recognition receptor</i>
<b>RANTES</b> -	<i>Regulated upon activation in normal T-cells expressed and secreted</i>
<b>RNA</b> -	Ácido ribonucléico
<b>RNA<sub>m</sub></b> -	Ácido ribonucléico mensageiro
<b>ROS</b> -	Espécies reativas de oxigênio
<b>s.c.</b> -	Subcutânea
<b>SNC</b> -	Sistema nervoso central
<b>SOD</b> -	Superóxido dismutase
<b>SW</b> -	<i>Swiss Webster</i>
<b>TCA</b> -	Ácido tricloroacético
<b>TCR</b> -	Receptor de célula T
<b>TGF<sub>β</sub></b> -	Fator de crescimento de tumor
<b>TIR</b> -	Receptor Toll-IL1
<b>TLR</b> -	Receptores Toll-like
<b>TNF-<math>\alpha</math></b> -	Fator de necrose tumoral
<b>TXA<sub>2</sub></b> -	Tromboxano A <sub>2</sub>
<b>UFPA</b> -	Universidade Federal do Pará
<b>UEPA</b> -	Universidade do Estado do Pará
<b>UV</b> -	Ultravioleta

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	33
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b>	36
2.1- PLANTA MEDICINAL	36
<b>2.1.1- O Gênero <i>Copaifera</i></b>	41
2.2- O SISTEMA IMUNE	49
<b>2.2.1- Mecanismo de defesa imune inato</b>	49
<b>2.2.2- Mecanismo de defesa adaptativa (resposta imune adquirida)</b>	53
2.2.2.1- Mecanismo de defesa adaptativa: resposta imune humoral	53
2.2.2.2- Mecanismo de defesa adaptativa: resposta imune celular	54
2.3- INFLAMAÇÃO	55
<b>2.3.1- A função das células inflamatórias</b>	58
<b>2.3.2- Mediadores Inflamatórios</b>	61
2.3.2.1- Derivados do ácido araquidônico (AA)	61
2.3.2.1.1- Via das Ciclooxygenases (COX)	62
2.3.2.1.2- Via das lipoxigenases	65
2.3.2.1.3- Via do CYP450 (P450)	67
2.3.2.1.4- Via dos mediadores lipídicos anti-inflamatórios	67
2.3.2.1.5- Fator de Ativação Plaquetária	69
2.3.2.2- Óxido nítrico	69
2.3.2.3- Histamina	71
2.3.2.4- Serotonina (5-hidroxitriptamina)	71
2.3.2.5- Cininas	71
2.3.2.6- Adenosina deaminase: um mediador enzimático	72
2.3.2.7- Fatores Derivados do Plasma: Cascata de Coagulação e Sistema Complemento	72
2.3.2.8- Citocinas	73
2.3.2.9- Radicais livres	74
<b>2.3.3- Fármacos anti-inflamatórios</b>	76
2.3.3.1- Fármacos anti-inflamatórios esteróides (glicocorticóides)	76
2.3.3.2- Fármacos anti-inflamatórios não-esteroidais (FAINES)	77
2.3.3.3- Inflamação e Produtos Naturais	79
<b>2.4- A FISIOTERAPIA: O ULTRASSOM TERAPÊUTICO COMO RECURSO FÍSICO ANTIINFLAMATÓRIO</b>	80
<b>2.4.1- O ultrassom terapêutico</b>	80
2.4.1.1- Física do Ultrassom	81
2.4.1.2- Tipos de ondas	82
2.4.1.3- Tipos de Ultrassom	83
2.4.1.4- Características do ultrassom terapêutico	83
2.4.1.4.1- Atenuação	83
2.4.1.4.2- Absorção	84
2.4.1.4.3- Reflexão	85
2.4.1.4.4- Refração	85
2.4.1.4.5- Profundidade de Penetração	85
2.4.1.5- Efeitos físicos do ultrassom	86
2.4.1.5.1- Efeitos Não-Térmicos	86
2.4.1.5.2- Efeitos Térmicos	87
<b>2.4.2- Equipamento de Ultrassom</b>	87
<b>2.4.3- Sonoforese ou fonoforese</b>	88
2.4.3.1- Transmissividade	89

<b>3- OBJETIVOS</b>	91
3.1- OBJETIVO GERAL	91
3.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS	91
<b>4- JUSTIFICATIVA</b>	92
<b>5- MATERIAL E MÉTODO</b>	94
5.1- LOCAL DE REALIZAÇÃO	94
5.2- CARACTERÍSTICA DO ESTUDO	94
5.3- ANIMAIS EXPERIMENTAIS	94
5.4- CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	94
5.5- APARATO EXPERIMENTAL	95
<b>5.5.1- Preparação das gaiolas</b>	95
<b>5.5.2- Equipamento de ultrassom</b>	95
<b>5.5.3- Especificações do óleo de copaíba</b>	95
5.5.3.1- Preparo do Óleo-resina para tratamento via oral e tópico.	96
<b>5.5.4- Fármaco utilizado</b>	97
5.6- MODELOS FARMACOLÓGICOS EXPERIMENTAIS EM ANIMAIS: INDUÇÃO DO PROCESSO DE INFLAMAÇÃO AGUDA POR DIFERENTES AGENTES FLOGÍSTICOS E POTENCIAL ANALGÉSICO	97
<b>5.6.1- Modelo de edema de pata induzido por Carragenina (Cg)</b>	97
5.6.1.1- Grupo tratado com <i>copaifera reticulata</i> via oral	97
<b>5.6.2- Modelo de edema de pata induzido por bradicinina (Bk)</b>	98
5.6.2.1- Grupo tratado com óleo-resina de copaíba da espécie <i>copaifera reticulata</i> via oral	98
<b>5.6.3- Modelo de Pleurisia induzida por LPS (lipopolissacarídeo extraído da parede de E. coli)</b>	98
5.6.3.1- Contagem total de leucócitos	99
<b>5.6.4- Modelo de edema de pata induzido por carragenina(Cg) com veiculação do Ultrassom</b>	99
5.6.4.1- Grupo tratado com óleo-resina de copaíba da espécie <i>copaifera reticulata</i> administrada na forma tópica veiculada pelo ultrassom	99
<b>5.6.5- Modelo inflamatório de bolsa de ar (air pouch)</b>	100
5.6.5.1- Contagem total de leucócitos	102
<b>5.6.6- Modelo e contorção abdominal induzida por ácido acético (Writhing test)</b>	102
5.7- EUTANÁSIA DOS ANIMAIS UTILIZADOS NOS MODELOS EXPERIMENTAIS E DESTINO DAS CARÇAÇAS	103
5.8- ESTUDO ESTATÍSTICO	103
<b>6- AVALIAÇÃO DO RISCO X BENEFÍCIO DA PESQUISA</b>	104
<b>7- RESULTADOS</b>	106
7.1- MODELO DE EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA (Cg)	106
7.2- MODELO DE EDEMA DE PATA INDUZIDO POR BRADICININA (BK)	110
7.3- MODELO DE PLEURISIA INDUZIDA POR LPS	112
7.4- MODELO DE EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA (Cg) COM VEICULAÇÃO DO ULTRASSOM	115
7.5- MODELO INFLAMATÓRIO DE BOLSA DE AR (AIR POUCH)	118
7.6- MODELO DE CONTORÇÃO ABDOMINAL INDUZIDA POR ÁCIDO ACÉTICO (WRITHING TEST)	120
<b>8- DISCUSSÃO</b>	122
<b>9- CONCLUSÃO</b>	131
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	133
<b>ANEXOS</b>	148

## 1 – INTRODUÇÃO

Desde a pré-história o homem utiliza princípios ativos dos vegetais, de modo empírico ou intuitivo, para a cura de suas moléstias (AZULAY, 1997). Na Amazônia, em virtude da riqueza de seu bioma, muitas plantas são utilizadas pela população como alternativa para o tratamento de doenças, é a chamada medicina natural ou popular. Isto ocorre embora pouco se saiba sobre seus princípios ativos, mecanismos de ação e toxicidade (GABRIEL, 2002).

O óleo-resina de copaíba, também chamado bálsamo de copaíba, é um dos mais famosos produtos da flora brasileira, não só pelos fins industriais em que é utilizado (FONSECA, 1927), mas principalmente, pelo seu uso difundido na medicina popular para fins terapêuticos (SOUZA-JÚNIOR *et al.*, 2000).

As árvores produtoras do óleo-resina de copaíba são das diversas espécies do gênero *Copaifera*, família das Leguminosas, sendo as principais a *Copaifera Officinalis*, *Copaifera Reticulata*, *Copaifera Langsdorffii*, *Copaifera Guyanensis* (CORRÊA, 1984), *Copaifera Multijuga* e *Copaifera Cearensis* (BARATA & MENDONÇA, 1997; MONTI *et al.*, 1996; VEIGA JÚNIOR e PINTO, 2002). Tais árvores são encontradas em países do norte da América do Sul, como o Brasil, Venezuela, Guianas e Colômbia (BASILE *et al.*, 1988); sendo que no Brasil, os estados do Pará e Amazonas são os principais produtores, onde a espécie predominante é a *Copaifera reticulata* Ducke, a mais importante do ponto de vista comercial (GOTLIEB & IACHAN, 1995).

O óleo-resina de copaíba foi primeiramente utilizado por aborígenes, que o descobriu e o difundiu como tendo certas propriedades benéficas (CORRÊA, 1984), sendo bastante antiga a referência de que os indígenas aplicavam a substância em umbigos de recém-nascidos para profilaxia de infecção tetânica (CORRÊA, 1984; FERNANDES, 1949; FONSECA, 1927 *apud* SOUZA-JÚNIOR *et al.*, 2000).

O óleo de copaíba é utilizado para fins medicinais desde o século XVI, por via tópica ou sistêmica, no que diz respeito aos efeitos anti-inflamatório, analgésico, antiséptico, bactericida e cicatrizante, entre outros (BASILE *et al.*, 1988).

Pode-se dizer então que a copaíba é uma oferta que a Amazônia faz ao mundo, segredo que a cultura cabocla guardou por milênios, para a cura da humanidade, desde que, aproveitado racionalmente (GABRIEL, 2002); devendo ser mencionado, porém, que apesar de ser reportada sua utilização há mais de quatro séculos, ainda hoje é desconhecida parte de suas propriedades fármaco-terapêutico o que a torna alvo de estudos recentes (BRITO, 1996).

Com relação a seus princípios ativos, segundo Basile e colaboradores (1988), ainda merece estudo a ação farmacodinâmica de seus constituintes, responsável pelo efeito anti-inflamatório.

Durante o processo de evolução, no qual apenas os mais adaptados conseguem sobreviver, o ser humano adquiriu um sistema de defesa que é desencadeado por uma resposta imune contra os agentes agressores. Células especializadas são recrutadas, através de mediadores que provocam uma resposta inflamatória, que podem ser muitas vezes lesivas não somente ao agente invasor, mas também ao próprio organismo invadido (COLLINS *et al.*, 2000). Em vista disso, um grande número de trabalhos sobre anti-inflamatórios vem sendo pesquisado, com o objetivo de que as drogas e meios físicos terapêuticos descobertos possam ser utilizados na medicina.

A inflamação é uma reação complexa do tecido conjuntivo vascularizado que pode ser causada tanto por estímulos endógenos ou exógenos (COLLINS *et al.*, 2000), quanto por agentes infecciosos ou mesmo por lesão física (ROITT *et al.*, 1999), correspondendo a uma resposta protetora, cujo objetivo final é livrar o organismo da causa inicial da lesão celular e suas consequências (COLLINS *et al.*, 2000). Ela serve para destruir ou diluir o agente lesivo, mas por vez põe em movimento uma série de eventos que, tanto pode cicatrizar quanto reconstituir um tecido lesado (MALE, 1999).

Por mais de 50 anos, as tentativas de controle do processo inflamatório têm sido abordado pelos mais variados recursos físicos empregados pela fisioterapia, tais como gelo, calor, massagens, alongamentos, eletroterapia, bem como, a fonoforese (BAGGE & BROOKS, 1995; AMERICAN COLLEGE OF RHEUMATOLOGY, 2000). Tais recursos atuam como tratamento coadjuvante na recuperação dos tecidos orgânicos lesados, visando uma recuperação (LANGE *et al.*, 2003).

Na fisioterapia, é muito comum o emprego da terapia ultrassônica nas lesões de partes moles, com efeitos, antiálgico, antiedema, e de aceleração na recuperação do tecido lesionado (LOW & REED, 2001). Este recurso contribui no aumento do fluxo sanguíneo, na permeabilidade das membranas (STARKEY, 2001) e na ativação de fibroblastos, com aumento da produção de colágeno (KORSTJENS *et al.*, 2004).

A prática clínica associada à aplicação do ultrassom terapêutico com fármacos tem sido utilizada para maximizar a absorção de diversos fármacos em processos anti-inflamatórios, sendo este método chamado de fonoforese (BARE *et al.*, 1996). Sendo uma variante do ultrassom terapêutico direto, no qual substâncias biologicamente ativas são combinadas ao material de transmissão do ultrassom, para facilitar sua penetração através dos tecidos, aumentando sua efetividade, sendo assim, este recurso da fisioterapia poderá proporcionar a aceleração da difusão do óleo-resina de copaíba e consequentemente agir na redução do processo inflamatório.

## 2 – REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1- PLANTA MEDICINAL

As plantas deram origem a muitas drogas medicinais no passado e mantêm-se como uma fonte de novos agentes terapêuticos. Apesar de todas as técnicas analíticas disponíveis, a maioria das plantas com potencial farmacológico ainda não foram pesquisadas quanto as suas propriedades químicas, biológicas e farmacológicas (PHILLIPSON, 2003).

O conhecimento sobre plantas medicinais simboliza muitas vezes o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos. O uso de plantas no tratamento e na cura de enfermidades é tão antigo quanto a espécie humana. Ainda hoje nas regiões mais pobres do país e até mesmo nas grandes cidades brasileiras, plantas medicinais são comercializadas em feiras livres, mercados populares e são encontradas em quintais residenciais. Na região Amazônica foram catalogadas em duas comunidades que vivem nas margens da Baía de Marajó-PA, 260 plantas entre nativas e cultivadas; 1.200 são comercializadas no mercado Ver-o-Peso, em Belém-PA; outras 242 espécies são cultivadas em quintais residenciais, em Belém (AMOROZO & GELY, 1988).

As observações populares sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais contribuem de forma relevante para a divulgação das virtudes terapêuticas dos vegetais, prescritos com frequência, pelos efeitos medicinais que produzem, apesar de não terem seus constituintes químicos conhecidos. Dessa forma, usuários de plantas medicinais de todo o mundo, mantêm em voga a prática do consumo de fitoterápicos, tornando válidas informações terapêuticas que foram sendo acumuladas durante séculos. De maneira indireta, este tipo de cultura medicinal desperta o interesse de pesquisadores em estudos envolvendo áreas multidisciplinares, como por exemplo: botânica, farmacologia e fitoquímica, que juntas enriquecem os conhecimentos sobre a inesgotável fonte medicinal natural: a flora mundial (MACIEL *et al.*, 2002).

Estudos farmacológicos com extratos de produtos naturais têm sido desenvolvidos na tentativa de buscar novas opções de combate a diferentes patologias. Isto é fundamental não somente para a confirmação do efeito indicado popularmente,

como também para esclarecer orientações pouco elucidativas de ordem popular, pois as substâncias que encerram um preparado popular podem conter ações sinérgicas que podem produzir, ao longo do tempo, efeitos desconhecidos que assumem natureza tóxica (REIS, 2006).

O objetivo da busca crescente por novos fitofármacos não é para a substituição dos fármacos já existentes no mercado, mas sim, a obtenção de novos fármacos de origem natural, o que aumentaria a opção terapêutica dos profissionais de saúde, ofertando medicamentos equivalentes, talvez mais baratos, com espectro de ação mais adequado e com indicação terapêutica complementar às terapias existentes, mas sempre em estrita obediência aos preceitos que regem o emprego de xenobióticos na espécie humana. Os objetivos secundários, porém não menos importantes seriam a valorização das tradições populares e o fornecimento de substrato autóctone para o desenvolvimento da indústria farmacêutica local (LAPA *et al.*, 2000).

A fitoterapia é a ciência que estuda a utilização dos produtos de origem vegetal com finalidade terapêutica, seja para prevenir, atenuar ou curar um estado patológico. Sendo assim, segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2004), fitoterápico, de acordo com a legislação sanitária brasileira, é o medicamento obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade (BRASIL, 2004a).

Os fitoterápicos sempre apresentaram uma parcela significativa no mercado de medicamentos. O setor movimentava globalmente US\$ 21,7 bilhões por ano. No Brasil, não existem dados oficiais atualizados, porém, estima-se que esse mercado gira em torno de US\$ 160 milhões por ano. E o fator de atração é o ritmo de crescimento das vendas internamente, mais de 15% anuais, contra 4% do que evoluem as vendas dos medicamentos sintéticos. Em toda a cadeia produtiva, o setor fitoterápico movimentava anualmente cerca de R\$ 1 bilhão (FEBRAFARMA, 2007).

No Brasil, o principal órgão responsável pela regulamentação de plantas medicinais e seus derivados é a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), autarquia do Ministério da Saúde que tem como papel proteger e promover a saúde da



população garantindo a segurança sanitária de produtos e serviços e participando da construção de seu acesso (BRASIL, 1999).

Uma das ações realizadas pela ANVISA para garantir a segurança da saúde da população é o registro de medicamentos, etapa na qual os mesmos são avaliados quanto a sua segurança, eficácia e qualidade antes de serem expostos a venda para utilização pela população (CARVALHO, *et al.*, 2008).

A regulamentação em vigor para o registro de medicamentos fitoterápicos é a Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) 48/2004, que determina os aspectos essenciais ao registro, como identificação botânica das espécies vegetais utilizadas, padrão de qualidade e identidade e prova de eficácia e segurança que validam as indicações terapêuticas propostas. Há ainda as Resoluções Específicas (RE): RE 88/2004, que contempla a Lista de Referências bibliográficas para avaliação da segurança e da eficácia dos fitoterápicos; RE 89/2004, que contempla a Lista de registro simplificado de fitoterápicos; RE 90/2004, contendo o Guia para realização dos testes de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos; e RE 91/2004, que trata do Guia para realização de alterações, inclusões, notificações e cancelamento pós-registro de fitoterápicos (BRASIL, 2004a,b,c,d,e).

Além das Resoluções Específicas (RE) anteriormente descritas, se aplicam ao registro de fitoterápicos, todas as legislações que normatizam o registro de medicamentos, dentre elas: normas sobre publicidade de medicamentos, RDC 102/2000; o regulamento para Certificação de Boas Práticas de Fabricação e Controle (CBPFC) e RDC 210/2003, (BRASIL, 2000, 2003).

A RDC 48/2004 permite o registro como fitoterápico apenas do derivado de droga vegetal, que é o produto de extração da matéria prima vegetal: extrato, tintura, óleo, cera, exsudato, suco e outros (CARVALHO, *et al.*, 2008). De acordo com sua abrangência, “não é objeto de registro ou cadastro a planta medicinal ou suas partes, após processos de coleta, estabilização e secagem, podendo ser íntegra, rasurada, triturada ou pulverizada” (BRASIL, 2004a).

Informações sobre registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil podem ser obtidas por diversas fontes, sendo as mais utilizadas o endereço eletrônico da ANVISA

e o Visalegis, por serem de livre acesso. No endereço eletrônico da ANVISA, na área relativa a medicamentos, disponível no endereço eletrônico (*link*): [http://www7.Anvisa.gov.br/datavisa/Consulta\\_Produto/consulta\\_medicamento.asp](http://www7.Anvisa.gov.br/datavisa/Consulta_Produto/consulta_medicamento.asp), pode-se buscar quais são os fitoterápicos registrados através de algumas ferramentas, como: nome comercial do produto; do princípio ativo (no caso de espécies vegetais, gênero e espécie). Atualmente, o cadastro de espécies vegetais para o registro de fitoterápicos na ANVISA está restrito ao gênero e espécie correspondente, uma vez que a inclusão do autor do binômio acarretava diversos erros); CNPJ da empresa; número de registro do medicamento procurado; ou o número do seu processo de registro na ANVISA. Já o Visalegis, disponível também no sítio da ANVISA através do endereço eletrônico (*link*): <http://www.Anvisa.gov.br/e-legis/>, é uma base de dados que contempla a legislação relacionada à vigilância sanitária nos âmbitos federal, estadual e municipal, sendo alimentada e atualizada pela ANVISA e pelas Vigilâncias Sanitárias Estaduais e Municipais, diariamente. Nessa base de dados, pode-se buscar o registro de determinado medicamento fitoterápico pelo nome comercial do produto; princípio ativo; nome da empresa detentora do registro; ou número do processo de registro (CARVALHO. *et al*, 2008).

Não se considera fitoterápico aquele que, na sua composição, inclua substâncias ativas isoladas, de qualquer origem, nem as associações destas com extratos vegetais. O efeito terapêutico tem que resultar da planta, ou extrato, suco ou óleo da mesma. Sua eficácia e segurança são validadas através de levantamentos etnofarmacológicos de utilização, documentações tecno-científicas em publicações ou ensaios clínicos fase três (HENRIQUES, 2004).

Para avaliar o potencial terapêutico de plantas medicinais é necessário realizar várias etapas de testes que comprovem se a planta ou seus derivados podem ser utilizados como novo medicamento, tais como:

1ª etapa - A etapa botânica, que está relacionada à identificação do material de estudo. Esta fase é de extrema importância devido à semelhança entre algumas espécies. Deve-se também observar as condições ambientais em que a planta estava ao ser coletada e procurar coletar sempre na mesma época, pois de acordo com a luminosidade, temperatura, umidade e condições do solo, a característica química dos compostos secundários da planta pode variar;

2ª etapa – A etapa farmacêutica, que está relacionada ao preparo do material para administração, com a garantia da qualidade e uniformidade da amostra, assim como sua estabilidade para utilização nos testes pré-clínicos;

3ª etapa – A etapa de ensaios biológicos pré-clínicos, que está relacionada a experimentos farmacocinéticos, farmacodinâmicos e toxicológicos *in vivo* e *in vitro*;

4ª etapa – A etapa clínica, que é realizada na espécie humana. Esta etapa está dividida em quatro fases, a saber:

**1ª Fase:** realizada em voluntários sadios. Nesta fase são avaliados: o efeito em função da dose administrada, os mecanismos de absorção, vida média dos componentes ativos, metabolização e excreção, biodisponibilidade (tratamento oral) e posologia;

**2ª Fase:** realizada em um pequeno número de pacientes (10 a 15) com tratamentos de curta duração. Esta fase avalia o potencial terapêutico do medicamento em relação à patologia para a qual ele é proposto. Avalia-se também a efetividade, a toxicidade e possíveis interações medicamentosas;

**3ª Fase:** realizada em um número maior de pacientes, visando comprovar a segurança e efetividade da droga teste, a menor dose eficaz e a efetividade do medicamento frente a controles placebo e uma substância de referência com atividade semelhante (**controle positivo**);

**4ª Fase:** realizada em um grande número de pacientes. Os ensaios são realizados em estudo duplo cego com a droga teste, o placebo e o controle positivo (droga referência). Na dependência do número de pacientes envolvidos esses testes permitem a identificação de reações idiossincrásicas de baixa ocorrência.

As etapas acima citadas (Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde – MS) são obrigatórias para que fitoterápicos, medicamento de origem vegetal, herbáricos ou plantas medicinais sob qualquer forma ou processamento possam ser consideradas medicamentos para utilização pela espécie humana (LAPA *et al.*, 2000).

A opção pela fitoterapia como forma de tratamento vem crescendo acentuadamente nestes últimos anos, ao ponto que, atualmente, o mercado mundial de

fitoterápicos registra crescentes aumentos no consumo deste produto. Dentro desta perspectiva, esperava-se que o Brasil, considerando sua extensa e diversificada flora, detendo aproximadamente um terço da flora mundial, ocupasse posição privilegiada. Isto em verdade não ocorre, embora exista no país um grande número de grupos de pesquisadores que tem contribuído ativamente para o desenvolvimento da química de produtos naturais (YUNES *et al.*, 2001).

Uma das principais limitações até agora relacionadas com a questão dos produtos naturais como novos fármacos é a alegada complexidade do processo de avaliação da composição química de seus extratos pela presença de misturas de compostos, de difícil caracterização. Entretanto, muitas metodologias de análise vêm sendo desenvolvidas para investigação de plantas medicinais. As técnicas de cromatografia (TLC, GLC e HPLC, CG) e de espectroscopia (UV, IR, <sup>3</sup>H-e <sup>13</sup>C-NMR, MS) utilizados em pesquisa de plantas medicinais estão em constante avanço. Isto, de fato, tem contribuído para a identificação de compostos biologicamente ativos para terapia de diversas patologias (PHILLIPSON, 2003).

### 2.1.1 – O Gênero *Copaifera*

A origem do nome copaíba parece vir do tupi *cupa-yba*, a árvore de depósito, ou que tem jazida, em alusão clara ao óleo que guarda em seu interior. Chamado de *copaiva* ou *copahu* pelos indígenas (do tupi: *Kupa'iwa* e *Kupa'ü*, respectivamente), e *cupay*, na Argentina e no Paraguai (origem guarani), o óleo de copaíba e suas propriedades medicinais eram bastante difundidos entre os índios latinoamericanos à época que aqui (Brasil) chegaram os primeiros exploradores europeus no século XVI (VEIGA JÚNIOR & PINTO, 2002).

Veiga Júnior e Pinto (2002) afirmam que são muitas as denominações que o óleo das árvores copaibeiras recebe nas diversas regiões da América Latina onde é utilizado. Na Região Amazônica o uso do óleo das árvores copaibeiras é tão extenso, que a copaíba se destaca como a planta medicinal mais utilizada e conhecida pela população amazônica. O óleo pode ser encontrado em mercados populares e é conhecido por diferentes denominações, como: Copahyba, Copaibarana, Copaúba, Copaibo, Copal, Maram, Marimari e Bálsamo dos Jesuítas.

Conforme Veiga Júnior e Pinto (2002) a nomenclatura botânica segue, como norma, os nomes mais antigos dados às plantas. Em alguns casos, entretanto, são feitas exceções frente à utilização corrente de outros nomes. Uma destas exceções está nas leguminosas, cujo nome mais antigo é Faba, mas *Fabaceae Lindley* dá lugar a *Leguminosae Juss.*, na nomenclatura desta que é uma das mais importantes famílias botânicas estudadas. A classificação mais moderna da família *Leguminosae* a divide em três subfamílias: *Caesalpinoideae*, *Mimosoideae* e *Papilionoideae* (ou *Faboideae*) (JUDD *et al.*, 1999). Por esta classificação, que segue o sistema de Engler, o gênero *Copaifera* L. pertence à família *Leguminosae Juss.*, sub-família *Caesalpinoideae Kunth*. Veiga Júnior e Pinto (2002) afirmam ainda que segundo outro sistema de classificação, o de *Cronquist*, o gênero *Copaifera* L. pertence à família *Caesalpiniaceae R.Br.* A classificação apenas como *Fabaceae* também é encontrada em alguns livros (HARBORNE *et al.*, 1971 e LEWIS & ELVIN-LEWIS, 1977). Portanto as árvores "copaíba", assim denominadas vulgarmente, são plantas pertencentes ao gênero *Copaifera (Leguminosae – Caesalpiniaceae)* (CASCON & GILBERT, 2000; DWYER, 1951 *apud* VEIGA JÚNIOR & PINTO, 2002).

Veiga Júnior e Pinto (2002) relatam que muitos botânicos e cronistas que estiveram nas Índias Ocidentais e na América no início da colonização descreveram espécies do gênero *Copaifera*. Em 1628, MarcGrave e Piso *apud* Veiga Júnior e Pinto (2002) descreveram os aspectos morfológicos da planta, empregando o termo "Copaiba" sem designar espécies. Mais tarde se verificou, através dos caracteres descritos pelos dois cronistas, que a espécie estudada foi a *Copaifera martii*. Em 1760, Jacquin descreveu em detalhes a primeira *Copaifera* como *Copaiva officinalis* Jacq., como não possuía o fruto, baseou sua descrição nos aspectos do fruto da espécie estudada por MarcGrave e Piso. Somente dois anos depois, o cientista sueco Carl Von Linneu descreveu corretamente a *Copaifera officinalis*, assumindo a descrição oficial do gênero *Copaifera* L. (VEIGA JÚNIOR & PINTO 2002).

Em 1825, Hayne publicou uma monografia com oito novas espécies de *Copaifera* que, apesar de um pouco confusa em vista do conhecimento da época, constituiu-se no mais importante trabalho de descrição do gênero e serviu como base para estudos como o de Bentham, no Flora Brasiliensis, realizado durante a expedição com o naturalista Von Martius, em 1870 (VEIGA JÚNIOR & PINTO 2002).

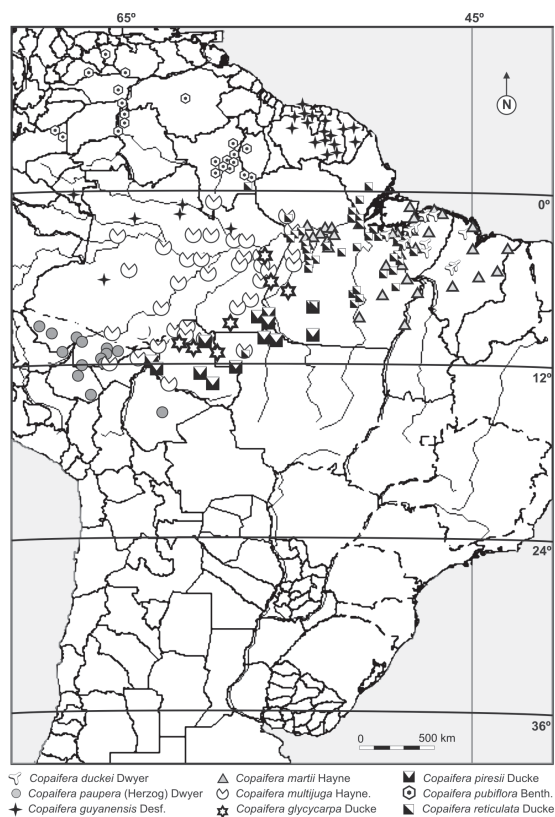
Os trabalhos mais recentes de descrição de novas espécies foram os realizados por Harms e Ducke, este último com contribuições de extremo valor sobre as espécies da Região Amazônica e do Estado do Ceará, e por Dwyer, que realizou um levantamento das espécies americanas (VEIGA JÚNIOR & PINTO 2002).

As copaíbas são árvores 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. Segundo a última edição do *Index Kewensis*, o gênero *Copaifera* possui 72 espécies, sendo que dezesseis destas só são encontradas no Brasil (VEIGA JÚNIOR & PINTO 2002).

Popularmente conhecidas como copaibeiras ou pau d'óleo, as copaíbas são encontradas facilmente nas Regiões Amazônica e Centro-Oeste do Brasil. Entre as espécies mais abundantes, destacam-se: *Copaifera officinalis* L. (norte do Amazonas, Roraima, Colômbia, Venezuela e San Salvador), *Copaifera guianensis* Desf. (Guianas), *Copaifera reticulata* Ducke, *Copaifera multijuga* Hayne (Amazônia), *Copaifera confertiflora* Bth (Piauí), *Copaifera langsdorffii* Desf. (Brasil, Argentina e Paraguai), *Copaifera coriacea* Mart. (Bahia), *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke (Ceará) (CASCON & GILBERT, 2000; VEIGA JÚNIOR & PINTO 2002; DWYER, 1951 *apud* VEIGA JÚNIOR & PINTO, 2002).

No Brasil, a espécie *Copaifera langsdorffii* Desf. é particularmente importante por estar distribuída por todo o território brasileiro (da Amazônia a Santa Catarina, no nordeste e centro-oeste do Brasil) e por possuir quatro diferentes variedades: *Copaifera langsdorffii* var. *grandifolia*, *grandiflora*, *laxa* e *glabra* (LEITE & LLERAS, 1993).

A figura 01 mostra o mapeamento da região amazônica do Brasil onde as diversas espécies do gênero *Copaifera* foram encontradas (MARTINS-DA-SILVA, R.C.V.; PEREIRA, J.F. & LIMA, H.C., 2008.).



**Figura 01** – Distribuição geográfica das espécies de *Copaifera* da Amazônia brasileira (adaptado de MARTINS-DA-SILVA, R.C.V.; PEREIRA, J.F. & LIMA, H.C., 2008.).

Já a *copaifera reticulata* presente apenas no Brasil, na Amazônia brasileira, foi encontrada amplamente distribuída na porção oriental, rara na ocidental e ausente a nordeste; amplamente distribuída no Estado do Pará, encontra-se, ainda, a sudoeste do Amapá, sudeste de Roraima e norte de Mato Grosso. Habita mata de terra firme (MARTINS-DA-SILVA, R.C.V.; PEREIRA, J.F. & LIMA, H.C., 2008.).

Na África Ocidental são descritas 19 espécies na região que inclui Congo, Camarões, Guiné e Angola. Destas, as espécies *Copaifera convertifolia*, *Copaifera demeusii* (Copal do Congo), *Copaifera coleosperma* (Copal da Rodésia), *Copaifera conjugata*, *Copaifera hymenaefolia*, *Copaifera chodatiana* e *Copaifera fissicuspis*, descritas como pertencentes ao gênero *Copaifera*, têm sinonímia nos gêneros *Guibourtia*, *Gorakia* (*Gorakia conjugata*) e *Cynometra* (*C. fissicuspis*) (VEIGA JÚNIOR & PINTO 2002).

A figura 02 mostra o mapeamento das regiões do mundo onde espécies do gênero *Copaifera* foram encontradas.



**Figura 02.** Regiões onde o gênero *Copaifera* é encontrado no mundo, adaptada de Veiga Júnior e Pinto, 2002.

A designação correta para o óleo da copaíba é a de óleo-resina, por ser um exudato constituído por ácidos resinosos e compostos voláteis (BRUNETON, 1987; MESQUITA, 1989, MACIEL *et al.*, 2002; PINTO *et al.*, 2000). O óleo-resina de copaíba é encontrado em canais secretores localizados em todas as partes da árvore. Estes canais são formados pela dilatação de espaços intercelulares (meatos) que se intercomunicam no meristema, chamados de canais esquizógenos (OLIVEIRA, 1905).

O caráter mais saliente deste aparelho secretor está no tronco, onde os canais longitudinais, distribuídos em faixas concêntricas, nas camadas de crescimento demarcadas pelo parênquima terminal, reúnem-se com um traçado irregular, em camadas lenhosas, muitas vezes sem se comunicarem (OLIVEIRA, 1905; ALENCAR, 1982). O óleo é produto da desintoxicação do organismo vegetal e funciona como defesa da planta contra animais, fungos e bactérias (ALENCAR, 1987).

A composição química dos óleos de copaíba se encontra citada em vários artigos científicos, onde foram utilizadas técnicas mais antigas, bem como, metodologias modernas de isolamento e de identificação, tais como cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa com colunas cromatográficas de fase estacionária quiral ( $\beta$ -ciclodextrina permetilada) (LANGENHEIM & FEIBERT, 1988; VEIGA JÚNIOR. & PINTO, 2002).



O óleo-resina de copaíba é uma resina líquida rica em sesquiterpenos e diterpenos de diferentes concentrações. Sua fração mais volátil, mais leve, é composta por sesquiterpenos, enquanto a fração mais pesada, resinosa, é composta por diterpenos (RIGAMONTE-AZEVEDO, *et al.*, 2004). A fração óleo essencial compõe-se basicamente de sesquiterpenos e a fração resina, de ácidos diterpênicos (BARATA,1997; MONTI *et al.*, 1996; VEIGA JÚNIOR & PINTO, 2002). Em temperatura ambiente, apresenta consistência líquida, com aroma forte e penetrante, e sabor acre, persistente, amargo e adstringente. Suas características físico-químicas variam de líquido transparente a opaco; de baixa a alta viscosidade; de coloração incolor, amarelo-pálido até o castanho claro dourado, a vermelho (CORRÊA, 1931; LEITE *et al.*, 2001; VEIGA JÚNIOR & PINTO, 2002).

O óleo-resina apresenta uma grande variabilidade em sua composição química, tendo sido identificados 72 sesquiterpenos e 27 diterpenos (VEIGA JÚNIOR & PINTO, 2002), sendo o ácido copálico a única substância encontrada em todos os óleos analisados, razão pela qual se sugere que seja utilizado como um marcador biológico de óleos de copaíba (VEIGA JÚNIOR *et al.*, 1997). A variabilidade dos componentes deste tipo de óleo-resina é muitas vezes atribuída a mistura dos óleos de diferentes espécies botânicas, ou ainda, de espécimes de idades e locais diferentes de coleta (VEIGA JÚNIOR & PINTO, 2002). Também se atribui a essa variabilidade, principalmente no caso dos óleos comerciais, adulterações pela mistura de outros tipos de óleos de menor valor agregado e essências aromatizantes (VEIGA JÚNIOR *et al.*, 1997).

No que se refere à composição química dos óleos-resinas das espécies de *Copaifera* (*Copaifera multijuga*, *Copaifera cearensis* e *Copaifera reticulata*), observa-se a predominância de sesquiterpenos, como o  $\alpha$ -humuleno,  $\alpha$  e  $\beta$ -selineno,  $\beta$ -bisaboleno e  $\beta$ -cariofileno (LANGENHEIM & FEIBERT, 1988; PINTO *et al.*, 2000), sendo o  $\beta$ -bisaboleno possuidor de propriedades anti-inflamatória e analgésica e o  $\beta$ -cariofileno é descrito na literatura como antiedêmico, anti-inflamatório, bactericida e insetífugo (VEIGA JUNIOR. & PINTO, 2002); além de diterpeno descrito na literatura como antiparasitário e atividade antimicrobiana. O quadro 01 mostra algumas das espécies que tiveram suas propriedades confirmadas e os percentuais de sesquiterpenos (VEIGA JÚNIOR *et al.*,2007).

Sesquiterpene	RI	<i>Copaifera multijuga</i>	<i>Copaifera cearensis</i>	<i>Copaifera reticulata</i>
α-elemene	1344	0.3	–	0.4
α-cubebene	1352	0.3	1.8	0.4
α-copaene	1382	2.5	8.2	3.0
β-cubebene	1393	–	3.3	–
α-cedrene	1400	1.1	–	1.5
calarene	1417	0.3	–	0.2
longifolene	1423	0.1	0.5	0.2
β-caryophyllene	1426	57.5	19.7	40.9
α-bergamotene	1436	2.6	2.1	4.1
β-sesquiphellandrene	1442	0.1	0.8	0.3
aromadendrene	1447	0.2	1.7	–
α-humulene	1457	8.3	3.7	6.0
α-curcumene	1468	–	0.1	0.9
γ-amorphene	1478	1.9	0.9	2.2
germacrene D	1483	2.4	0.4	5.0
α-aromadendrene	1490	–	3.8	–
germacrene B	1499	1.0	3.6	1.9
β-bisabolene	1509	0.3	2.8	0.8
γ-cadinene	1515	0.6	–	2.1
δ-cadinene	1524	1.7	7.2	2.6
α-cadinene	1531	0.2	0.1	0.1
α-selinene	1536	–	0.1	0.2
β-vetivene	1542	0.1	0.5	0.2
α-caryophyllenol	1554	0.7	0.1	–
ledol	1565	0.2	0.5	–
multigenol	1572	–	–	0.3
caryophyllene oxide	1582	0.5	1.5	2.4
guaïol	1595	0.2	0.3	–
cedrol	1616	0.4	1.4	0.6
NI	1625	0.2	0.2	–
cadalene	1637	0.4	0.4	0.6
NI	1642	0.7	–	0.7
α-cadinol	1649	–	0.7	0.6
α-bisabolene oxide	1655	0.4	–	–
β-bisabolol	1666	0.1	8.2	0.4
acetoxycaryophyllene	1700	0.2	–	–
methyl 3-methyl-5(2,2,6-trimethyl-6-hydroxy-1-cyclohexyl)-pentanoate		–	2.1	–
sesquiterpene content (%)		85.5	76.5	78.2

NI, not identified.

**Quadro 01** – Percentual sesquiterpenos contidos em óleos de copaíba (VEIGA JÚNIOR *et al.*, 2007).

No que se refere à composição química dos óleos-resinas das espécies de *Copaifera*, observa-se a predominância de sesquiterpenos.

No Quadro 02 mostra as propriedades confirmadas e os percentuais de diterpenos existentes na composição química dos óleos de copaíba (VEIGA JÚNIOR *et al.*, 2007).

Diterpenes	<i>Copaifera multijuga</i>	<i>Copaifera cearensis</i>	<i>Copaifera reticulata</i>
NI	–	–	0.3
16-kaurene	–	–	1.6
methyl eperuate	0.4	0.8	–
NI	–	–	2.3
NI	–	–	1.7
methyl cativate	–	0.5	–
methyl kaurenoate	–	–	3.9
methyl copalate	6.2	2.1	2.4
methyl kolavenate	–	0.5	3.4
NI	–	1.1	–
methyl hardwickiate	–	6.2	2.3
dimethyl pinifolate	0.2	–	–
NI	1.3	–	–
methyl clorechinatate	–	11.3	0.1
NI	0.4	1.0	–
dimethyl clerod-3-en-15,18-dioate	–	0.1	–
dimethyl agathate	2.1	–	1.5
methyl 3-hydroxy-copalate	0.6	–	–
methyl 3-acetoxy-copalate	3.4	–	1.4
NI	–	–	1.2
diterpene content (%)	14.5	23.5	21.8
Total (%)	100	100	100

NI, not identified.

**Quadro 02** - Percentual de diterpenos contidos nos óleos de copaíba (VEIGA JÚNIOR *et al.*, 2007).

Os trabalhos realizados sobre o gênero *Copaifera* L. estão, em sua maioria, relacionados com o óleo que é exudado do tronco destas árvores, sendo encontrado na região tropical da América Latina, principalmente na região amazônica.

Desde os primeiros anos do descobrimento do Brasil, o óleo de copaíba vem sendo indicado para diversos fins, farmacológicos ou não. Por sua ampla utilização, muitos estudos foram realizados sobre este gênero, abordando suas diversas aplicações. Apesar dos mais de 200 trabalhos publicados em diversas línguas (VEIGA JÚNIOR & PINTO, 2002), muitos dados sobre a composição química e atividade farmacológica do óleo de copaíba são contraditórios. Há equívocos desde a identificação botânica até a composição química dos óleos de copaíba, que são, também, frequentemente,

misturados a outros óleos e adulterados (VEIGA JÚNIOR & PINTO, 2002; CASCON & GILBERT, 2000).

Portanto, o presente trabalho visou a comprovação científica da utilização do óleo-resina de Copaíba da espécie *Copaifera Reticulata* como moduladora da resposta inflamatória aguda em diferentes modelos farmacológicos inflamatórios experimentais.

## 2.2- O SISTEMA IMUNE

O sistema imune é composto por células com funções específicas na defesa do organismo e formado por órgãos linfóides primários (timo, baço, medula óssea) e secundários (linfonodos e a placa de Payer), células circulantes, fatores humorais e citocinas que promovem a proteção do indivíduo (PARKIN & COHEN, 2001).

A imunidade é dividida em dois tipos fundamentais de resposta: a resposta imune inata e a resposta imune adquirida ou adaptativa, determinadas pela velocidade e especificidade da resposta gerada, respectivamente (PARKIN & COHEN, 2001).

A resposta imune inata compreende as barreiras físico-químicas (a pele e as membranas mucosas), células (neutrófilos, monócitos e macrófagos), sistema complemento, citocinas e proteínas de fase aguda. A resposta imune adquirida consiste em reações antígeno-específico de linfócitos do tipo T e B (PARKIN & COHEN, 2001).

Enquanto o mecanismo de defesa inato é rápido, embora algumas vezes nocivo às células sadias, a resposta imune adaptativa é precisa, porém, mais lenta ao entrar em contato pela primeira vez com o agente agressor (o antígeno). Entretanto, após a primeira exposição ao antígeno se desenvolvem células de memória, e um novo contato com o agente infeccioso leva a uma resposta mais rápida e específica ao agente agressor (PARKIN & COHEN, 2001).

### 2.2.1 Mecanismo de defesa imune inato

O mecanismo de defesa imune inato é a primeira linha de defesa do organismo. A base da ativação da resposta é o reconhecimento do patógeno, que ao entrar em contato com o organismo, inicia uma cascata de reações, induzindo a liberação de quimiocinas, citocinas, prostaglandinas e leucotrienos resultando em injúria celular (BASSET *et al.*, 2003).

Macrófagos e células dendríticas envolvidas na resposta imune inata são estimuladas pelo reconhecimento por seus receptores de superfície *pattern recognition* (PRR), que reconhecem moléculas denominadas *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs), que são comuns em micro-organismos. As PRRs interagem com anticorpos naturais (opsoninas) para promover o reconhecimento do micro-organismo e aumentar a fagocitose. As proteínas do complemento agem criando complexos que ao se ligarem à membrana do micro-organismo provocam lise, destruindo-o. A segunda categoria de PRRs consiste de: receptores internalizados, como o receptor de manose presente em macrófagos, que se liga aos resíduos de manose comumente presentes ou a micro-organismos; e receptores *scavenger* que reconhecem polímeros aniônicos ou lipoproteínas de baixa densidade acetiladas encontradas na superfície de bactérias danificadas. Os receptores da terceira categoria incluem aqueles que contribuem para transdução do sinal, que inclui os *toll-like receptors* (TLRs) (FALGARONE *et al.*, 2005). Estes receptores estão ancorados na membrana celular e seu domínio extracelular é rico em repetições de leucina. Seu domínio intracelular compartilha homologia com o receptor para interleucina-1 (IL1) e constitui a família de receptor Toll-IL1 (TIR). *Toll-like receptors* (TLRs) e receptores de interleucina-1 (IL-1) e interleucina-18 (IL-18) que ativam o fator de diferenciação mielóide 88 (MyD88), uma quinase que ativa a transdução do sinal intracelular (FALGARONE *et al.*, 2005).

Os macrófagos interagem diretamente com micro-organismos e produzem citocinas que ativam células vizinhas. Estas células expressam uma variedade de receptores como CD14 (um co-receptor para o LPS, rico em resíduos de leucina), receptores para manose, TLRs e receptores *scavenger*. A ligação de antígenos a esses receptores leva à ativação dos macrófagos, que fagocitam os micro-organismos, e à produção de citocinas como IL-1, TNF- $\alpha$  (Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$ ), GM-CSF (fator estimulador de colônia granulócito – macrófago), IL-12, IL-5 e IL-18, bem como quimiocinas (FALGARONE *et al.*, 2005).

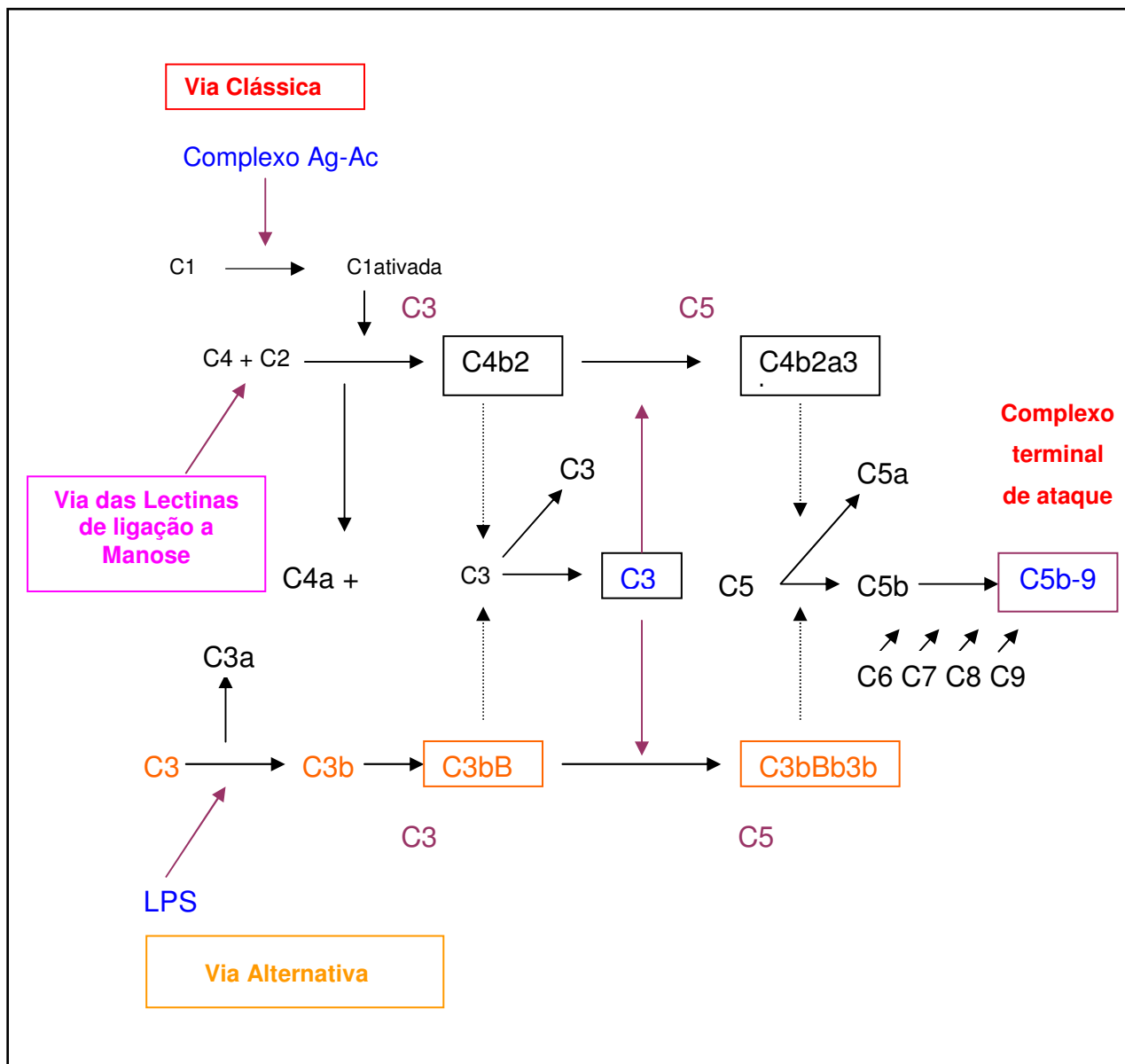
As células dendríticas estão presentes no tecido epitelial e seu papel é crucial na defesa do organismo na fagocitose de micro-organismos e apresentação de antígenos. Células dendríticas imaturas são consideradas “sentinelas” do organismo. Quando estimuladas por citocinas, tornam-se altamente efetivas na captura de antígenos por fagocitose, pinocitose ou endocitose. Estas células expressam moléculas co-

estimuladoras como os antígenos B7.1 e 2 (CD80 e 86, respectivamente), CD40 e antígenos do complexo de histocompatibilidade de classe II (MHC).

As moléculas do complexo de histocompatibilidade (MHC) são divididas em duas classes principais: as moléculas de classe I presente em todas as células do organismo, e as da classe II ou HLA classe II que são encontradas em células dendríticas, linfócitos B e macrófagos (ALI *et al.*, 1997). Os antígenos de classe II estimulam células TCD4+ e os de classe I as células CD8+ (FALGARONE *et al.*, 2005).

As células NK (*natural killer*) são derivadas da linhagem linfóide precursora de linfócitos T. A citocina IL-12 secretada por macrófagos é essencial para ativação desta célula. Diferente das células T, os receptores das células NK não são diversificados e não reconhecem antígenos específicos. Seus receptores são do tipo Ig (KIR ou *killer Ig-like receptor*) e reconhecem moléculas do MHC de classe I. Este reconhecimento inibe a produção de perforinas. Porém, quando não ocorre reconhecimento das moléculas MHC de classe I, o que tipicamente ocorre em células infectadas por vírus ou células tumorais, as células NK secretam moléculas formadoras de poro (perforina), que se polimerizam na membrana da célula alvo formando um poro onde entram várias substâncias, como as granzimas citotóxicas (serino-proteases). As células NK também possuem um papel imunoregulador, uma vez que produzem as citocinas TNF- $\alpha$  (Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$ ) e INF- $\gamma$  (Interferon- $\gamma$ ), que atuam ativando macrófagos a fagocitar os patógenos intracelulares e restos celulares (BASSET *et al.*, 2003).

Os componentes moleculares da resposta inata são as proteínas da cascata de complemento, proteínas de fase aguda e citocinas (McNEELA & MILLS, 2001). O sistema complemento possui diferentes e importantes funções na defesa imune inata e consistem de um mínimo de 20 glicoproteínas do soro, algumas de caráter regulatório. Estas proteínas são ativadas em cascatas (Figura 03), e compreendem três vias diferentes de ativação: a via clássica, iniciada a partir de uma interação antígeno-anticorpo; uma via alternativa, ativada pela presença de lipopolissacarídeos (LPS) de fungos e bactérias *gram* negativas; e uma via identificada como via das lectinas de ligação a mananas, independente da proteína C1 do complemento, que é estimulada pela manose contida em glicoconjugados e carboidratos da parede celular de vírus, bactérias e fungos (PARKIN & COHEN, 2001).



**Figura 03** - Vias da cascata de sistema complemento. Quando C1 liga-se ao complexo antígeno-anticorpo desenvolve sua atividade catalítica, clivando os componentes C4 e C2 para gerar C3 convertase e subsequentemente C5 convertase. A via alternativa não envolve C1, C2, ou C4. O LPS e outros produtos virais ou bacterianos iniciam a cascata clivando o C3. O fator B se liga ao C3b, formando o complexo C3bBb que age como C3 convertase nesta via. As duas vias convergem na formação do complexo C5b-9, que é capaz de romper a membrana bacteriana. O C3b ligado à membrana do micro-organismo (opsonização) também pode ser reconhecido por células fagocíticas, sendo então endocitado. Os fatores C3a, C4a e C5a atuam estimulando a liberação de mediadores inflamatórios. O C5a atua também como potente agente quimiotático para neutrófilos.

As citocinas têm papel crucial na resposta imune podendo aumentar ou diminuir a resposta inflamatória ou adaptativa. Até o momento, mais de 100 membros da família das citocinas e seus receptores específicos foram identificados. Podem ser classificadas como pró ou anti-inflamatórias, podendo estar envolvidas na resposta inflamatória aguda (IL-1, TNF $\alpha$ , IL-6, e Interferons [INF]  $\alpha$  e  $\beta$ ) ou atuar como reguladoras da resposta imune efetora (INF $\gamma$ , TGF $\beta$ , IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-15 e IL-18). As

citocinas são mediadoras entre a resposta imune inata e a resposta imune adquirida (FALGARONE *et al.*, 2005).

### **2.2.2- Mecanismo de defesa adaptativa (resposta imune adquirida)**

A produção de citocinas na fase inflamatória da resposta imune inata atua como sinalização para a resposta imune adquirida, que é caracterizada por ser dependente da apresentação do antígeno a linfócitos T e B, ativando-os (MURTAUGH & FOSS, 2003). A resposta imune adquirida envolve tanto mediadores humorais (anticorpos) como celulares, e geralmente é desenvolvida após a infecção estar estabelecida, sendo mais eficiente na prevenção de uma re-infecção através de um mecanismo denominado de memória imunológica. A indução de uma potente resposta de memória de uma célula B e T são à base da vacinação (DELVES & ROITT, 2000a; DELVES & ROITT, 2000b; McNEELA & MILLS, 2001).

A resposta imune adquirida pode ser dividida em resposta imune humoral, relacionada à produção de anticorpos, e resposta imune celular, relacionada à atividade de linfócitos T.

#### **2.2.2.1 Mecanismo de defesa adaptativa: resposta imune humoral**

É mediada por anticorpos (imunoglobulinas) produzidos por linfócitos B. Estes anticorpos são constituídos por duas cadeias idênticas pesadas, podendo ser do tipo  $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\alpha$  ou  $\epsilon$  e duas cadeias leves do tipo  $\kappa$  ou  $\lambda$ , unidas por pontes dissulfeto. A porção N-terminal de cada cadeia contém um domínio variável de ligação ao antígeno. No domínio C-terminal das cadeias leves e pesadas estão as regiões constantes. Existem cinco classes de imunoglobulinas (Ig): IgA, IgM, IgD, IgG e IgE. A função destes anticorpos é neutralizar toxinas, prevenir a aderência de micro-organismos às mucosas, ativar o sistema complemento, opsonizar bactérias para fagocitose e sinalizar células tumorais e infectadas para reconhecimento por células NK (CLARK & KUPPER, 2005).

Além da secreção de anticorpos, o linfócito B também atua como célula apresentadora de antígeno, pois esta célula é capaz de internalizar o antígeno, processá-lo e apresentá-lo a linfócitos T  $CD4^+$  via molécula de MHC classe II (CLARK & KUPPER, 2005).



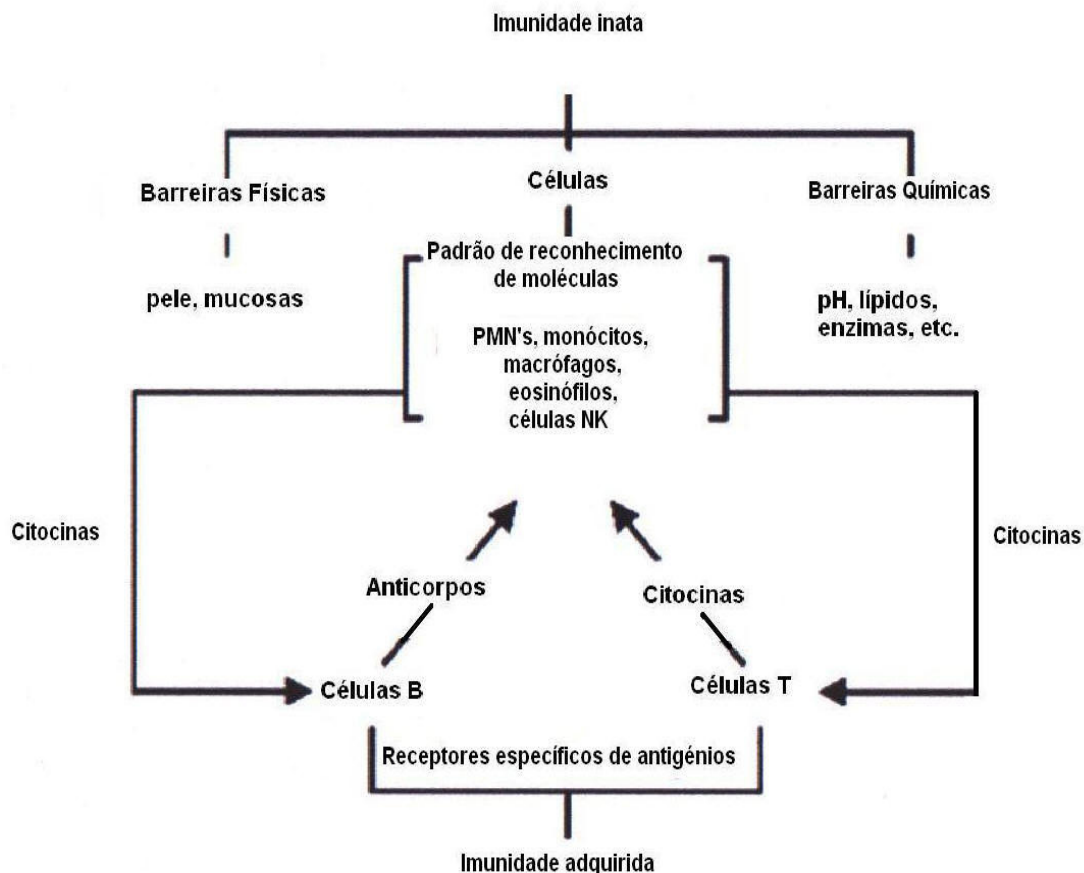
Os linfócitos B possuem moléculas de IgM e IgD ligadas à superfície da membrana, atuando como moléculas de reconhecimento de antígenos. A ligação destes anticorpos a antígenos, como proteínas, carboidratos ou grupos químicos simples leva a ativação dos linfócitos desta classe (DELVES & ROITT, 2000b). Quando ocorre uma re-infecção pelo mesmo antígeno, os linfócitos B podem ser ativados por células dendríticas foliculares, que formam complexos ao aprisionarem o antígeno a produtos do complemento ou anticorpos, apresentando ao linfócito B, ativando-os, gerando uma resposta de memória (pois apenas linfócitos B antígeno-específico serão ativados) (PARKIN & COHEN, 2001).

#### 2.2.2.2 Mecanismo de defesa adaptativa: resposta imune celular

A resposta imune celular é mediada por células T, que se dividem em duas classes: as células T auxiliares e as células T citotóxicas. Estes linfócitos podem ser diferenciados por expressar em sua membrana proteínas CD4 (T auxiliares) e CD8 (T citotóxico). Estas células também reconhecem tipos de MHC específicos: a célula T auxiliar reconhece antígenos MHC classe II enquanto as células T citotóxicas reconhecem antígenos ligados ao MHC classe I. O receptor do antígeno em linfócitos T é denominado TCR (receptor de célula T) (DELVES & ROITT, 2000a; DELVES & ROITT, 2000b; McNEELA & MILLS, 2001).

As células T CD4<sup>+</sup> respondem a antígenos apresentados por células apresentadoras de antígeno, que compreendem os macrófagos, células dendríticas interdigitantes e linfócitos B. As células T auxiliares subdividem-se em duas subpopulações denominadas Th1 ou Th2, diferenciadas por sua função e pelo tipo de citocina que secretam. Produtos de bactérias e vírus (incluindo lipopolissacarídeos ou LPS, DNA e RNA de bactérias) ativam células de resposta inata do sistema imune (incluindo macrófagos e células dendríticas), levando a produção de IL-18 ou IL-12, as quais induzem a diferenciação de células T precursoras ou “naive” para o subtipo Th1. As células Th1 secretam INF $\gamma$  e o fator de necrose tumoral  $\beta$  (TNF $\beta$ ) que medeiam a resposta imune celular, incluindo a ativação de macrófagos, reações de hipersensibilidade e resposta inflamatória. As células “naive” diferenciam-se no subtipo Th2 quando células dendríticas apresentam patógenos helmínticos, produtos alergênicos ou quando na presença de IL-4. Este estímulo também pode ocorrer devido à presença de proteínas recombinantes solúveis. Este subtipo de linfócito T auxiliar

secreta IL- 4, 5, 10, e 13 (McNEELA & MILLS, 2001). Em resumo podemos afirmar que os dois tipos de imunidade encontram-se relacionados e atuam em simultâneo, conforme esquema (Figura 04):



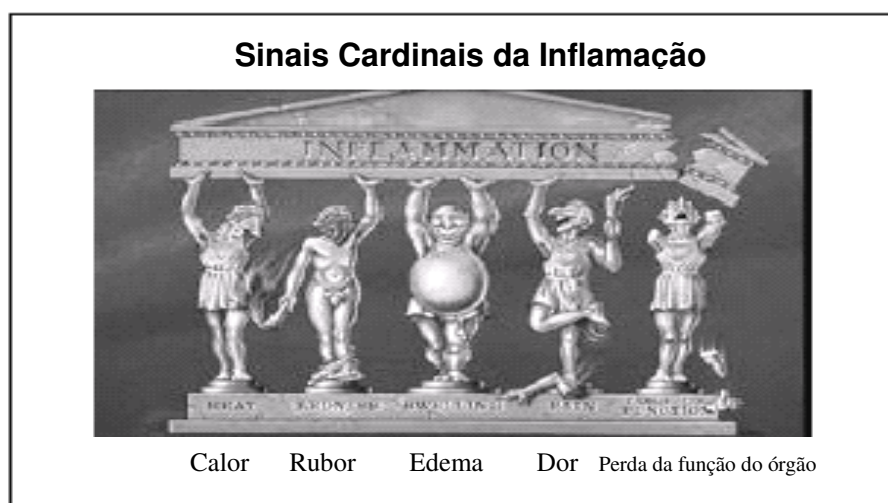
**Figura 04:** Ilustração esquemática que mostra a integração da resposta da imunidade inata e adquirida. Fonte: <http://cristiana7.blogspot.com>. Acesso em 29/07/2008.

### 2.3- INFLAMAÇÃO

A inflamação ou flogose (derivado de “flogístico” que, em grego, significa “queimar”) é a reação dos tecidos a uma agressão, que, portanto, perderam sua homeostase e morfostase (BOGLIOLO, 2000).

A inflamação é a resposta do sistema imune aos danos causados às suas células e tecidos vascularizados por patógenos, como vírus e bactérias, assim como por injúrias químicas ou físicas. O processo inflamatório tem sido intensamente investigado desde o início da era cristã, quando Celsus (30 a.C. - 36 d.C.) definiu os quatro sinais principais ou cardeais da inflamação (rubor, tumor, calor e dor). A estes sinais Galeno, médico no século XIX, acrescentou um quinto sinal, a perda de função da área afetada

(WANNMACHER; FERREIRA, 2004); como mostra a figura 05. A vermelhidão (rubor) e calor são resultantes do aumento do fluxo sanguíneo local, sendo que, o rubor ou eritema é produzido por uma intensa dilatação arteriolar, onde nesse processo, contribuem decisivamente dois mediadores: as prostaglandinas (PGE<sub>2</sub>) e prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) que são vasodilatadores (BOGLIOLO, 2000; COTRAN, 2001; RANG *et al*, 1993). O calor é um super aquecimento dos tecidos inflamados, provocados pela prostaglandina (PGE<sub>2</sub>) liberada ou pelo metabólito resultante de uma via metabólica (RANG *et al*, 1993; BOGLIOLO, 2000; COTRAN, 2001). O edema é devido a uma dilatação vascular, com o surgimento, também, de fendas no endotélio vascular, as quais não só facilitam migração dos leucócitos para o espaço extravascular como também a saída de elementos do sangue (plasma) do vaso (RANG *et al*, 1993; BOGLIOLO, 2000; COTRAN, 2001). Na dor os metabólitos do ácido araquidônico liberados no processo inflamatório têm um efeito hipersensibilizante nos receptores da dor (RANG *et al*, 1993; BOGLIOLO, 2000; COTRAN, 2001) com consequente ativação e sensibilização de fibras nervosas aferentes primárias. Caso não haja resolução do processo, pode ocorrer a formação de um quinto sinal: a perda da função do órgão (LAWRENCE *et al.*, 2002, SHERWOOD & TOLIVER-KINSKY, 2004). A perda da função, o quinto sinal da inflamação, é muito importante, pois torna o organismo mais vulnerável a infecções e impede o desempenho das atividades normais do paciente, prejudicando assim a sua qualidade de vida (RANG *et al*, 1993; BOGLIOLO, 2000; COTRAN, 2001).

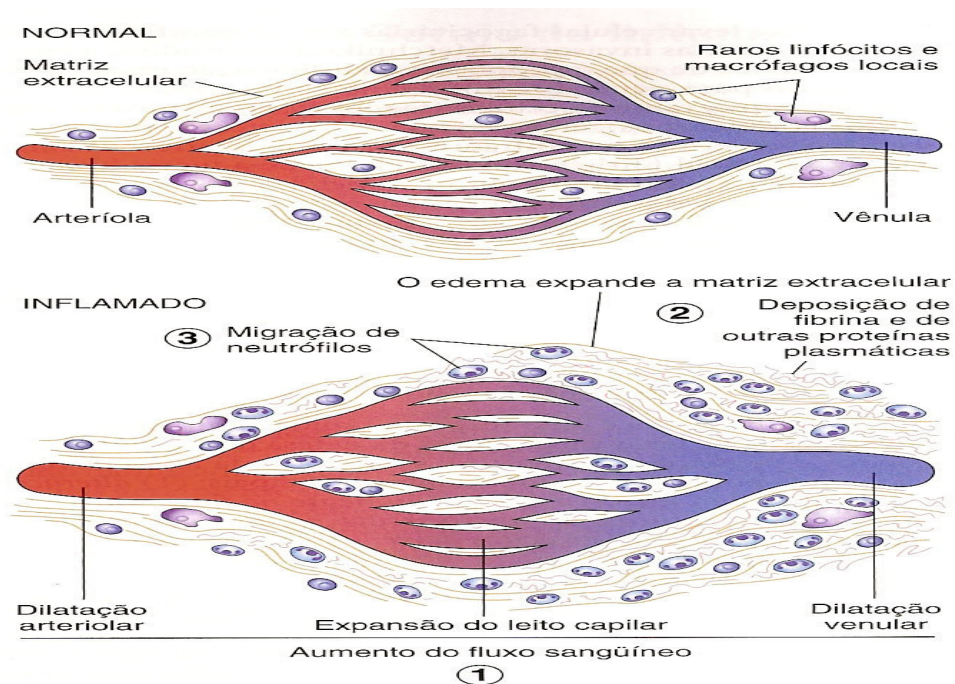


**Figura 05** - Sinais cardinais da inflamação (adaptado de Lawrence *et al.*, 2004).

As alterações que ocorrem nos tecidos no processo inflamatório podem ser divididas em eventos vasculares e celulares. Os eventos vasculares se iniciam imediatamente após o estímulo inflamatório, caracterizando-se por vasodilatação, aumento do fluxo sanguíneo para o local inflamado e da permeabilidade microvascular, resultando na perda de fluidos e proteínas para o tecido adjacente. Concomitantemente, ocorre um aumento na expressão de moléculas de adesão pelas células endoteliais e liberação de substâncias quimioatraentes (REIS, 2006).

Estes efeitos resultam da ação de mediadores inflamatórios, como a bradicinina, histamina, citocinas, fatores do complemento, óxido nítrico e prostaglandinas, sintetizados localmente ou por células que migraram para o sítio inflamatório. Os eventos celulares, iniciados algumas horas após o estímulo inflamatório, consistem na migração de leucócitos até o local da injúria, inicialmente, neutrófilos e, posteriormente, monócitos, que se diferencia em macrófagos, que irão fagocitar corpos estranhos e restos celulares, conforme figura 06, que evidencia a diferenciação entre um tecido normal e um inflamado. Estas células secretam enzimas proteolíticas e geram espécies reativas de oxigênio (ROS) que irão atuar sobre os micro-organismos invasores (SMITH *et al.*, 1998; LAWRENCE *et al.*, 2002).

Finalmente, o estímulo nocivo cessa e a estrutura e função do tecido normal é restaurada. Caso a inflamação não se resolva, linfócitos, macrófagos e plasmócitos tomam parte no processo inflamatório, o que caracteriza a fase crônica (REIS, 2006).



**Figura 06:** As primeiras manifestações locais da inflamação aguda comparadas com o tecido normal. (1) Vasodilatação e aumento do fluxo sanguíneo (causando eritema e calor). (2) Extravasamento e deposição de plasma e proteínas (edema). (3) Migração e acúmulo de leucócitos no local da lesão (Adaptado de KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

### 2.3.1 A função das células inflamatórias

O neutrófilo é o primeiro tipo celular a migrar para o sítio inflamatório onde se acumulam e contribuem para fase inicial da resposta inflamatória (CADIEUX *et al.*, 2005). O processo de migração de neutrófilos para o espaço extravascular é dividido em etapas distintas que compreendem: marginação, rolamento, adesão e diapedese. Sua migração e ativação durante a resposta inflamatória resultam de vários eventos, dentre eles, a liberação de substâncias quimioatraentes por células residentes. Estas substâncias são moléculas solúveis como produtos de bactérias (LPS e peptídeos N-formilados), componentes do complemento e quimiocinas. Tem sido demonstrado que durante a inflamação, macrófagos, mastócitos e/ou linfócitos controlam o influxo de neutrófilos pelo aumento da liberação de citocinas, quimiocinas como a IL-8 ou leucotrieno B<sub>4</sub> (LEUNGE *et al.*, 2001, RAMOS *et al.*, 2003, SHERWOOD & TOLIVER-KINSKY, 2004).

As quimiocinas (proteínas quimiotáticas) são uma família de proteínas (8-10 kDa) que tem um papel crucial na inflamação devido a sua habilidade de induzir migração e ativação de leucócitos específicos. Estas quimiocinas são subdivididas em quatro subfamílias (Quadro 03), de acordo com a posição de um ou dois resíduos de

cisteína (C) na posição N-terminal: C (linfotactina), CC (MIP-1 $\alpha$ , MCP-1,2, e 3, RANTES, eotaxina, PARC/DC-CK1), CXC (IL-8, CINC-1, MIP-2, NAP-2, GRO- $\alpha$ , IP-10 e MIG) e CX<sub>3</sub>C (fraquitalquina). As quimiocinas do tipo CXC são subdivididas pela presença ou não da sequência ELR (ácido glutâmico, leucina e arginina) que precede a CXC no N-terminal. As citocinas que possuem o domínio ELR-CXC (GRO  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , ENA-78, IL-8) estimulam o recrutamento de neutrófilos (RAMOS *et al.*, 2003).

Quimiocina	Tipo celular recrutado
C	Linfócitos
CC	Células mononucleares e eosinófilos
CXC	Linfócitos
CXC-ELR	Neutrófilos
CCX <sub>3</sub> C	Monócitos, células T e NK

**Quadro 03** - Tipos de quimiocinas e células que recrutam (adaptado de Ramos *et al.*, 2003.)

As moléculas de adesão medeiam o contato entre duas células ou destas com a matriz extracelular. Elas são essenciais para a morfogênese e organização de tecidos e órgãos e regulação da função celular, e podem ser classificadas em famílias, baseando-se em suas características moleculares comuns (revisado por HENRICKS & NIJKAMP, 1998).

As interações adesivas que permitem o rolamento dos leucócitos são facilitadas pelas selectinas e seus ligantes (LUSTER *et al.*, 2005). As selectinas consistem em uma família de glicoproteínas expressas em leucócitos (L-selectina), células endoteliais (E-selectina) e plaquetas (P-selectina), e se ligam a determinados carboidratos sinalizados nas células adjacentes (ROSEN, 1993; ALON *et al.*, 1996). As L-selectinas se ligam através de seu domínio lectínico aos oligossacarídeos que apresentam porções siálicas (por exemplo: moléculas de *Sialil-Lewis X*) que estão presentes na superfície do endotélio. Para que ocorra a adesão firme do leucócito ao endotélio ocorrendo o “*Shedding*” de L-selectina, passando o leucócito a expressar em sua superfície moléculas de integrina, responsáveis pela interação de alta afinidade conhecida como aderência. Estas integrinas se ligam as moléculas de adesão celular da família das imunoglobulinas (ICAMs – *intercellular-adhesion-molecules*) expressas na superfície do endotélio ativado. A continuação da migração requer ciclos de adesão e

desligamento, até que ocorra a diapedese do leucócito (revisado por WORTHYLAKE & BURRIDGE, 2001).

As forças combinadas da interação ligante-selectina e a força do fluxo vascular promovem o rolamento dos neutrófilos. Com o progresso do rolamento, uma interação de alta afinidade, conhecida como aderência, desenvolve-se. A aderência é necessária para a subsequente diapedese e quimiotaxia do neutrófilo, e é mediada pela ação das integrinas e seus ligantes (SHERWOOD & TOLIVER-KINSKY, 2004). O processo de migração de leucócitos para o sítio inflamatório se apresenta na figura 07.

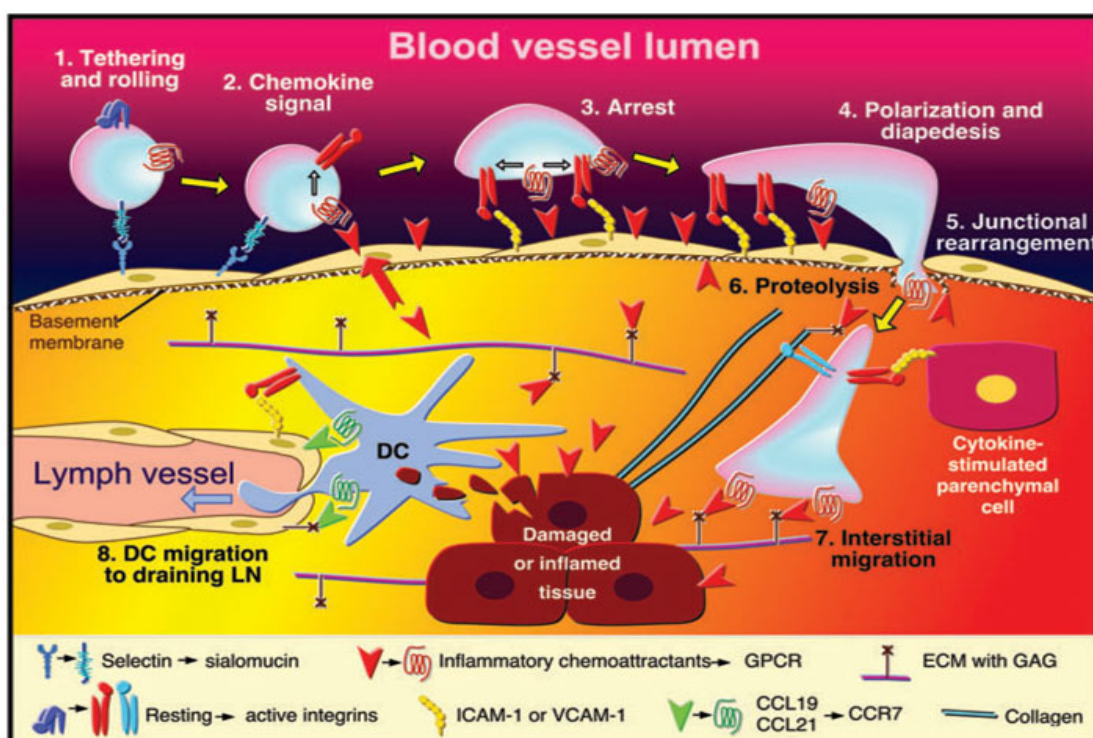


Figura 07: Etapas principais da migração de células imunes no local da inflamação (Luster *et al.*, 2005).

As integrinas fazem parte de uma família de proteínas heterodiméricas compostas das subunidades alfa e beta. As integrinas beta-2 são as mais amplamente estudadas e compreendidas. Estas moléculas são compostas de subunidades alfa distintas (CD11a, CD11b e CD11c) que são ligadas a uma subunidade beta em comum (CD18) (GRANGER & KUBES, 1994). As integrinas beta-2 são expressas na superfície de neutrófilos e interagem com ligantes, particularmente ICAM-1, que estão presentes na membrana das células endoteliais. Estas interações causam uma forte aderência do neutrófilo no endotélio e facilitam a diapedese e a quimiotaxia. As integrinas beta-2 e ICAMs estão constitutivamente presentes na superfície dos

neutrófilos e células endoteliais, mas sua expressão é aumentada durante os períodos de inflamação, o qual promove a transição do rolamento para a aderência (CARLOS & HARLAN, 1990).

A partir da aderência, o neutrófilo deve penetrar o endotélio e a membrana basal para entrar no ambiente extravascular inflamado. Os neutrófilos passam através das junções das células endoteliais, um processo que é parcialmente facilitado pela retração endotelial (DEL MASCHIO *et al.*, 1996). A PECAM-1 facilita a diapedese ao diminuir a adesão do neutrófilo ao ICAM-1 e está presente nas superfícies laterais de células endoteliais e de neutrófilos, mediando a ligação do neutrófilo ao endotélio e deste ao CD31 em neutrófilos. O processo do rolamento, aderência e diapedese são mediados através de complexas interações entre moléculas de adesão em neutrófilos e células endoteliais (SHERWOOD & TOLIVER-KINSKY, 2004).

Ao chegarem ao sítio inflamatório, os neutrófilos fagocitam os microorganismos opsonizados (C3b) e desgranulam-se liberando enzimas lisossomais, além de radicais livres e antagonistas da IL-1 com o objetivo de bloquear a infecção. Os macrófagos também tomam parte deste processo, atuando na fagocitose do antígeno e liberando diversos mediadores, como citocinas, radicais livres, óxido nítrico, enzimas, eicosanoides, entre outros, de grande importância no processo inflamatório. Quando a inflamação não é contida pela atividade de neutrófilos, macrófagos e células T são “recrutados” levando a formação de um processo inflamatório crônico. Este processo é caracterizado pela infiltração de células mononucleares, destruição tecidual e substituição do tecido lesado por tecido conjuntivo, com proliferação de pequenos vasos sanguíneos e fibrose (DELVES & ROITT, 2000a; DELVES & ROITT, 2000b, revisado por FALGARONE *et al.*, 2005).

## **2.3.2 Mediadores Inflamatórios**

### **2.3.2.1 Derivados do ácido araquidônico (AA)**

O ácido araquidônico (ácido 5,8,11,14-eicosatetraenóico) é um ácido graxo poliinsaturado de 20 átomos de carbono, cuja cadeia possui quatro ligações duplas. São encontrados na membrana plasmática, sendo um componente de grande importância para a fluidez da membrana. As duplas ligações deste fosfolípídio são sítios comuns de



atuação de radicais livres, de enzimas como a ciclooxigenase (COX) e lipoxigenase (LOX) e do citocromo P450 (BRASH, 2001).

Em condições fisiológicas, uma fosfolipase  $\text{Ca}^{+2}$  independente (iPLA<sub>2</sub>) é a principal enzima relacionada a liberação de AA, porém sua função é a de remodelagem da membrana celular e para manutenção do equilíbrio homeostático do organismo, e não a de induzir a síntese de prostanóides. As moléculas de AA são reincorporadas, porém quando ocorre um aumento de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular, uma fosfolipase  $\text{Ca}^{+2}$  - dependente é ativada (cPLA<sub>2</sub>), atuando na posição *sn-2* do glicerol, liberando o AA, alterando o equilíbrio de liberação-captção, o que deixa o AA livre para ser metabolizado conforme mostra a figura 08 (FITZPATRICK & SOBERMAN, 2001).

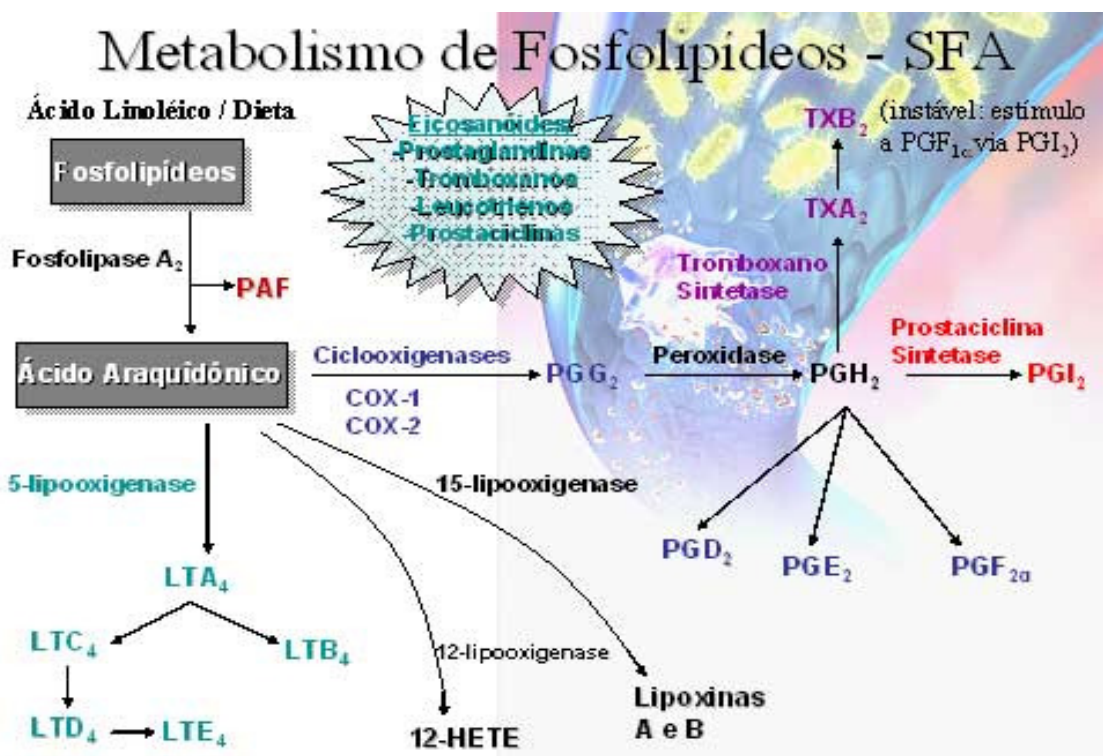
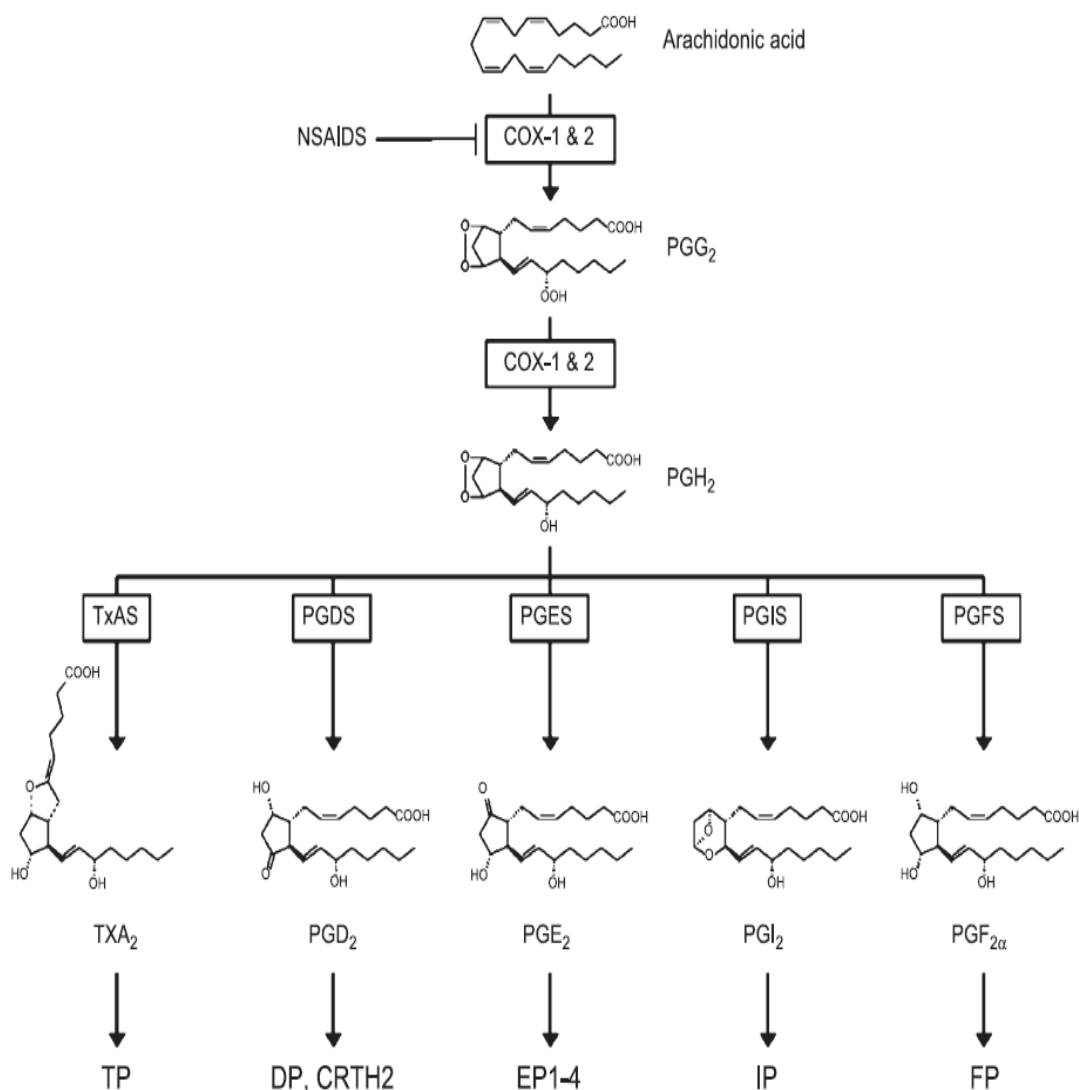


Figura 08: Desenho esquemático do metabolismo do ácido araquidônico. [http://www.sistemanervoso.com/images/pgc/iac\\_09.jpg](http://www.sistemanervoso.com/images/pgc/iac_09.jpg). Acesso em 29/07/2008.

#### 2.3.2.1.1 Via das Ciclooxigenases (COX)

O ácido araquidônico é alvo de metabolismo de enzimas prostaglandinas (PG) G/H sintases (PGHS, vulgarmente conhecidas como ciclooxigenases – COX), lipoxigenases e epoxigenases para a formação de produtos biologicamente ativos representados na figura 09.



**Figura 09** - Via das Ciclooxigenases: produtos finais e tipos de receptores aos quais se ligam (Hata & Breyer, 2004).

As enzimas COX são proteínas bifuncionais, pois possuem atividade ciclooxigenase e hidroxidase, catalisando a transformação do AA nos PG endoperóxidos, intermediários PGG<sub>2</sub> e PGH<sub>2</sub>. Estes sofrem ação de isomerases e sintases tendo como produtos finais PGs e tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>). Todos estes produtos vão agir via receptores ligados à proteína G (GROSSER *et al.*, 2006).

Existem dois tipos de COX: a COX-1 e a COX-2. A COX-1 é constitutivamente expressa em órgãos e tecidos, e atua formando mediadores que irão atuar em diversas funções homeostáticas, como a proteção do trato gastrointestinal, influenciando no fluxo renal e na agregação plaquetária. A COX-2 é expressa em resposta a estímulos inflamatórios, estímulos fisiológicos e fatores de crescimento, estando envolvida na

síntese de prostaglandinas que medeiam a dor e atuam no processo inflamatório. São expressas por macrófagos, sinoviócitos e células endoteliais (LIPSKY, 1999; DANNHARD & KIEFER, 2001).

Um terceiro tipo de COX (COX-3) tem sido descrito. Esta teria origem no RNAm da COX-1, que manteria o íntron 1. A diferença no número de aminoácidos é de 30-34, dependendo da espécie estudada (mamíferos). Os primeiros estudos mostraram que esta enzima é sensível a fármacos analgésicos e antipiréticos como o acetoaminofen, fenacetina e dipirona, e esta sensibilidade explicaria o efeito de fármacos não esteróides na dor e na febre (WARNER & MITCHEL, 2004).

Com relação aos produtos da COX, ambas as formas atuam formando PGG<sub>2</sub> (uma vez que haja AA disponíveis), que é reduzido ao endoperóxido instável PGH<sub>2</sub>. Este é substrato para outras enzimas que são responsáveis pela produção das cinco principais prostaglandinas bioativas: PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub>α, PGD<sub>2</sub> e PGI<sub>2</sub> (prostaciclina) e TXA<sub>2</sub> (HATA & BREYER, 2004). Estas atuam em seus receptores específicos na membrana plasmática da célula alvo (Figura 09): DP para PGD<sub>2</sub>, EP para PGE<sub>2</sub>, FP para PGF<sub>2</sub>α, IP para PGI<sub>2</sub> e TP para TXA<sub>2</sub> (WARNER & MITCHEL, 2004).

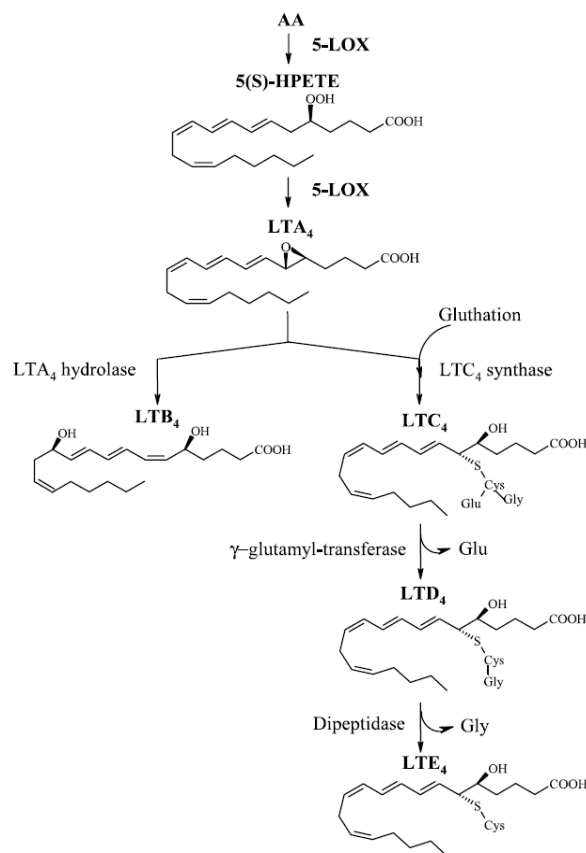
As prostaglandinas são potentes mediadores inflamatórios, podendo induzir febre, aumentar a sensibilidade à dor, e estimular numerosas funções celulares (VILLAREAL et al., 2001; CHARLIER & MICHAUX, 2003). Algumas das atividades biológicas dos produtos da via das COX estão descritas no quadro 04.

Atividade biológica dos produtos da COX						
PGs	Sistema Cardiovascular	Vias aéreas	Trato gastrointestinal	Rim	Trato Reprodutivo	Inflamação
PGD <sub>2</sub>	Vasodilatadora					
PGE <sub>2</sub>	Vasodilatadora	Broncodilatadora			Contração da musculatura uterina	Potente vasodilatadora
PGF <sub>2α</sub>		Broncoconstritora	Proteção da mucosa gástrica	Estímulo do fluxo renal e diurese	Contração da musculatura uterina	Febre, hiperalgesia
PGI <sub>2</sub>	Anticoagulante	Broncodilatadora	Proteção da mucosa gástrica	Estímulo do fluxo renal e diurese	Relaxamento da musculatura uterina	Potente vasodilatadora
TXA <sub>2</sub>	Vasoconstritora, agregante plaquetária	Broncoconstritora	Aumento da permeabilidade	Inibição do fluxo renal		

**Quadro 04** - Atividade biológica dos produtos da COX (Charlier & Michaux, 2003).

#### 2.3.2.1.2 Via das lipoxigenases

Os leucotrienos (LTs) constituem a segunda maior família de derivados do AA. Os LTs resultam da atividade da 5-lipoxigenase (5-LOX), como mostra a figura 10. A 5-LOX é uma enzima da família das peroxidases. Três enzimas foram observadas em seres humanos e são classificadas de acordo com a posição de oxigenação do AA: a 5-LOX, 12-LOX e 15-LOX, que inserem O<sub>2</sub> nas posições C5, C12 e C15 do AA, respectivamente e produzem os ácidos 5-, 12-, e 15-hidroperóxido eicosatetraenóico (HPETE) (CHARLIER & MICHAUX, 2003).



**Figura 10** - A cascata da 5-LOX (Charlier & Michaux, 2003).

A 5-LOX catalisa a oxidação do AA no C5 formando 5-HPETE, seguido da desidratação deste hidropéroxido, formando o LTA<sub>4</sub>. Este pode ser metabolizado à LTB<sub>4</sub>, reação catalisada pela LTA<sub>4</sub> hidrolase. A biossíntese do leucotrieno é dependente da enzima ativadora de 5-LOX (FLAP), uma proteína de membrana que se liga ao AA e facilita a ação da 5-LOX (RUNARSSON *et al.*, 2005).

O LTA<sub>4</sub> pode ainda ser conjugado a glutatona, formando LTC<sub>4</sub>. Este pode ser metabolizado a LTD<sub>4</sub> e LTE<sub>4</sub> pela eliminação sucessiva do ácido glutâmico e da glicina pela ação da γ-glutamil-transferase e uma dipeptidase específica, respectivamente mostrado na figura 10 (CHARLIER & MICHAUX, 2003). Os LTs são hormônios parácrinos e possuem diversos efeitos biológicos, mediados pela ligação a receptores específicos do tipo proteína G, denominados BLT<sub>1</sub> e BLT<sub>2</sub>. O primeiro tem grande afinidade pelo LTB<sub>4</sub> enquanto o segundo tem pouca, porém liga-se a outros eicosanóides.

O LTB<sub>4</sub> é um potente quimioatraente de neutrófilo e estimulador de adesão de leucócitos as células endoteliais. Outras ações do LTB<sub>4</sub> incluem a estimulação de IL-5 em linfócitos T, efeitos quimiotáticos em eosinófilos ativados pela IL-5, secreção de radical ânion superóxido por neutrófilos e efeitos antiapoptóticos em neutrófilos (OKUNO *et al.*, 2005).

#### 2.3.2.1.3 Via do CYP450 (P450)

A via das monooxigenases CYP450 gera a partir do AA ácidos epoxieicosatrienóicos (EETs), que são hidrolisados a ácidos diidroieicosatrienóicos (DHETs) e hidroxieicosatrienóicos (HETEs). Ocorre no cérebro, pulmão, fígado, em células vasculares periféricas, e em células vasculares e tubulares renais.

Estudos têm demonstrado que os derivados epóxi, produtos do P450, tem múltiplas atividades biológicas. Por exemplo, tem sido citada a atuação dos EETs na secreção de hormônios peptídicos, no tônus da musculatura vascular e bronquial, e sobre canais iônicos. Também estão relacionados à regulação da proliferação celular, inflamação, homeostase e em diversas vias de sinalização (ROMAN, 2002).

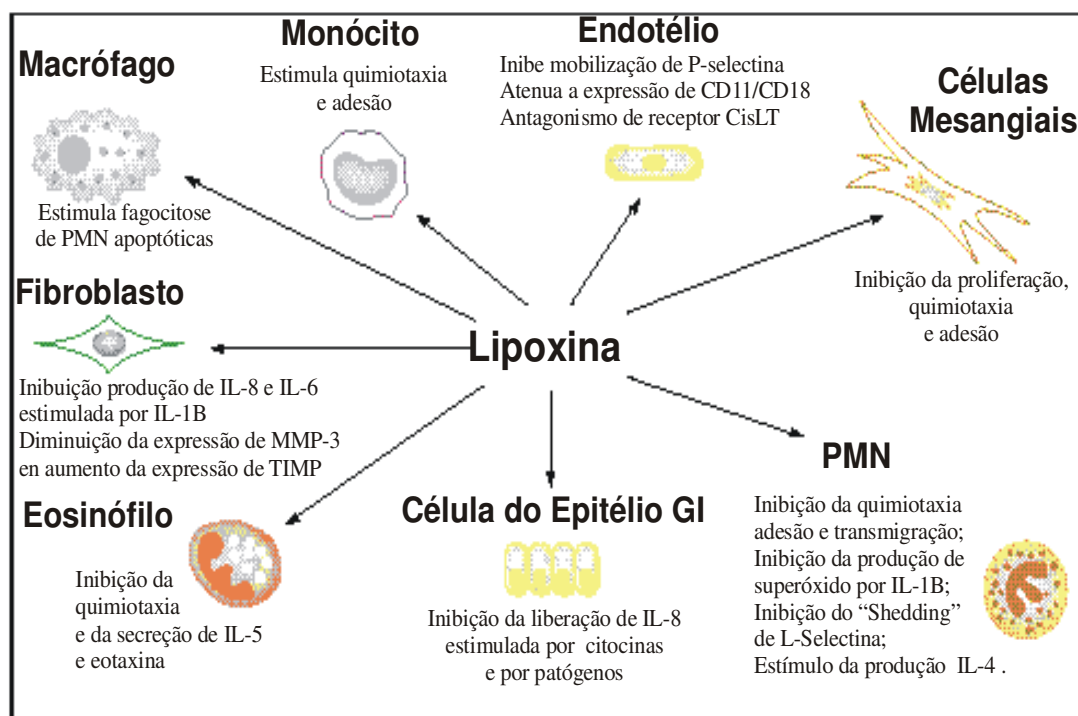
#### 2.3.2.1.4 Via dos mediadores lipídicos anti-inflamatórios

É bem conhecido que o tecido inflamado gera estímulos pró-inflamatórios para dirigir a inflamação aguda, mas há também uma produção local e sistêmica de mediadores endógenos que contrabalançam estes eventos pró-inflamatórios. Pesquisas recentes têm descoberto novos mediadores lipídicos anti-inflamatórios endógenos que possuem potentes efeitos imunomoduladores e anti-inflamatórios. Eles são as lipoxinas, as prostaglandinas ciclopentenonas (cyPGs), resolvinas e proteínas (SERHAN & SAVILL, 2005).

As lipoxinas são produtos do metabolismo transcelular de derivados do AA, gerados *in vivo* pela ação da lipoxigenase ou ação conjunta das enzimas lipoxigenase e ciclooxigenase, enquanto que as cyPGs são metabólitos espontâneos de prostaglandinas que são formadas pela ação da ciclooxigenase (LAWRENCE *et al.*, 2002).

A ativação da “via biossintética” das LXs ocorre quando polimorfonucleares (que expressam 5-LOX) interagem com células residentes no sítio inflamatório (que

expressam 15-LOX), ou seja, o AA sofre a ação de ambas as lipoxigenases, formando a LX. Uma segunda via de formação de LX é a interação de células de origem mielóide (5-LO) e plaquetas (12-LOX) (VACHIER *et al.*, 2002). Uma terceira via de síntese de lipoxina tem origem na terapia com baixas doses de aspirina, que acetila o sítio catalítico da COX-2, alterando a atividade de C20:4 para 15R-HETE, ao invés da formação de prostanóides. A atividade da 15-LO de leucócitos leva a formação de um análogo da LX, a 15-epi-lipoxina. As LXs atuam inibindo diversos sinais pró-inflamatórios, tais como a migração de neutrófilos e eosinófilos e estimulam a migração de monócitos, que podem levar resolução do processo e promover o reparo tecidual. Devido à baixa meia-vida das LX, estudos têm sido realizados com o objetivo de sintetizar análogos ativos (como o 16-(para-fluor)-fenoxi-LXA<sub>4</sub>), o que pode futuramente surgir como alternativa para o tratamento de inflamações (FIERRO & SEHRAN, 2001). O papel das LX está resumido na figura 11.



**Figura 11** - As principais ações biológicas das lipoxinas (LXs), lipoxinas aspirinas-ativadas (ATLs) e seus análogos estáveis em células específicas pertinentes a inflamação e sua resolução. As LXs inibem a ativação de neutrófilos polimorfonucleares (PMNs) e eosinófilos, e promovem o *clearance* de leucócitos apoptóticos por macrófagos no sítio inflamatório. Também foi demonstrado que as LXs alteram a expressão de citocinas e de moléculas de adesão que influenciam então a transmigração de leucócitos (adaptado de McMahon *et al.*, 2001).

A resolução da inflamação pode ser vista como um componente integral da inflamação aguda. Evidências recentes sugerem que um programa de resolução, ativo e coordenado, ocorre nas primeiras poucas horas após o início de uma resposta inflamatória. Depois de entrar no tecido, os granulócitos promovem a troca de prostaglandinas e leucotrienos por lipoxinas, que iniciam a sequência da resolução. O recrutamento de neutrófilos então cessa e a morte programada por apoptose inicia. Estes eventos coincidem com a biossíntese de resolvinas e protetinas, que encurtam criticamente o período de infiltração do neutrófilo por iniciar a apoptose. Consequentemente, os neutrófilos apoptóticos sofrem fagocitose por macrófagos, levando a limpeza do local e liberação de citocinas anti-inflamatórias, como o TGF- $\beta$ 1. O programa anti-inflamatório se finaliza com a saída dos macrófagos para os vasos linfáticos (SERHAN & SAVILL, 2005).

Entendendo estes mecanismos em mais detalhes podemos desenvolver drogas capazes de resolver os processos inflamatórios de uma forma direcionada e controlada (REIS, 2006).

#### 2.3.2.1.5 Fator de Ativação Plaquetária

O fator de ativação plaquetária (PAF) é um derivado do AA (liso-gliceril-fosforilcolina) que possui receptores específicos nas células e atua no processo inflamatório como vasodilatador, aumentando a permeabilidade vascular, como fator quimioatraente para leucócitos, principalmente eosinófilos, ativando a cascata de agregação plaquetária e é espasmogênico para musculatura lisa (PRESCOTT *et al.*, 2000).

#### 2.3.2.2 Óxido nítrico

Em 1980, Furchgott descobriu um fator liberado das células endoteliais que causava vasodilatação, e que anteriormente era denominado fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF) (PALMER *et al.*, 1997). O fator tratava-se do óxido nítrico (NO), um gás solúvel, produzido não apenas por células endoteliais, mas também por macrófagos e neurônios específicos no cérebro, atuando de maneira parácrina sobre células-alvo (ROBBINS *et al.*, 2000). Este é formado pela clivagem do aminoácido essencial L-arginina, formando NO e L-citrulina (MONCADA *et al.*, 1991).



O NO está envolvido nos processos fisiológicos de vasodilatação, neurotransmissão e inflamação. É gerado pela atividade da enzima óxido nítrico sintase (NOS) que pode ser encontrada em três isoformas, sendo uma induzida e duas constitutivas (MONCADA, 1993; BREDT & SNYDER, 1994). A óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), é dependente de cálcio e é expressa constitutivamente por células endoteliais e não-endoteliais; a óxido nítrico sintase neuronal (nONS) também é expressa constitutivamente e é predominantemente encontrada em tecido neural; e a óxido nítrico sintase induzida (iNOS) é induzida por lipopolissacarídeo de bactéria ou citocinas como, por exemplo, fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) (ROBBINS & GRISHAM, 1997; BRED & SNYDER, 1994).

É proposta uma diversidade de atividades biológicas para este gás e bem estabilizado o papel do oxido nítrico no endotélio vascular que medeia o relaxamento da musculatura vascular pelo aumento da formação de monofosfato de guanilato ciclase. No cérebro este atua como neurotransmissor mediando a ativação de glutamato (MONCADA *et al*, 1991). Em processo inflamatório o NO modula reação inflamatória aguda e crônica e outros processos do sistema imunológico (GOODWIN *et al.*, 1999), como por exemplo, a sua atividade antimicrobiana e citotóxica quando liberado por macrófagos (MONCADA *at al.*, 1991; LASKIN & LASKIN, 2001).

Nas reações biológicas a enzima NOS tende sempre a produzir complexos químicos mais estáveis, como a formação de próxido nítrico, grupos tióis em proteínas e a nitração de resíduos de tirosina em proteínas, com o intuito de diminuir a toxidade dentro da célula (BRED & SNYDER, 1994; MONCADA *et al.*, 1991).

Os produtos finais da formação do NO *in vivo* são o nitrito (NO<sub>2</sub>) e o nitrato (NO<sub>3</sub>). A proporção de NO<sub>2</sub> é encontrado no meio reacional em quantidade suficiente para ratificar a presença de NO (MARLETTA, 1993). A formação de espécies reativa de nitrogênio é importante na determinação das atividades anti-inflamatórias e inflamatórias do óxido nítrico (SAUTEBIN, 2000). Como exemplo para esta interação, Asanuma e colaboradores (2001), verificaram que os radicais de NO podem ativar COX-1 e COX-2 aumentando a produção de prostaglandina que pode agravar processos inflamatórios.

O óxido nítrico (NO) é um gás simples e instável com meia vida de alguns poucos segundos (IGNARRO, 1990). O óxido nítrico e seus derivados, nitrito e peroxinitrito, são importantes agentes pró-inflamatórios. As medidas do NO e seus derivados, assim como, o estudo da síntese induzível de óxido nítrico, são índices úteis para avaliação da inflamação e para o acompanhamento da resposta terapêutica às drogas anti-inflamatórias (COSTA *et al.*, 1999).

#### 2.3.2.3 Histamina

A histamina é uma amina básica armazenada em grânulos nos mastócitos e basófilos. É secretada quando componentes do complemento C3a e C5a reagem com receptores nas células, ou quando antígenos interagem com a IgE fixada às células. Seu papel no processo inflamatório é contribuir com a vermelhidão, inchaço, calor e dor local. Estimula também a expressão de moléculas de adesão no endotélio (VILLARREAL *et al.*, 2001).

#### 2.3.2.4 Serotonina (5-hidroxitriptamina)

Esta substância é encontrada na parede intestinal, no sangue e no sistema nervoso central (SNC), atuando principalmente como neurotransmissor e como potente vasodilatador. Em resposta ao estímulo inflamatório, que irá ativar plaquetas, a serotonina é liberada na circulação, e, juntamente com outros mediadores, irá estimular a vasodilatação (MALININ *et al.*, 2004).

#### 2.3.2.5 Cininas

As cininas (bradicinina e calidina) são formadas por cininogênios de alto e baixo peso molecular pela ação da serino-proteases calicreína. Uma vez liberados estes peptídeos são rapidamente degradados por um grupo de enzimas denominadas “cininases”.

A bradicinina é um nanopeptídeo que possui dois receptores: B1 e B2, sendo o receptor do tipo 2 o mais investigado. Este é expresso constitutivamente no organismo, mediando a maioria dos efeitos biológicos da bradicinina. Já os receptores do tipo 1 são seletivos para os metabólitos des-arg-bradicinina e des-arg-calidina e sua expressão

ocorre rapidamente em condições patológicas ou em resposta a agentes pró-inflamatórios (LPS e citocinas).

As cininas modulam a maioria dos eventos observados no processo inflamatório incluindo a vasodilatação, o aumento da permeabilidade vascular, o extravasamento de plasma, a migração celular, também a dor e a hiperalgesia (CALIXTO *et al.*, 2000).

#### 2.3.2.6 - Adenosina deaminase: Um mediador enzimático

A adenosina deaminase (*adenosine amino hydrolase, EC 3.5.4.4.*) é uma enzima encontrada em muitos tecidos de mamíferos, está envolvida no metabolismo de bases púricas, capaz de catalisar a desaminação da adenosina, formando inosina como produto (FOX & KELLEY, 1978; RODRIGUES *et al.*, 1994).

Pacientes com deficiência na produção de adenosina deaminase (ADA) desenvolvem uma imunodeficiência combinada (GIBLETT *et al.*, 1972). Ambas as respostas imunes, humoral e celular, destes pacientes com severa deficiência imunodepressora, apresentam uma diminuição do número de linfócitos no sangue periférico (WARA & AMMANN, 1975). Sua participação na proliferação de linfócitos foi bem demonstrada por Hovi e colaboradores (1976), que expôs linfócitos normais do sangue periférico de humanos a um agente mitogênico em comparação com o efeito da coformicina, um potente inibidor da ADA. Com isso, observou-se a diminuição na proliferação de linfócitos nas culturas tratadas com coformicina, que não responderam ao agente mitogênico, em contraste com o aumento da atividade enzimática provocada pelo agente mitogênico sem tratamento com coformicina, comprovando sua importância na resposta mitogênica e antigênica de linfócitos (HOVI *et al.*, 1976). A ADA, também, catalisa a desaminação de diversos outros nucleosídeos de adenina, e tem sido utilizado comumente como mediador da resposta imune (MURPHY *et al.*, 1982).

#### 2.3.2.7 Fatores Derivados do Plasma: Cascata de Coagulação e Sistema Complemento

A cascata de coagulação é ativada durante a injúria do tecido e infecção. É dividida em duas vias (intrínseca e extrínseca) que convergem levando a ativação de trombina com a subsequente clivagem de fibrinogênio em fibrina. A ativação da cascata de coagulação não é apenas importante na formação do coágulo, mas tem importantes efeitos na resposta pró-inflamatória. A trombina e o complexo fator tecidual – VIIa

podem induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$  por células endoteliais e mononucleares. Portanto, a inflamação aguda causa ativação da cascata de coagulação, a qual pode potencializar a resposta inflamatória (SHERWOOD & TOLIVER-KINSKY, 2004).

O sistema complemento consiste de aproximadamente 20 proteínas solúveis interativas, produzidas principalmente pelo fígado, que circulam no sangue e nos fluidos extracelulares. Os componentes iniciais do complemento são ativados primeiro. Existem três grupos de componentes do complemento, pertencentes a três vias distintas de ativação do complemento – a via clássica, a via de lectina e a via alternativa. Os componentes iniciais do complemento das três vias atuam localmente para ativar C3, que é o componente-chave do sistema complemento. A via clássica é ativada por molécula de anticorpo tipo IgG ou IgM ligadas à superfície do antígeno. A lectina de ligação com manose (*Mannan-binding lectin*), a proteína que inicia a segunda via de ativação do complemento, é uma proteína sérica que forma *clusters* de seis unidades globulares passíveis de ligação com carboidratos, reunidas em torno de uma haste central semelhante ao colágeno. Este arranjo liga-se especificamente a resíduos de manose e de fucose da parede celular da bactéria, os quais apresentam espaçamento e orientação tais que permitem um encaixe perfeito dos seis sítios de ligação com carboidratos, fornecendo um excelente exemplo de receptor de reconhecimento de padrões. Na via alternativa, o C3 é espontaneamente ativado em baixos níveis, e o C3b resultante adere covalentemente tanto às células hospedeiras quanto ao patógeno (ALBERT *et al.*, 2004), conforme demonstrado na figura 03.

O sistema complemento, como anteriormente citado, os fragmentos C3a e C5a são anafilotoxinas que agem no aumento da permeabilidade vascular causando a liberação de mediadores por mastócitos. Além disso, fragmento C5a tem atividade quimiotática para neutrófilos (BEUTLER, 2004).

#### 2.3.2.8 Citocinas

As citocinas são peptídeos ou glicoproteínas secretadas que coordenam as atividades de várias células envolvidas na resposta inflamatória. As citocinas são sintetizadas por diversos tipos celulares, dentre eles fibroblastos residentes, células endoteliais e epiteliais, células dendríticas, NK, linfócitos T, sendo que

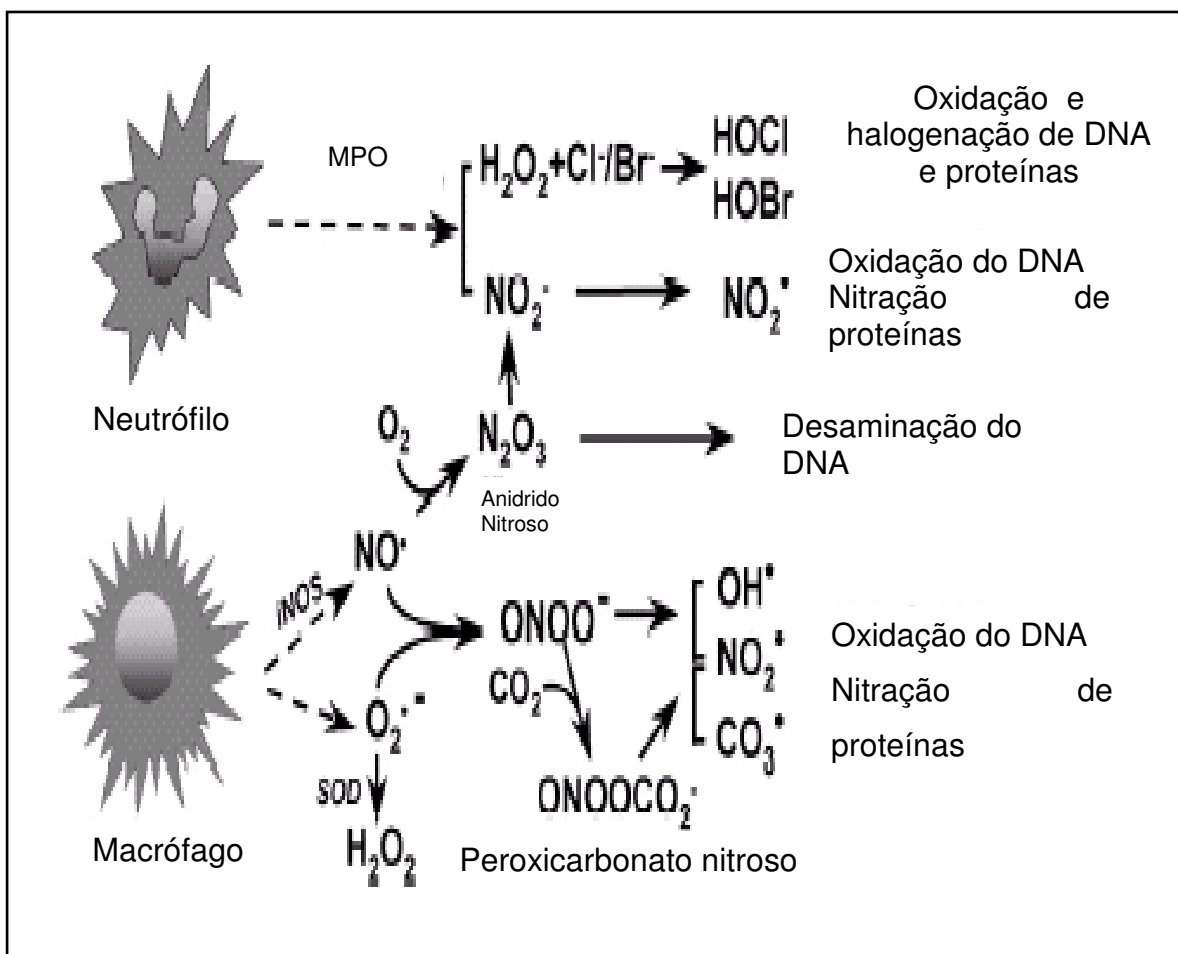
monócitos/macrófagos são seus maiores produtores. Atuam regulando as funções efetoras das células inflamatórias, além de ajudar na sinalização da maturidade e morte destas células. Seu efeito é pleiotrópico e redundante, uma vez que uma mesma citocina desempenha diversas funções e regula a expressão e liberação de outras. A expressão dos genes das citocinas acontece principalmente pela ativação de proteínas quinase (como MAPK e PKC) e fatores de transcrição como o NF- $\kappa$ B (Fator Nuclear- $\kappa$ B) e AP-1 (Proteína de Ativação-1). Eles são translocados ao núcleo, se ligam às regiões promotoras e regulam a transcrição destes genes indispensáveis na resposta inflamatória, como os das enzimas iNOS, COX-2, receptores e moléculas de adesão (CALIXTO *et al.*, 2004; SHERWOOD & TOLIVER-KINSKY, 2004).

As citocinas podem ser agrupadas de acordo com sua estrutura e função como interleucinas, fatores de crescimento, interferons, fatores de necrose tumoral e quimiocinas, entretanto a inclusão em um determinado grupo não exclui a citocina de outro grupo (por exemplo, IL-8 é interleucina e quimiocina) (SIMPSON *et al.*, 1997). Quimiocinas importantes na inflamação aguda, além da já citada IL-8, incluem a eotaxina, GRO, CINC-1 e RANTES. (CALIXTO *et al.*, 2004).

As citocinas podem ter caráter pró- ou anti-inflamatório. As principais citocinas pró-inflamatórias são TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-12, IL-15 e IL-18, enquanto que as anti-inflamatórias são IL-4, IL-10, IL-13 e TGF $\beta$  e a resposta inflamatória é minuciosamente controlada, havendo um balanço entre estas (VILLAREAL *et al.*, 2001; SHERWOOD & TOLIVER-KINSKY, 2004).

#### 2.3.2.9 Radicais livres

Os radicais livres possuem um importante papel no processo inflamatório agudo e crônico. Durante o processo inflamatório, as células fagocíticas (neutrófilos e macrófagos) secretam substâncias oxidantes, radicais livres e compostos eletrofílicos, gerados por enzimas como a mieloperoxidase (MPO) liberada por neutrófilos, ou pela iNOS e superóxido dismutase (SOD) produzida por macrófagos, como é mostrado na figura 11 (DEDON & TANNENBAUM, 2004).



**Figura 12** – Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e suas principais atividades. Adaptado de Dedon & Tannenbaum, 2004.

Neutrófilos ativados geram ânions superóxido por ativação da MPO, que converte o ânion superóxido em outras espécies reativas, tais como peróxido de hidrogênio, radicais hidroxil, ácido hipocloroso e N-cloramínas. Estes irão então agir sobre agentes infecciosos, assim como em células saudáveis e, dependendo do grau de lesão, podem trazer consequências severas para o indivíduo (ROOS 1991; SELLOUM *et al.*, 2001). Os principais alvos destes radicais livres são: a membrana plasmática, ácidos nucleicos e proteínas.

### 2.3.3 Fármacos anti-inflamatórios

Existem duas classes principais de fármacos anti-inflamatórios: os glicocorticóides (esteróides) e os fármacos anti-inflamatórios não – esteróides (FAINES).

Pesquisas recentes têm buscado novas terapias, tentando sintetizar substâncias que atuem em pontos cruciais do processo inflamatório como a adesão de leucócitos, bloqueio de enzimas como a COX e a 5-LOX, porém os glicocorticóides e os FAINES ainda são os mais utilizados.

#### 2.3.3.1 Fármacos anti-inflamatórios esteróides (glicocorticóides)

Os fármacos representados pelos glicocorticóides são potentes agentes usados na terapia de várias patologias, como a artrite reumatóide, o lupus eritematoso sistêmico, asma e outras doenças inflamatórias crônicas e/ou auto-imunes (REIS, 2006). Estes exercem seus efeitos pela ligação a receptores citoplasmáticos nas células alvo. O complexo glicocorticóide - receptor é translocado para o núcleo onde se liga a sequências *cis* do DNA, sequências conhecidas como elementos de resposta a glicocorticóides, modulando a transcrição de genes - alvo específicos de maneira positiva (ativando) ou negativa (inibindo). Além disso, foi descrito que o complexo receptor – glicocorticóide pode modular a transcrição não através da ligação direta ao elemento de resposta ao glicocorticóide, mas interferindo nas diversas vias de sinalização como, por exemplo, alterando a atividade de fatores de transcrição como o NF- $\kappa$ B e o AP-1. Consequentemente, uma ampla variedade de genes pró-inflamatórios e imuno-reguladores são negativamente modulados por estes fármacos, incluindo os que codificam a IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-6, IL-8, GM – CSF (fator estimulador de colônia granulócito – macrófago), receptor de IL-1, ICAM-1, MCP-1, RANTES, E-selectina, colagenase, iNOS, fosfolipase A<sub>2</sub> e COX-2 (KAWAMURA *et al.*, 2000).

Os glicocorticóides apresentam efeitos colaterais se usados em altas doses ou se administrados por longos períodos, tais como: imunossupressão, supressão da síntese de glicocorticóides endógenos, ações metabólicas, osteoporose e a Síndrome de Cushing (KAWAMURA *et al.*, 2000).

### 2.3.3.2 Fármacos anti-inflamatórios não-esteroidais (FAINES)

Os FAINES são amplamente prescritos para o tratamento de dores, febres e inflamação, e têm como alvo específico à inibição da atividade das ciclooxigenases. Estes fármacos competem com o AA pela ligação ao sítio ativo desta enzima. Devido a sua inibição não específica, FAINES clássicos como a Indometacina reduzem a produção de prostaglandinas pró-inflamatórias (via inibição da COX-2), mas também a formação de prostaglandinas fisiológicas (via inibição da COX-1), levando ao surgimento de efeitos colaterais tais como náusea, diarreia, vômitos e irritação do trato gastrointestinal (CHARLIER & MICHAUX, 2003).

A classificação dos FAINES estabelece que os inibidores sejam distinguidos de acordo com a sua interação com a COX-1 e COX-2.

➤ Inibidores irreversíveis de COX-1 e COX-2: aspirina ou o-(acetoxifenil) hepta-2 inil-sulfideo (APHS) acetilam irreversivelmente o resíduo de serina da COX-1 e COX-2 inibindo sua atividade ciclooxigenase, porém sem afetar sua atividade como peroxidase;

➤ Inibidores reversíveis competidores de COX-1 e COX-2: inibidores como ibuprofeno, piroxicam ou ácido mefenâmico competem com o ácido araquidônico pelo sítio catalítico da COX;

➤ Inibidores tempo-dependente lentos de COX-1 e COX-2: a indometacina e o flurbiprofen parecem agir por interação iônica entre sua cadeia funcional carboxílica e o resíduo de arginina da COX;

➤ Inibidores irreversíveis tempo-dependente de COX-2: os representantes deste grupo são seletivos para COX-2, como o celecoxib, rofecoxib e outros. Eles são momentaneamente inibidores competidores de COX-1, mas inibem a COX-2 irreversivelmente por um processo tempo – dependente lento.

O avanço dos estudos do mecanismo de ação dos metabólitos da COX levou ao desenvolvimento de inibidores seletivos para COX-2, tais como Nimesulida, Meloxicam, Rofecoxib, Celecoxib entre outros que mostraram efeito seletivo para COX-2 (CHARLIER & MICHAUX, 2003). A tabela 01 mostra alguns inibidores de COX, bem como, suas respectivas classes químicas correspondentes.



**Tabela 01** - Inibidores de COX e suas classes.

Classe	MEMBROS	
	COX-1 não-seletivos	Seletivos para COX-2
Alcanonas	Nabrunetona	
Ácidos antranflicos	Ácidos meclefenâmico e mefenâmico	
Ácidos arilpropionicos	Ibuprofen, flubiprofen, ketoprofen, naproxen, SC560	
Diarilheterociclicos		Celecoxib, etoricoxib, parecoxib, refecoxib, valdecoxib
Di-tert-butil-fenóis		Darbufenola
Ácidos Enólicos	Piroxicam, fenilbutazona	tenoxicam, Meloxicam
Ácidos Heteroaril acéticos	Diclofenaco, tolmetin	ketorolac, Lumiracoxib
Indol e indenos de ácido acético	Indometacina, sulindac	Amidas e esteres da indometacina, etodolac
Derivados para-amionofenólicos	Acetaminofen	
Derivados do ácido salicílico	Aspirina, sulfasalazina	diflunisal, o-(acetoxifenil) hepta-2-inil-sulfato (APHS)
Sulfanilideos		Nimesulide, flosulide

Fonte: Adaptado de Warner e Mitchell, 2004.

Estudos farmacológicos têm levantado questões sobre o uso de inibidores seletivos de COX-2, tais como: 1) a COX-2 é constitutivamente expressa no rim e no trato reprodutivo, sendo assim, é importante em vários processos fisiológicos, regulando a função renal, ovulação e diversas etapas da gravidez, como nidação e angiogênese, essenciais para estabilidade da placenta; 2) a COX-1 atua como protetora da mucosa gastrointestinal, ou seja, seu uso pode provocar os mesmos sintomas dos anti-inflamatórios clássicos, ou seja, efeitos colaterais gastrointestinais desagradáveis; 3) a inibição da COX-2 desregula o balanço da produção de PGI<sub>2</sub> e TXA<sub>2</sub> em favor do segundo, podendo aumentar o risco de eventos trombóticos e 4) as PGs produzidas pela COX-1 atuam na inflamação e na hiperalgesia, ou seja, apenas doses altas dos inibidores seletivos da COX-2 inibem a COX-1 de forma inespecífica (CHARLIER &

MICHAUX, 2003). Em resumo, esta geração de inibidores seletivos ainda não foi a resposta para tratamento da inflamação com diminuição de efeitos colaterais. Comprovando este fato, o fármaco comercial Vioxx® (Rofecoxib) foi retirado do mercado após apresentar efeitos colaterais no sistema cardiovascular e casos de derrame (REIS, 2006).

Diante destas evidências, a nova estratégia que vem sendo desenvolvida é a síntese de fármacos inibidores tanto de COX-2 quanto de 5-LOX, pois quando a COX é inibida, há um desvio do metabolismo para a via da 5-LOX, contribuindo com o processo inflamatório e alguns efeitos adversos causados pelos FAINES. Estes fármacos ainda não estão sendo comercializados, mas representam uma alternativa às drogas clássicas e inibidoras seletivas de COX-2, por apresentar ausência de toxicidade no trato gastrintestinal (CHARLIER & MICHAUX, 2003).

### 2.3.3.3 Inflamação e Produtos Naturais

Nos últimos anos, um significativo número de evidências surgiu indicando diversos grupos químicos derivados de produtos naturais como substâncias farmacologicamente potentes e de grande interesse terapêutico (CALIXTO *et al.*, 2003). Muitos produtos derivados de metabólitos secundários de plantas são conhecidos por interferir direta ou indiretamente em moléculas ou mecanismos envolvidos no processo inflamatório. Dentre eles, podemos citar os metabólitos do AA, a produção de mensageiros secundários (como cGMP e cAMP, várias proteínas quinases, cálcio, dentre outros), a expressão de proto-oncogenes (cJUN, cFOS e cMYC), e a ativação de fatores de transcrição como AP-1 e NF- $\kappa$ B, além da expressão de moléculas pró-inflamatórias, como iNOS, COX-2, citocinas (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , dentre outras), neuropeptídeos e proteases (revisado por CALIXTO *et al.*, 2003, 2004).

Dentre os grupos químicos mais comuns de origem natural com possível efeito anti-inflamatório podemos citar: compostos fenólicos, lignanas, terpenos (sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, clerodanos e saponinas), alguns fitoesteróides e alcalóides (CALIXTO *et al.*, 2004; REIS, 2003).

Apesar do crescente interesse na fitoquímica, poucos compostos derivados de plantas têm sido submetidos a triagens clínicas para confirmar seu potencial efeito anti-

inflamatório. Estes estudos são necessários para confirmação da eficácia destes produtos bem como da segurança (através de ensaios de citotoxicidade) do uso destes em processos inflamatórios (REIS, 2003).

## 2.4 - A FISIOTERAPIA: O ULTRASSOM TERAPÊUTICO COMO RECURSO FÍSICO ANTI-INFLAMATÓRIO

A Fisioterapia atua como tratamento coadjuvante na recuperação dos tecidos orgânicos lesados se utilizando de vários métodos e técnicas que visam de um modo geral melhora do bem estar físico e psíquico do indivíduo (LANGE *et al.*, 2003).

Na fisioterapia é comum o emprego da terapia por ultrassom nas lesões de partes moles, com efeito, antiálgico, antiedema, anti-inflamatório e de aceleração na recuperação do tecido lesionado (LOW & REED, 2001). No entanto, a utilização do ultrassom como fonoforese ou sonoforese que é a energia ultrassônica utilizada para introduzir componentes ativos de fármacos de forma transdérmica não é utilizado no cotidiano dos serviços de fisioterapia (BARRETO & MATOS, 1998).

### 2.4.1 - O ultrassom terapêutico

O ultrassom terapêutico é utilizado em medicina desde o final da década de 40 do século passado e, dependendo da frequência das ondas, passou a ser utilizado para o diagnóstico por imagem, cura terapêutica ou destruição tecidual (STARKEY, 2001; GUIRRO & GUIRRO, 2002). Trata-se de um dos recursos mais utilizados pela fisioterapia no tratamento das mais variadas lesões musculoesqueléticas agudas e crônicas (MCDIARMID & BURNS, 1987; ROBERTSON, 2001). Frequentemente, vários autores sugerem que o ultrassom possui ação pró-inflamatória, ou seja, acelera a resposta inflamatória do processo de reparação, promovendo a liberação de histamina, macrófagos e monócitos, além de incrementar a síntese de fibroblastos e colágeno (SNOW & JOHNSON, 1988; KITCHEN & PATRIDGE, 1990; LOW & REED, 2001; GUIRRO & GUIRRO, 2002).

Outros efeitos benéficos têm sido demonstrados, por exemplo, no tratamento de úlceras varicosas (DYSON & SUCKLING, 1978) cicatrização tendinosa (ENWEMEKA, 1989, JACKSON *et al.*, 1991, GAN *et al.*, 1995, BARROS Jr., 2001), reparação de lesões musculares (MENEZES *et al.*, 1999), reparação de lesões nervosas

e na facilitação da penetração transcutânea de fármacos de uso tópico, especificamente corticosteróides (BYL *et al.*, 1993), vasodilatadores (Mc ELNAY, *et al.*, 1993) e proteínas (MITRAGOTRI *et al.*, 2003).

A utilização do ultrassom terapêutico na terapia de reparação cutânea tem ação importante sobre as diversas fases do processo inflamatório. Sua ação na fase inicial da reparação é uma aceleração do processo, aumentando a liberação de fatores de crescimento pela desgranulação dos mastócitos, plaquetas e macrófagos (GONÇALVES & PARIZOTTO, 1998).

#### 2.4.1.1 - Física do Ultrassom

As ondas ultrassônicas não fazem parte do espectro eletromagnético da mesma forma que as ondas curtas ou micro-ondas. Embora sejam produzidas eletricamente, as ondas ultrassônicas são ondas de compressão (ARNOULD-TAYLOR, 1999). Conforme descrito por Rosim (2003), as ondas ultrassônicas para fins terapêuticos são geradas quando um campo elétrico de alta frequência (1 – 3 MHz) é aplicado sobre um cristal piezoelétrico localizado no transdutor do aparelho de ultrassom, que vibra na mesma frequência do campo, produzindo ondas acústicas de alta frequência. As frequências das ondas ultrassônicas variam de 20.000 a 20.000.000 de ciclos por segundo, sendo que, cada ciclo corresponde a uma pressão-rarefação por segundo (onde, 1 ciclo/s = 1 Hz). A frequência para terapia varia de 0,7 a 3 MHz. No Brasil se trabalha com frequência de 1 e 3 MHz (COHEN & ABDALLA, 2005).

As ondas acústicas geradas são pobremente transmitidas através do ar, resultando no retorno das ondas para o transdutor, deste modo, faz-se necessário um meio acoplador, geralmente um gel condutor, entre o transdutor ultrassônico e a superfície do corpo a ser tratada (AGNE, 2004; ROSIM, 2003; ARNOULD-TAYLOR, 1999; KITCHEN & BAZIN, 1996).

A possibilidade de usar diferentes frequências entre 1 e 3 MHz, é importante na medida em que as frequências mais altas, que correspondem a 3 MHz, são absorvidas mais rapidamente, tornando-as específicas para o tratamento de tecidos mais superficiais, enquanto que frequências baixas, correspondente a 1 MHz, penetram

profundamente, devendo ser aplicadas para os tecidos mais profundos (ROSIM, 2003; AGNE, 2004; MITRAGOTRI *et al.*, 2003 & DOCKER, 1987).

As ondas ultrassônicas apresentam como características: o comprimento ( $\lambda$ ), a amplitude (A), período (T) e frequência (f) (TER HAAR, 1987).

O comprimento de onda corresponde à distância entre regiões adjacentes de compressão ou de rarefação máxima, cujas partículas se encontram em um mesmo estado de movimento, em um dado instante de tempo (TER HAAR, 1987).

A amplitude corresponde ao deslocamento máximo de uma partícula a partir de sua posição de equilíbrio (TER HAAR, 1987).

O período é o intervalo de tempo necessário para que uma partícula realize um ciclo completo de movimento (TER HAAR, 1987).

A frequência corresponde ao número de vezes que uma partícula realiza um ciclo oscilatório por unidade de tempo (TER HAAR, 1987).

A onda ultrassônica é de natureza longitudinal, ou seja, a direção de propagação é a mesma que a direção de vibração (AGNE, 2004). As ondas ultrassônicas possuem feixe cilíndrico irregular no campo próximo tornando-se mais regular no campo distante (LOW & REED, 2001).

#### 2.4.1.2 - Tipos de ondas

Dos três tipos de ondas ultrassônicas existentes, a longitudinal, a transversal e a onda estacionária; a longitudinal é a mais comum, na qual a velocidade e aceleração estão na direção de propagação da onda. Elas são transportadas em meios líquidos não viscosos (COHEN & ABDALLA, 2005).

As transversais são formas comuns de propagação de ondas em sólidos. A movimentação das partículas é perpendicular a direção da propagação das ondas (COHEN & ABDALLA, 2005).

Já as estacionárias poderão ocorrer quando duas ou mais ondas se combinam, formando uma nova onda. Elas ocorrem a intervalos fixos de meio comprimento de onda (COHEN & ABDALLA, 2005).

#### 2.4.1.3 - Tipos de Ultrassom

O modo de transmissão das ondas ultrassônicas pode ser contínuo ou pulsado. O contínuo possui características como, ondas sônicas contínuas, sem modulação, efeitos térmicos e micromassagem (diatermia). Sua utilização ocorrerá quando ambos os efeitos, térmicos e não térmicos, forem necessários (COHEN & ABDALLA, 2005).

Já o modo pulsado possui características de ondas sônicas pulsadas, modulação e amplitude com frequência de 16 Hz a 100Hz, efeitos térmicos minimizados e efeitos não-térmicos (COHEN & ABDALLA, 2005). Este modo é mais bem indicado quando o calor produz dor, quando houver necessidade de redução de velocidade da condução em fibras nervosas, raízes nervosas ou gânglios, quando houver necessidade de regeneração de tecidos, quando a aplicação for feita em processos inflamatórios (na fase aguda e sub-aguda) e quando houver necessidade de efeitos não térmicos (COHEN & ABDALLA, 2005).

#### 2.4.1.4 - Características do ultrassom terapêutico

##### 2.4.1.4.1 - Atenuação

Para Agne (2004) a atenuação é diretamente proporcional à frequência do ultrassom utilizado, ocorrendo maior perda da intensidade quanto maior for a sua frequência empregada. Estes fatores têm sido estudados em laboratórios com meios homogêneos permitindo o entendimento na prática clínica, mesmo que aproximada, da profundidade a que podemos chegar e a intensidade necessária para alcançar um nível terapêutico apropriado.

Essa atenuação vai ocorrer quando a amplitude e a intensidade diminuïrem à medida que as ondas de ultrassom sob forma de feixe passar através de qualquer meio. Esta diminuição de intensidade é causada pela difusão do som em um meio heterogêneo, pela reflexão e refração nas interfaces e pela absorção do meio (TER HAAR, 1987).

O feixe de ultrassom tem sua intensidade reduzida pela metade a determinada distância (D/2), que dependerá da natureza do meio e da frequência de ondas. Ondas de frequências altas são absorvidas mais rapidamente e possuem menor D/2 do que frequências baixas, portanto, quanto mais alta a frequência, e menor o comprimento de onda, maior será sua absorção. Existirão valores diferentes de atenuação para cada tecido apresentado na tabela 02 (COHEN & ABDALLA, 2005).

**Tabela 02:** Atenuação das ondas ultrassônicas em diferentes tecidos.

Profundidade média D/2 em diversos meios			
ATENUAÇÃO EM DIFERENTES TECIDOS			
	1MHz	3MHz	Obs.
<b>Tecido Ósseo</b>	2,1mm	—	
<b>Pele</b>	11,1mm	4mm	
<b>Cartilagem</b>	6mm	2mm	
<b>Ar</b>	2,5mm	0,8mm	
<b>Tecido tendinoso</b>	6,2mm	2mm	
<b>Tecido muscular</b>	9mm 24,6mm	3mm 8mm	Feixe perpendicular ao tecido Feixe perpendicular ao tecido
<b>Tecido adiposo</b>	50mm	16,5mm	
<b>Água</b>	115mm	3.833.3mm	

Fonte: Adaptado de Cohen e Abdalla, 2005.

#### 2.4.1.4.2 - Absorção

A absorção ocorre através de um meio que recebe energia vibracional e a transforma em energia molecular. As proteínas são as estruturas que mais absorvem esta energia, devido à presença de tecidos macromoleculares (STARKEY, 2001; COHEN & ABDALLA, 2005). A energia ultrassônica é bem absorvida em proteínas de tecido nervoso, ligamentos, cápsulas intra-articulares, tendões com alta concentração de colágeno e hemoglobina. Ao contrário, o ultrassom não é bem absorvido pela pele e gordura (COHEN & ABDALLA, 2005).

Os princípios da absorção dizem que quanto maior a frequência, menor o comprimento da onda, e maior será a absorção superficial, sendo dependente da: impedância acústica do tecido, densidade do tecido e suas interfaces, frequência do ultrassom, quantidade de proteína do tecido, quantidade de água e gordura, ângulo de

incidência, viscosidade do fluido, reflexão, refração e ondas transversais mostrado na tabela 03 (COHEN & ABDALLA, 2005).

**Tabela 03:** Comportamento da absorção do ultrassom em relação a frequência.

COMPORTAMENTO DA ABSORÇÃO COM A FREQUÊNCIA			
Coeficiente de absorção			
Frequência MHz	Músculo	Gordura	Sangue
1	0,12	0,04	0,18
3	0,36	0,16	0,58

Fonte: Cohen e Abdalla, 2005 (adaptado de Wodsworth e Chanmugan).

#### 2.4.1.4.3 - Reflexão

Reflexão ocorre quando uma onda não consegue atravessar a próxima densidade. A onda bate em um objeto e inverte sua direção, retornando. A reflexão pode ser completa, quando toda energia é impedida de entrar na próxima camada de densidade, ou pode ser parcial (STARKEY, 2001).

#### 2.4.1.4.4 - Refração

É um desvio da onda de som nas várias interfaces dos tecidos. A onda penetra no tecido ou interface a um ângulo (ângulo de incidência), e sai a um ângulo diferente (ângulo de refração), modificando assim sua velocidade (COHEN & ABDALLA, 2005).

#### 2.4.1.4.5 - Profundidade de Penetração

Embora as ondas ultrassônicas demonstrem facilitar a penetração transcutânea de uma variedade de fármacos, o mecanismo desse fenômeno no que concerne a frequência ultrassônica ideal para o transporte através da camada córnea a uma profundidade satisfatória de ação do fármaco, ainda não está bem esclarecido pelos estudos científicos pesquisados.

Agne (2004) descreve que à medida que o feixe ultrassônico avança nos tecidos, vai perdendo sua intensidade. Isto se dá por diversos fatores, desde a própria absorção das ondas ultrassônicas pelo meio até as diversas reflexões. Também, se produzem dispersões e perdas de direção por refração, podendo torná-las menos eficazes como



agente terapêutico. A profundidade de penetração está em relação inversa com a frequência. A profundidade ainda é bastante discutida, obviamente pelas metodologias distintas utilizadas nos diferentes estudos de investigação científica (AGNE, 2004; MITRAGOTRI *et al.*, 2003).

Se aceita que, com ultrassom com frequência de 1MHz se pode alcançar mais de 5cm e com 3MHz a penetração efetiva é aproximadamente 3cm (AGNE,2004).

#### 2.4.1.5 - Efeitos físicos do ultrassom

##### 2.4.1.5.1 - Efeitos Não-Térmicos

Os efeitos não térmicos das ondas ultrassônicas incluem cavitação, correntes acústicas e ondas estacionárias. A cavitação é a formação de pequenas bolhas gasosas nos tecidos como resultado da vibração do ultrassom. E a cavitação pode ser: estável ou transitória. A cavitação estável ocorre quando bolhas oscilam de um lado para o outro dentro da onda de pressão do ultrassom, mas permanecem intactas. Quando o volume da bolha se altera, ela colapsa (implodir), causando aumento na temperatura e na pressão local, caracterizando a cavitação transitória (LOW & REED, 2001).

A cavitação estável, associada com as correntes acústicas, é considerada de valor terapêutico, mas a cavitação transitória, que provavelmente só ocorre com altas intensidades, pode causar danos teciduais (TER HAAR, 1987 LOW & REED, 2001).

**Correntes Acústicas:** É um fluxo circulatório devido ao torque de irradiação. Além disso, ocorre um movimento localizado e unidirecional de líquido em torno da bolha que está vibrando. Esses movimentos muito pequenos de líquido também ocorrem em torno das células, caracterizando o efeito chamado de microfluxo (LOW & REED, 2001).

As ondas estacionárias ocorrem como resultado da sobreposição das ondas incidentes e refletidas. Visto que a onda estacionária consiste em duas ondas superpostas, além de um componente de deslocamento, as intensidades e pressões de pico são mais elevadas que as da onda incidente normal. Células fixas, como as células endoteliais que revestem os vasos sanguíneos, podem ser lesadas, levando a formação de trombos (LOW & REED, 2001).

As ondas estacionárias são evitadas com a simples movimentação contínua do cabeçote ultrassônico durante o tratamento (TER HAAR, 1987 LOW & REED, 2001).

O calor e a cavitação são os mecanismos que causam a maioria dos efeitos terapêuticos do ultrassom (TER HAAR, 1987). Provavelmente, são também os dois mecanismos que explicam a facilitação da penetração transcutânea de medicamentos na pele tratada com esse recurso.

#### 2.4.1.5.2 - Efeitos Térmicos

Quando as ondas ultrassônicas se deslocam através dos tecidos, parte delas é absorvida gerando calor nos tecidos. A energia sonora é convertida em energia térmica proporcional à intensidade do ultrassom. Se o calor não é dissipado pelos meios fisiológicos normais, ocorre aumento da temperatura local que resulta nos efeitos térmicos (LOW & REED, 2001).

Segundo Low e Reed (2001), a alteração nos vasos sanguíneos decorrente do aquecimento da superfície é a vasodilatação que ocorre não somente para distribuir o calor adicional do corpo, permitindo perdas compensatórias em outras regiões do corpo, mas também para proteger a pele de lesões. Segundo os autores, a vasodilatação decorrente do calor é causada por vários outros mecanismos, tais como:

- efeito direto sobre os capilares, arteríolas e vênulas, de natureza ainda não bem compreendida, fazendo com que todos dilatam;
- alteração metabólica com liberação adicional de dióxido de carbono e ácido láctico, aumentando a acidez dos tecidos aquecidos, que tende a provocar vasodilatação e;
- dano protéico local, com reação inflamatória e liberação de bradicininas e de substâncias semelhantes à histamina, que levam à vasodilatação.

#### 2.4.2 - Equipamento de Ultrassom

O ultrassom é constituído de duas partes, um circuito elétrico e um transdutor. O circuito elétrico converte a tensão da rede em corrente alternada. O transdutor recebe esta voltagem de corrente alternada que tem a mesma frequência de ressonância do

crystal. Deste modo, a energia elétrica é convertida em energia mecânica (KOEKE, 2003).

O transdutor que emite onda ultrassônica sempre é menor que o cabeçote que o contém. A ERA (Área Efetiva de Emissão) do cabeçote do tratamento é um parâmetro importante que determina a intensidade da onda ultrassônica. Como o elemento piezoelétrico não vibra uniformemente, a ERA será sempre menor (10/20%) que a área geométrica do cabeçote de tratamento (AGNE, 2004).

### **2.4.3 Sonoforese ou fonoforese**

Fellingner e Schmid (1954) descreveram o primeiro estudo sobre a associação de ultrassom com o uso de hidrocortisona para o tratamento de poliartrite para os dedos da mão. A partir desse estudo, várias pesquisas têm sido realizadas para se esclarecer quais são os mecanismos de ação da fonoforese (MITRAGOTRI, 1995; PANCHAGNULA, 1997).

Sonoforese ou fonoforese, também conhecida como ultrafonoforese, é uma forma ou sistema especial de acoplamento direto, que realiza o transporte transdérmico através das ondas ultrassônicas para facilitar a introdução dos fármacos aplicados topicamente (AGNE, 2004; MITRAGOTRI *et al.*, 2003; MITRAGOTRI *et al.*, 1995, BRASILEIRO *et al.* 2003).

Por consistir na introdução de drogas selecionadas ao interior dos tecidos biológicos, sob a influência do ultrassom terapêutico, torna-se um método muito vantajoso, pois a droga não é introduzida de forma invasiva, e sim de forma tópica, onde penetra nos tecidos, sem passar pelo fígado, diminuindo a eliminação metabólica das substâncias, sendo menos agressivo ao trato gastrointestinal e menos traumático ao enfermo, promovendo diminuição dos efeitos colaterais sistêmicos, pois as concentrações dos fármacos podem ser menores que as utilizadas nos outros métodos, evitando altas concentrações ou valores subterapêuticos (STARKEY, 2001, PANCHAGNULA, 1997). Entretanto, apresenta uma baixa permeabilidade através da pele o que torna uma desvantagem ao método de aplicação (WU *et al.*, 1998; AGNE, 2004; MITRAGOTRI, 2003; ROSIM, 2003).

A indução à absorção transcutânea de drogas pela sonoforese se baseia na perturbação tecidual, ou seja, na mudança da estrutura das camadas cutâneas (LOW & REED, 2001). O ultrassom aumenta a penetração transcutânea por pressão somática, podendo chegar a média a atingir entre 4-5 cm de profundidade (AGNE, 2004). Pode ser aplicado com um gel ou óleo medicamentoso como meio de acoplamento do transdutor ultrassônico.

O modo de emissão das ondas ultrassônicas pode ser decisivo para a penetração do fármaco. No modo contínuo a geração de onda ultrassônica, permanece constante durante todo o tempo, o que poderia aperfeiçoar a interação do ultrassom com o fármaco e o tecido. Porém, o modo pulsado é mais frequente na rotina clínica por permitir que o efeito mecânico da terapia prevaleça sob o efeito térmico, favorecendo o processo de reparo dos tecidos (PARIZOTTO *et al.*, 2003).

#### 2.4.3.1 - Transmissividade

A transmissão da onda ultrassônica através de um meio acoplante está relacionada às suas características acústicas como impedância, coeficientes de reflexão, transmissão e atenuação (CASAROTTO, 1999).

Quando a aplicação ocorrer com gel ou óleo medicamentoso como meio de acoplamento, deve-se ter certeza de que esse é um bom transmissor ultrassônico, caso contrário, pouco provável que o tratamento logre êxito (LOW & REED, 2001).

Este fato foi observado por Benson e McElnay *apud* Rosim (2003), que pesquisaram as características de transmissão ultrassônica de um grande número de substâncias diferentes e chegaram à conclusão de uma grande variação de transmissividade entre as mesmas. A transmissividade de cada formulação é dada pela porcentagem da transmissão da substância em relação à da água deionizada.

A transmissividade é uma propriedade intrínseca dos géis, mas aumenta com a energia ultrassônica. Todavia, frequências elevadas de ondas ultrassônicas podem causar quebra nas cadeias de polímeros responsáveis pela viscosidade dos agentes utilizados nas formulações tópicas, fluidificando-os e reduzindo sua capacidade de atenuar a energia ultrassônica (BENSON & McELNAY *apud* ROSIM, 2003).

Entretanto, este fenômeno ainda não sofre total esclarecimento científico, necessitando maiores investigações e pesquisas científicas a respeito do assunto.

Este estudo propõe-se a verificar os efeitos do óleo-resina de copaíba, aplicada em modelos inflamatórios induzido por diferentes agentes flogísticos em edema de pata e pleurisia induzida por lipoplissacarídeo, além de modelo antinociceptivo de contorção abdominal por ácido acético em camundongos, visando contribuir para a compreensão dos mecanismos de ação desta substância no processo inflamatório.

### 3 - OBJETIVOS:

#### 3.1 - OBJETIVO GERAL

Estudar o processo da atividade anti-inflamatória do óleo-resina de copaíba da espécie *copaifera reticulata* utilizando como modelos farmacológicos de estudo experimental da inflamação aguda o edema de pata, pleurisia, contorção abdominal e *air pouch* provocado por diferentes agentes flogísticos em camundongos.

#### 3.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a ação do óleo-resina de copaíba da espécie *copaifera reticulata* como anti-inflamatório em aplicação tópica no modelos experimentais de reação inflamatória aguda;
- Avaliar o potencial nociceptivo do óleo-resina de copaíba da espécie *copaifera reticulata* como analgésico em aplicação via oral em modelo experimental de reação álgica aguda;
- Medir a ação anti-inflamatória do óleo-resina em modelos experimentais sob aplicação tópica e via oral do óleo-resina de copaíba da espécie *copaifera reticulata* e comparar com grupo controle positivo e negativo;
- Contribuir para o estudo farmacológico do óleo-resina de copaíba da espécie *Copaifera reticulata* tendo como interesse a sua utilização no arsenal terapêutico da fisioterapia através da técnica de fonoforese;
- Estudar o mecanismo de ação das concentrações do óleo-resina de copaíba da espécie *copaifera reticulata*.

#### 4 - JUSTIFICATIVA:

Devido ao grande número de indicações medicinais, o óleo-resina de copaíba já foi considerado a verdadeira panacéia, mas a sua utilização e, principalmente, sua prescrição médica diminuíram muito nas últimas décadas. À época do seu descobrimento pela terapêutica ocidental, algumas de suas principais propriedades foram deixadas de lado em função de sua grande atividade contra alguns males para os quais não havia medicação eficiente, aliado a descoberta neste século de agentes terapêuticos sintéticos mais eficientes. Nos últimos anos, entretanto, o retorno à terapêutica natural trouxe de volta os fitoterápicos para as farmácias de todo o país, mas o conhecimento de sua utilização e suas aplicações se perderam ou aparecem bastante confusos nas centenas de publicações que não apresentam mais que duas ou três propriedades farmacológicas já bastante conhecidas (CASCON & GILBERT, 2000; VEIGA JÚNIOR & PINTO 2002; VEIGA JÚNIOR *et al.*, 1997; SOUZA-JÚNIOR *et al.*, 2000).

No norte do Brasil, o caboclo faz amplo uso do óleo-resina de copaíba. Ele o utiliza como produto medicinal e também como combustível na iluminação pública das pequenas cidades ribeirinhas. As grandes distâncias, que devem ser vencidas na floresta para encontrar as copaibeiras, em geral 0,2 - 0,3 árvores por hectare, faz com que a mistura do óleo-resina de copaíba com outros óleos torne-se uma prática comum. Os mateiros muitas vezes armazenam no mesmo recipiente os óleos de todas as copaibeiras que encontram, sem se preocuparem se provêm de árvores da mesma espécie botânica (FREISE *apud* VEIGA JÚNIOR & PINTO, 2002).

É bastante comum a adulteração do óleo de copaíba com produtos de menor valor agregado, com o objetivo de diluir o óleo. Estas adulterações já eram descritas, desde o começo do século passado, tanto na Europa, onde o óleo, exportado, era misturado com óleo de madeira e colofane como no Brasil, onde publicações alemãs ensinavam como e onde comprar óleos de boa qualidade em cidades da Amazônia (PIO CORRÊA *apud* VEIGA JÚNIOR & PINTO, 2002).

Hoje em dia ainda é comum que intermediários na comercialização do óleo-resina de copaíba o misturem com óleo diesel e banha animal. Essas adulterações devem

ainda ser somadas àquelas praticadas pelos laboratórios farmacêuticos, que utilizam óleos vegetais comestíveis como a soja e o milho para a diluição. Só recentemente uma metodologia para detectar estas adulterações foi desenvolvida (CASCON & GILBERT, 2000; VEIGA JÚNIOR & PINTO 2002).

Existem diversas indicações para a utilização do óleo-resina de copaíba com pouco respaldo científico, muitas delas citadas em diversos trabalhos científicos, sendo que, as propriedades já comprovadas por meio de modelos experimentais são: anti-inflamatória, cicatrizante, analgésica e gastroprotetora (SOUZA-JÚNIOR *et al.*, 2000).

Diante das variadas aplicações terapêuticas dos óleos de copaíba, são muito reduzidos os estudos farmacológicos descritos até o momento, para estes óleos. A grande maioria destes estudos não indica a espécie de onde proveio o óleo, nem informam a época e o local de coleta. A ausência destas informações abre uma grande lacuna de incertezas em relação a autenticidade destes óleos, uma vez que estudos sobre a autenticidade de 16 diferentes tipos de óleos de copaíba comerciais, por cromatografia gasosa de alta resolução, mostraram que em grande parte, óleos de copaíba diferentes são misturados, tendo sido comprovado também adulteração, possivelmente com óleo de soja. Além disso, estudos etnobotânicos relacionados aos óleos de copaíba, relatam que nem todas as árvores exudam óleos apropriados para o uso medicinal (MACIEL, *et al.*, 2002).

Na maior parte dos trabalhos publicados, a composição química dos óleos de copaíba não é fornecida. Em alguns trabalhos a espécie botânica não foi nem identificada, faz-se apenas menção ao óleo de copaíba comercial (MACIEL, *et al.*, 2002).

A necessidade de estudar o mecanismo anti-inflamatório de ação do óleo-resina de copaíba da espécie *Copaifera reticulata*, a espécie mais comum na região amazônica, particularmente, no Estado do Pará (MARTINS-DA-SILVA, R.C.V.; PEREIRA, J.F. & LIMA, H.C., 2008) quanto as suas vias de aplicações em concentrações não tóxica aliada a vantagem da fonoforese por ser uma técnica não invasiva. Em fase da eficácia das diversas vias de aplicação ainda não possuem um modelo comparativo experimental que seja totalmente comprovada existindo, portanto, controvérsias, o que remota a este motivo da realização do presente estudo.



## 5 – MATERIAL E MÉTODO:

### 5.1 - LOCAL DE REALIZAÇÃO

O trabalho foi realizado após ser aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa de Animais da Universidade do Estado do Pará - UEPA, através do protocolo nº 44/08, sendo realizado em conformidade com o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), em concordância com a Lei Federal nº 6.638, de 08 de maio de 1979, que estabelece normas práticas didático-científica de conduta de pesquisa experimental em animais e foram conduzidos de acordo com as orientações para os cuidados com animais de laboratório (ZIMMERMANN, 1983). Todo o desenvolvimento experimental teve anuência do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Fundação Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ/RJ.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará – UFPA e no Laboratório de Imunofarmacologia – Pavilhão Ozório de Almeida - Fundação Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ - RJ.

### 5.2 CARACTERÍSTICA DO ESTUDO

O presente estudo foi experimental de caráter quantitativo analítico e randomizado.

### 5.3 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Neste experimento, foram utilizados camundongos da linhagem *Swiss Webster* (SW) machos; com idade entre 06 a 08 semanas; peso variando entre 20 a 35 gramas, procedentes do Centro de Criação de Animais de Laboratório – CECAL da Fundação Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ - RJ. Os animais foram mantidos em gaiolas metálicas coletivas, com no máximo cinco animais por gaiola, sob condições controladas de temperatura  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , ciclo fotoperíodo de 12 horas claro/escuro e alimentados com ração NUVILAB CR-1 (Nuvital Nutrientes Ltda., Paraná, Brasil) e água *ad libitum*, os quais foram fornecidos apenas durante o ciclo claro (7 – 19 horas).

### 5.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Como critério de exclusão, foi padronizada a inclusão de camundongo da linhagem Swiss Webster (SW) machos, com idade entre 06 a 08 semanas, peso variando entre 20 a 35 gramas, além dos animais que foram a óbito durante os procedimentos experimentais; na indução anestésica; ou no procedimento de administração do tratamento.

## 5.5 APARATO EXPERIMENTAL

### 5.5.1 Preparação das gaiolas

Todos os animais foram mantidos em gaiolas metálicas (*steel house*) identificadas segundo cada grupo de pesquisa com dimensões padronizadas de 20 x 20 x 30 cm com fundo recoberto com palha de arroz e tela aramada.

### 5.5.2 Equipamento de ultrassom

Para os grupos que receberam tratamento veiculado com o ultrassom terapêutico, foi utilizado o modelo *Sonacel expert* da marca Bioset - Indústria de Tecnologia Eletrônica Ltda. Parâmetros físicos utilizados foram: frequência de 3 MHz, área de irradiação efetiva (ERA) 3,6cm<sup>2</sup>; modo de corrente pulsado (frequência do pulso = 100Hz – 1/2); intensidade média de 0,4 W/cm<sup>2</sup>; durante cinco minutos, em movimento circular horário do cabeçote em toda a extensão da região da pata direita na conformidade da descrição de Durigan e colaboradores (2005) e no modelo de bolsa de ar (*air pouch*) descrito previamente por Selye (1953) e adaptado por Ghosh e colaboradores (2000).

Este equipamento atende os requisitos da norma de segurança para equipamentos eletromédicos IEC 601 (norma geral) e ICE 601-2-5 (norma particular para equipamentos de ultrassom).

### 5.5.3 Especificações do óleo de copaíba

O óleo-resina de copaíba da espécie *Copaifera reticulata* apresenta aspecto líquido, fino, odor fraco e coloração amarelo claro. Este tipo de óleo é geralmente utilizados, na medicina popular, indústria farmacêutica e cosmética (OLIVEIRA; LAMEIRA & ZOGHBI, 2006).

O óleo-resina de copaíba utilizado neste experimento foi extraído de árvore copaibeira da espécie *Copaifera reticulata*, família das *Leguminosae* (divisão *Caesalpinioideae*), sendo aplicado na sua forma pura. Foi utilizada a quantidade de 20 ml, que após a extração, foi armazenada em tubo *falcon* de 50 ml.

O óleo-resina de copaíba foi obtido na Estação Científica Ferreira Penna – ECFPn, Floresta Nacional de Caxiuanã, localizada no município de Melgaço no Estado do Pará, Estação Científica administrada pelo Museu Paraense Emílio Goeldi - MPEG em Belém – Pará, autorizado através do Ofício MPEG/Caxiuanã nº 018/2008.

Conforme o modelo descrito com modificação por Oliveira; Lameira e Zoghbi (2006), para a coleta do óleo-resina de copaíba foram utilizadas plantas adultas nativas de espécie de *Copaifera reticulata* com mais de trinta anos de idade. As árvores foram perfuradas aleatoriamente com um trado tradicional de 02 cm de diâmetro e 45 cm de comprimento, fazendo-se dois orifícios na altura de 1 m e 1,50 m, respectivamente. As amostras de óleo-resina de copaíba foram armazenadas em recipientes de plásticos (tubo *falcon* de 50 ml) e protegidas da ação da luz com papel aluminizado. Posteriormente foram transferidos em frascos, de vidros (20 ml) para posterior utilização e análise. O orifício da árvore, após o completo escoamento do óleo-resina, foi vedado com cano do tipo PVC com  $\frac{3}{4}$  de diâmetro e 10 cm de comprimento contendo uma tampa de plástico visando facilitar as outras coletas e evitar resíduos de madeira e penetração de insetos.

A identificação botânica da planta foi feita pelo Dr. Antônio Sérgio Lima da Silva, Pesquisador do Museu Paraense Emílio Goeldi - MPEG, Belém - Pará, Brasil.

#### 5.5.3.1 Preparo do óleo-resina para tratamento via oral e tópico.

Para o teste da atividade biológica do óleo-resina de copaíba da espécie *copaifera reticulata* nos modelos farmacológicos experimentais estudados o óleo-resina foi diluído em etanol 15%, tween 20 1,25% em solução de salina fisiológica. As doses testadas foram de 10, 100 e 500 mg/kg/p.c., preparadas em diluição seriada e administradas via oral adaptado de Gomes e colaboradores (2006).

Quanto ao tratamento tópico o óleo-resina de copaíba foi utilizado na sua forma pura (*in natura*), sendo administrado 50µl na pata direita (modelo inflamatório de

edema de pata) e 100 µl na bolsa de ar (modelo inflamatório *air pouch*) como forma padronizada da dose de óleo-resina de copaíba para o protocolo de pesquisa.

#### 5.5.4 Fármaco utilizado

Foi utilizado o diclofenaco dietilamônio (DCB 0398.02-0) produzido pela Cristália Produtos químicos Farmacêuticos Ltda., na forma farmacêutica de gel na dose de 11,6 mg/g, equivalente a diclofenaco de potássio 10mg. O excipiente utilizado era composto por dietilamina, carbopol 940, cetomacrogol 1000, álcool isopropílico, cera de ésteres do álcool cetílico, propilenoglicol, metilparabeno, vaselina líquida, fragância splash e água purificada. O medicamento tem prazo de validade de 36 meses sendo armazenado sob temperatura entre 15 a 30°.

### 5.6 MODELOS FARMACOLÓGICOS EXPERIMENTAIS EM ANIMAIS: INDUÇÃO DO PROCESSO DE INFLAMAÇÃO AGUDA POR DIFERENTES AGENTES FLOGÍSTICOS E POTENCIAL ANALGÉSICO

#### 5.6.1 Modelo de edema de pata induzido por Carragenina (Cg)

##### 5.6.1.1 Grupo tratado com *copaifera reticulata* via oral

O modelo de inflamação aguda induzida por carragenina (Cg) descrito previamente por Levy (1969) foi utilizado para avaliar o efeito anti-inflamatório do óleo-resina de copaíba da espécie *Copaifera Reticulata*. O Grupo de animais (n = 06/grupo) foi tratado por via oral (v.o.) com dose de: 10mg, 100mg e 500mg do óleo-resina de copaíba (solução em *tween* 1,25%: etanol 15% em salina fisiológica) sendo 200 µL/animal, 01 hora antes da injeção subplantar de 50 µL de carragenina (06 mg/mL) em salina estéril administrada na região subplantar da pata direita. Como controle positivo de ação antiedematogênica, um grupo foi tratado com indometacina (em Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,2%) na dose de 10 mg/kg p.c., administrada por via intraperitoneal (i.p.). O edema de pata foi avaliado em pletismômetro (*Plethysmometer* modelo 7140, Ugo Basile, Itália) pela diferença de volume das patas no tempo zero (t<sub>0</sub>) e nos diferentes intervalos de tempo: 01h, 03h e 06 horas após a injeção de carragenina (t<sub>x</sub>), onde o volume da pata foi novamente aferido, usando a técnica descrita por Ferreira (1979) adaptada com modificações para camundongos por Henriques e colaboradores (1987). Após o término do experimento, os animais foram eutanasiados em câmara de dióxido

de carbono (CO<sub>2</sub>). O índice de edema (IE) e o índice de inibição do edema (IIE) foram calculados pelas seguintes fórmulas:

$$IE = \left( \frac{\text{Volume da pata direita em tx} - \text{Volume da pata direita em } t_0}{\text{Volume da pata direita em } t_0} \right) \times 100$$

$$\text{Índice de Inibição de Edema} = \left( \frac{\text{Média IEtx} - \text{IEtx}}{\text{Média IEtx}} \right) \times 100$$

### 5.6.2 Modelo de edema de pata induzido por bradicinina (BK)

5.6.2.1 Grupo tratado com óleo-resina de copaíba da espécie *copaifera reticulata* via oral.

O modelo de inflamação aguda induzida por bradicinina (BK), conforme Menezes de Lima Jr e colaboradores (2006), foi utilizado para avaliar o efeito anti-inflamatório do óleo-resina de copaíba da espécie *Copaifera Reticulata*. O Grupo de animais (n = 06/grupo) foi tratado por via oral (v.o.) com doses: 10mg, 100mg e 500mg do óleo-resina (solução em *tween* 1,25%: etanol 15% em salina fisiológica) sendo 200 µL/animal, 01 hora antes da injeção subplantar de bradicinina (03 nmol/pata) administrada na região subplantar da pata direita. O edema de patas foi avaliado em pletismômetro (*Plethysmometer* modelo 7140, Ugo Basile, Itália) pela diferença de volume das patas no tempo zero (t<sub>0</sub>) e nos diferentes intervalos de tempo: 10min, 30min, 60min e 120min após a injeção de bradicinina (BK), onde o volume da pata foi novamente aferido, usando a técnica descrita por Ferreira (1979) adaptada para camundongos por Henriques *et al.* (1987). Após o término do experimento, os animais foram eutanasiados em câmara de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). O índice de edema (IE) foi calculado pela fórmula supracitada.

### 5.6.3 Modelo de Pleurisia Induzida por LPS (lipopolissacarídeo extraído da parede de *E. coli*)

Para avaliação do potencial anti-inflamatório do óleo-resina de copaíba da espécie *copaifera reticulata* foi utilizado o modelo de pleurisia, conforme modelo

modificado para camundongos descrito por Henriques e colaboradores (1990), induzida por LPS. Os animais (Grupo de n = 06/grupo) foram pesados e separados de acordo com seus grupos correspondentes e 01 hora antes do tratamento via oral foram retirado o alimento e a água dos animais. O óleo-resina de copaíba foi administrado por via oral (v.o.) em diferentes doses: 10mg, 100mg e 500mg do óleo-resina de copaíba (solução em *tween* 1,25%: etanol 15% em salina fisiológica), sendo 200 µL/animal. Como controle positivo foi administrado dexametasona (0,5 mg/kg/p.c.) por via intraperitoneal (i.p.). Uma hora após o tratamento o LPS (250 ng/cavidade) foi injetado por via intratorácica (i.t.). Após 4h do estímulo com o agente flogístico (LPS), os animais foram sacrificados em câmara de CO<sub>2</sub> e a cavidade torácica foi lavada com PBS (1mL), conforme modelo descrito por Bozza e colaboradores (1994a,b). A partir do infiltrado celular foram realizados: contagem total de leucócitos (câmara de *Neubauer*) e contagem diferencial de células.

#### 5.6.3.1 Contagem total de leucócitos

A contagem de leucócitos totais foi realizada diluindo (1:20) uma alíquota do exsudato em solução de violeta de genciana a 1% em salina fisiológica. A contagem das células foi realizada em câmara de *Neubauer*, por microscopia de luz. A concentração de células presentes na cavidade foi obtida multiplicando-se o número de células contadas na câmara de *Neubauer* pelo fator de correção da câmara e pelo fator de diluição das amostras, sendo expressa em número de leucócitos totais x 10<sup>6</sup> /mL de exsudato.

A contagem diferencial foi realizada em citoesfregaços corados pelo método Panótico rápido (microscópio óptico em objetiva de imersão com aumento de 1000x).

#### **5.6.4 Modelo de edema de pata induzido por Carragenina (Cg) com veiculação do Ultrassom.**

##### 5.6.4.1 Grupo tratado com óleo-resina de copaíba da espécie *copaifera reticulata* administrada na forma tópica veiculada pelo ultrassom.

O modelo de inflamação aguda induzida por carragenina (Cg) descrito previamente por Levy (1969) foi utilizado para avaliar o efeito anti-inflamatório do óleo-resina de copaíba da espécie *Copaifera Reticulata*. O Grupo de animais (n = 12-

14/grupo) foi tratado por via oral (v.o.) com dose: 500mg do óleo-resina (solução em *tween* 1,25%: etanol 15% em salina fisiológica), sendo 01 hora antes da injeção subplantar de 50 µL de carragenina (06 mg/mL) em salina estéril administrada na região subplantar da pata direita. Um segundo Grupo de animais (n = 06/grupo) foi tratado topicamente na região do edema da pata (pata direita) com óleo-resina de copaíba da espécie *copaifera reticulata* veiculada na forma tópica *in natura* (dose de 50µl) pelo ultrassom (frequência de 03 MHz; área de irradiação efetiva (ERA) 3,6cm<sup>2</sup>; modo de corrente pulsado (frequência do pulso = 100Hz – 1/2); intensidade média de 0,4 W/cm<sup>2</sup>, durante cinco minutos, em movimento circular horário do cabeçote), na região subplantar da pata direita, sendo 01 hora antes da injeção subplantar de 50 µL de carragenina (06 mg/mL) em salina estéril administrada na região subplantar da pata direita. O edema de pata foi avaliado em pletismômetro (*Plethysmometer* modelo 7140, Ugo Basile, Itália) pela diferença de volume das patas no tempo zero (t<sub>0</sub>) e nos diferentes intervalos de tempo: 01h e 03h horas após a injeção de carragenina (t<sub>x</sub>), onde o volume da pata foi novamente aferido, usando a técnica descrita por Ferreira (1979) adaptada para camundongos por Henriques e colaboradores (1987). Após o término do experimento, os animais foram eutanasiados em câmara de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). O índice de edema (IE) foi calculado pela fórmula supracitada.

### **5.6.5 Modelo inflamatório de bolsa de ar (*air pouch*)**

O modelo de bolsa de ar (*air pouch*) descrito previamente por Selye (1953) e adaptado por Ghosh e colaboradores (2000), foi utilizado para avaliar o efeito anti-inflamatório do óleo-resina de copaíba da espécie *copaifera reticulata* (*in natura*). Os camundongos SW machos (n = 07/grupo) foram anestesiados com inalação de isoflurano e seus dorsos foram desinfetados com álcool iodado. Um volume de 5 mL de ar estéril (obtido através de captação dentro do fluxo laminar) foi injetado via subcutânea (s.c.) no dorso dos animais formando uma cavidade (bolha). Três dias depois, foi re-injetados 3 mL de ar estéril para a manutenção da bolha. No sexto dia, a inflamação foi induzida pela injeção de 1 mL de carragenina 1% (em salina fisiológica estéril) dentro da bolha para os grupos de inflamação e solução salina para o grupo controle, uma hora antes a indução da inflamação os animais foram tratados, conforme a distribuição dos grupos de tratamento descritos a seguir:

- Grupo experimental 01 (n= 07) – Carragenina + Óleo-resina de copaíba + Ultrassom: Animais tratados com o óleo-resina de *copaifera reticulata* (*in natura*) veiculada de forma tópica através do ultrassom (frequência de 03 MHz; área de irradiação efetiva (ERA) 3,6cm<sup>2</sup>; modo de corrente pulsado (frequência do pulso = 100Hz – 1/2); intensidade média de 0,4 W/cm<sup>2</sup>, durante cinco minutos, em movimento circular horário do cabeçote) na região epilada da bolsa de ar;
- Grupo experimental 02 (n= 07) – Carragenina + Diclofenaco dietilamônio + Ultrassom: Animais tratados com o diclofenaco dietilamônio na dose de 11,6mg/g de forma tópica através de ultrassom (frequência de 03 MHz; área de irradiação efetiva (ERA) 3,6cm<sup>2</sup>; modo de corrente pulsado (frequência do pulso = 100Hz – 1/2); intensidade média de 0,4 W/cm<sup>2</sup>, durante cinco minutos, em movimento circular horário do cabeçote), na região epilada da bolsa de ar;
- Grupo experimental 03 (n= 07) – Carragenina + óleo mineral + Ultrassom: O grupo de Animais recebeu somente injeção de carragenina dentro da bolsa de ar e recebeu aplicação de óleo mineral forma tópica através de ultrassom (frequência de 03 MHz; área de irradiação efetiva (ERA) 3,6cm<sup>2</sup>; modo de corrente pulsado (frequência do pulso = 100Hz – 1/2); intensidade média de 0,4 W/cm<sup>2</sup>, durante cinco minutos, em movimento circular horário do cabeçote), na região epilada da bolsa de ar;
- Grupo experimental 04 (n= 07) – Solução salina + óleo mineral + Ultrassom: O grupo recebeu somente solução salina fisiológica estéril (01 mL) injetada dentro da bolsa de ar e recebeu aplicação de óleo mineral forma tópica através de ultrassom (frequência de 03 MHz; área de irradiação efetiva (ERA) 3,6cm<sup>2</sup>; modo de corrente pulsado (frequência do pulso = 100Hz – 1/2); intensidade média de 0,4 W/cm<sup>2</sup>, durante cinco minutos, em movimento circular horário do cabeçote), na região epilada da bolsa de ar.

Ao término da administração das condutas terapêuticas nos grupos tratados, os camundongos foram sacrificados por inalação de CO<sub>2</sub>. As cavidades subcutâneas foram cuidadosamente abertas e lavadas com 1 mL de salina fisiológica com EDTA 2mM. Os exsudatos foram coletados e imediatamente acondicionados em gelo. O exsudato foi analisado quanto ao volume (descontado o volume de solução fisiológica injetada), conteúdo total de proteínas, número total de leucócitos e análise celular.



#### 5.6.5.1 Contagem total de leucócitos

A contagem de leucócitos totais foi realizada diluindo-se (1:20) uma alíquota do exsudato em solução de violeta de genciana a 1% em salina fisiológica. A contagem das células foi realizada em câmara de *Neubauer*, por microscopia de luz. A concentração de células presentes na cavidade foi obtida multiplicando-se o número de células contadas na câmara de *Neubauer* pelo fator de correção da câmara e pelo fator de diluição das amostras, sendo expressa em número de leucócitos totais  $\times 10^6$  /mL de exsudato.

#### 5.6.6 Modelo de Contorção abdominal induzida por ácido acético (*Writhing test*).

O modelo baseia-se nas contorções, que são definidas por uma série de contrações e alongamentos dos músculos abdominais acompanhadas por torção do tronco e extensão dos membros posteriores, o que irá promover o contato do músculo abdominal do camundongo com o fundo do recipiente no qual o mesmo se encontra. O ensaio das contrações é muito utilizado na determinação da atividade antinociceptiva periférica.

Portanto, para avaliação do potencial analgésico do óleo-resina de copaíba da espécie *copaifera reticulata*, foi utilizado o modelo de contorção abdominal induzida por ácido acético (KOSTER *et al.*, 1959; COSTA *et al.*, 2003). Os animais (Grupos de n = 06/grupo) foram pesados e separados de acordo com seus grupos correspondentes e 01 hora antes do tratamento via oral foi retirado o alimento e a água dos animais. O óleo-resina de copaíba foi administrado por via oral em diferentes doses: 10mg, 100mg e 500mg do óleo-resina (solução em *tween* 1,25%: etanol 15% em salina fisiológica), sendo 200  $\mu$ L/animal. Como controles positivos foram administrados dipirona (200 mg/kg p.c.) administrado via oral (v.o) e Ácido acetilsalicílico - AAS (200 mg/kg p.c.) por via oral (v.o). Uma hora após o tratamento foi injetado por via intraperitoneal (10  $\mu$ L/kg p.c.) ácido acético a 0,8%, droga que induz contrações da musculatura abdominal e/ou alongamento dos membros posteriores. As contorções são observadas 05 minutos após o estímulo por um período de 15 minutos. Após o término do experimento, os animais foram eutanasiados em câmara de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>).

Os valores foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão do número total de Contorções.

## 5.7 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS UTILIZADOS NOS MODELOS EXPERIMENTAIS E DESTINO DAS CARCAÇAS

Após a eutanásia (os animais foram sacrificados em câmara de CO<sub>2</sub>) e a consequente extração do exsudato para os grupos de animais utilizados no modelo de pleurisia induzida por LPS e modelo inflamatório de bolsa de ar (*air pouch*), as carcaças dos animais foram armazenadas em sacos plásticos apropriados. Posteriormente, foram destinadas ao freezer (exclusivo para este fim) do Laboratório de Inumofarmacologia da Fundação Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ - RJ. Neste, permaneceram por 02 (dois) dias, (48 horas), até serem recolhidos e destinados ao lixo hospitalar da Fundação Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ - RJ. Este lixo é recolhido por uma empresa privada especializada que possui convênio com a FIOCRUZ para ser incinerado.

## 5.8 ESTUDO ESTATÍSTICO

Para avaliar as hipóteses referentes às atividades antiedematogênica e antinociceptiva nas concentrações do óleo-resina de copaíba da espécie *copaifera reticulata* foi aplicado um método paramétrico de estatística inferencial, a análise de variância (ANOVA), com múltiplas comparações pelo pós-teste de Tukey, conforme recomenda Rosner (1987).

Foi previamente fixado o nível de significância  $\alpha = 0.05$  para rejeição da hipótese nula. Os testes de hipótese foram realizados sob o suporte computacional dos softwares *BioEstat* versão 5.0 e *Graph Pad PRISM* versão 4.

## 6 - AVALIAÇÃO DO RISCO X BENEFÍCIO DA PESQUISA:

Conforme o Artigo III dos Princípios Éticos de Experimentação Animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) que diz:

*“Procedimentos que envolvam animais, devem prever e se desenvolver considerando sua relevância para a saúde humana e animal, a aquisição de conhecimentos ou bem estar da sociedade”.*

Podemos delinear alguns aspectos específicos em relação aos riscos e benefícios do experimento em questão, levando em conta suas contrapartidas para os pesquisadores, para os animais envolvidos na pesquisa e para a ciência como um todo.

Os animais configuram elemento de fundamental importância no experimento, e por isso teve-se consciência que o animal é dotado de sensibilidade, de memória e que sofre sem poder escapar à dor.

Os possíveis riscos associados aos animais envolvidos no experimento foram os seguintes:

- Ocorrência de processos infecciosos durante os procedimentos da pesquisa;
- Sofrer dor ou angústia intensa ou crônica durante o processo de indução da ferida e ressecção do fragmento de pele para a análise histológica;
- Os animais podem morrer em consequência da anestesia, da lesão ou do sofrimento.

O pesquisador também possuiu risco associado aos procedimentos da pesquisa, foram eles:

- Ocorrência de mordedura dos animais, causando processos infecciosos ou doenças transmissíveis, como é o caso da raiva;
- Lesão epitelial durante a manipulação dos instrumentos cirúrgicos;

Os benefícios para a ciência foram consequentes aos resultados gerados pela pesquisa, foram eles:

- Respeito às normas de vivisseção animal em vigor, respaldando o trabalho e o pesquisador;
- Respostas para o problema da pesquisa;
- Base científica para futuros estudos em humanos;
- Formulação de protocolos para o tratamento de processo inflamatório com óleo-resina de copaíba e/ou ultrassom terapêutico, seja em animais ou como em seres humanos.

Para o pesquisador os benefícios da pesquisa foram de natureza técnica:

- Qualificação técnica nos procedimentos experimentais com o uso de plantas medicinais;
- Estimulo à produção científica;
- Aprimoramento e atualização técnica.

É preciso tomar providências para que haja o controle dos riscos inerentes à pesquisa, ou mesmo prevenção destes. Para tanto, os animais foram tratados com instrumental adequado, anestesiados de forma segura e controlada, assegurando a reversibilidade da depressão do sistema nervoso. Além disso, os animais foram provenientes de uma instituição idônea, a fim de assegurar sua integridade de saúde, proporcionando maior segurança ao pesquisador, pois se tratou de um biotério com normas rígidas de padrão internacional no trato com os animais de pesquisa.

As medidas adotadas durante a realização dos procedimentos concorreram para a segurança dos procedimentos e garantias do sucesso da pesquisa.

## 7 RESULTADOS

### 7.1 MODELO DE EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA (Cg)

A análise transversal referente ao T0 o p-valor = 0.0811 indica que os grupos apresentam volumes estatisticamente iguais no instante inicial. No intervalo transversal referente ao T1 os grupos C10, C100 e C500 apresentaram menor volume (p-valor < 0.05) da pata dos camundongos uma hora após a introdução do agente inflamatório em relação ao grupo Cg. Ocorreu diferença significativa entre os grupos Cg e Indo (p-valor < 0.05), enquanto que não houve real diferença entre os grupos tratados com copaíba e o grupo Indometacina, visto que, as comparações apresentaram p-valor > 0.05.

No intervalo transversal referente ao T3, em relação ao grupo Cg os grupos C100 e C500 apresentaram menor volume (p-valor < 0.05) três horas após a introdução do agente inflamatório. Não houve real diferença entre os grupos tratados com copaíba e o grupo Indometacina, visto que, as comparações apresentaram p-valor > 0.05.

No intervalo transversal referente ao T6, em relação ao grupo Cg os grupos C10 e C500 apresentaram redução do volume (p-valor < 0.05) seis horas após a introdução do agente inflamatório. Houve real diferença entre o grupo tratado com C100 e o grupo Indometacina, sendo que o grupo C100 apresentou volume significativamente maior que o grupo Indo (p-valor < 0.05), conforme está mostrada na Tabela 4.

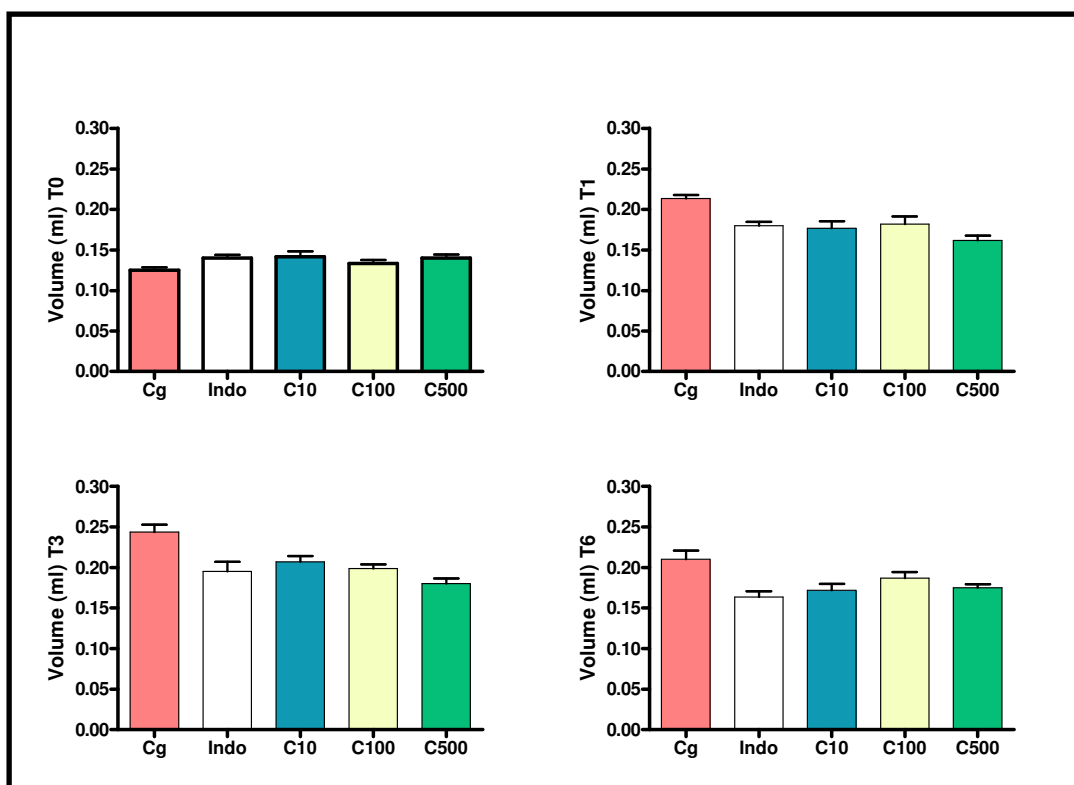
**Tabela 4: Atividade antiedematogênica da *Copaifera reticulata* relativa ao volume, após estímulo com Carragenina na pata.**

Volume (ml)	Cg (n=6)	Indo (n=6)	C10 (n=6)	C100 (n=6)	C500 (n=6)	p-valor	p-valor<0.05*
<b>T0</b>						0.0811	
Média±dp	0.125±0.008	0.14±0.009	0.142±0.016	0.133±0.010	0.140±0.011		
Mediana	0.120	0.140	0.140	0.130	0.140		
(1°Q, 3°Q)	0.12, 0.128	0.132, 0.148	0.14, 0.14	0.13, 0.138	0.13, 0.150		
<b>T1</b>						0.0048*	G:1-2,1-3,1-4,1-5
Média±dp	0.213±0.010	0.18±0.011	0.176±0.022	0.181±0.023	0.161±0.015		
Mediana	0.220	0.180	0.175	0.180	0.165		
(1°Q, 3°Q)	0.205, 0.220	0.18,0.188	0.162, 0.188	0.162, 0.190	0.152, 0.170		
<b>T3</b>						0.0042*	G:1-2,1-4,1-5
Média±dp	0.243±0.023	0.195±0.029	0.207±0.018	0.170±0.013	0.180±0.015		
Mediana	0.245	0.195	0.215	0.200	0.180		
(1°Q, 3°Q)	0.225, 0.25	0.183, 0.215	0.195, 0.22	0.193, 0.200	0.170, 0.190		
<b>T6</b>						0.0091*	G:1-2,1-3,1-

	5,2-4				
Média±dp	0.21±0.027	0.163±0.018	0.171±0.019	0.186±0.019	0.175±0.010
Mediana (1°Q, 3°Q)	0.200 (0.193, 0.215)	0.155 (0.150, 0.175)	0.165 (0.160, 0.17)	0.190 (0.175, 0.1975)	0.175 (0.170, 0.18)
<b>p-valor</b>	0.0007*	0.0022*	0.0016*	0.0021*	0.0029*
<b>p-valor&lt;0.05*</b>	T0-T1 T0-T3 T0-T6	T0-T1 T0-T3	T0-T1 T0-T3	T0-T1 T0-T3 T0-T6	T0-T3 T0-T6

Fonte: Dados da pesquisa de campo - 2008. Nota: 1-Cg, 2-Indo, 3-C10, 4-C100, 5-C500. \* ANOVA com post-hoc de Tukey

A figura 13 mostra o efeito da *Copaifera Reticulata* e suas doses no edema de pata induzido por carragenina em função do tempo. Prospectivamente (T0 → T1 → T3 → T6), o grupo C500 foi o único que não apresentou aumento significativo do volume entre os instantes T1 e T3. Os grupos Indo, C10 e C500 apresentaram significativa redução do volume em T6.



**Figura 13:** Efeito da *Copaifera reticulata* e suas concentrações no edema agudo de pata induzido por carragenina. As doses (em mg/Kg p.c.) foram administradas por via oral uma hora antes da injeção subplantar de carragenina (300µg/50µL). Como controle, um grupo de animais foi tratado com indometacina (10mg/Kg p.c.) via i.p. Evolução do Volume nos grupos Cg, Indo, C10, C100 e C500 nos intervalos T0, T1, T3 e T6.

No intervalo transversal referente ao T1 os grupos C10 e C500 apresentaram menor índice de edema (p-valor <0.05) uma hora após a introdução do agente inflamatório em relação ao grupo Cg. Não houve real diferença entre os grupos tratados

com copaíba e o grupo Indometacina, visto que, as comparações apresentaram p-valor >0.05.

No intervalo transversal referente ao T3 os grupos C10, C100 e C500 apresentaram menor índice de edema (p-valor < 0.05) três horas após a introdução do agente inflamatório em relação ao grupo Cg. Não houve real diferença entre os grupos tratados com copaíba e o grupo Indometacina, visto que, as comparações apresentaram p-valor >0.05.

No intervalo transversal referente ao T6 os grupos C10 e C500 apresentaram menor índice de edema (p-valor <0.05) da pata dos camundongos seis horas após a introdução do agente inflamatório em relação ao grupo Cg. Houve real diferença entre o grupo tratado com C100 e o grupo Indometacina, sendo que o grupo C100 apresentou mais altos índices de edema que o grupo Indometacina, p-valor < 0.05, conforme é mostrada na tabela 5.

**Tabela 5: Atividade da *Copaifera reticulata* relativa ao Índice do Edema, após estímulo com carragenina na pata, conforme os Instantes (T1, T3, T6) e os Grupos (Cg, Indo, C10, C100, C500).**

Índice do Edema	Cg (n=6)	Indo (n=6)	C10 (n=6)	C100 (n=6)	C500 (n=6)	p-valor	p-valor<0.05*
<b>T1</b>						0.0063*	G:1-2,1-3,1-5
Média±dp	71.46±15.93	29.10±12.71	26.58±26.12	37.06±21.68	15.81±11.10		
Mediana	76.28	27.86	17.86	28.72	16.67		
(1°Q, 3°Q)	67.31, 83.33	20.00, 37.77	8.93, 32.14	23.97, 51.44	9.103, 22.31		
<b>T3</b>						0.0048*	G:1-2,1-3,1-4,1-5
Média±dp	96.06±28.07	38.82±14.12	47.99±24.94	50.01±20.53	29.57±18.23		
Mediana	104.17	53.67	44.23	50.00	28.72		
(1°Q, 3°Q)	76.92, 108.33	51.55, 66.54	40.51, 64.68	43.68, 53.85	16.67, 42.31		
<b>T6</b>						0.0021*	G:1-2,1-3,1-5,2-4
Média±dp	68.89±26.9	17.23±16.16	22.22±17.41	40.15±11.46	25.56±11.56		
Mediana	58.33	11.26	17.86	37.48	21.54		
(1°Q, 3°Q)	54.97, 77.08	6.79, 30.63	14.29, 30.36	33.01, 49.20	20.0, 28.85		
<b>p-valor</b>	0.2006	0.0544	0.1847	0.5644	0.3282		

**Fonte:** Dados da pesquisa de campo - 2008. **Nota:** 1-Cg, 2-Indo, 3-C10, 4-C100, 5-C500. \* ANOVA com post-hoc de Tukey.

Prospectivamente (T1 → T3 → T6) não houve diferença estatisticamente significativa no Índice do Edema, dentro dos grupos (Indo, C10, C100 e C500), entre os instantes T1, T3 e T6, sendo no entanto significativamente estatística a diferença entre os grupos de tratamento (Indo, C10, C100 e C500) e o grupo Cg, conforme é mostrada na figura 14.

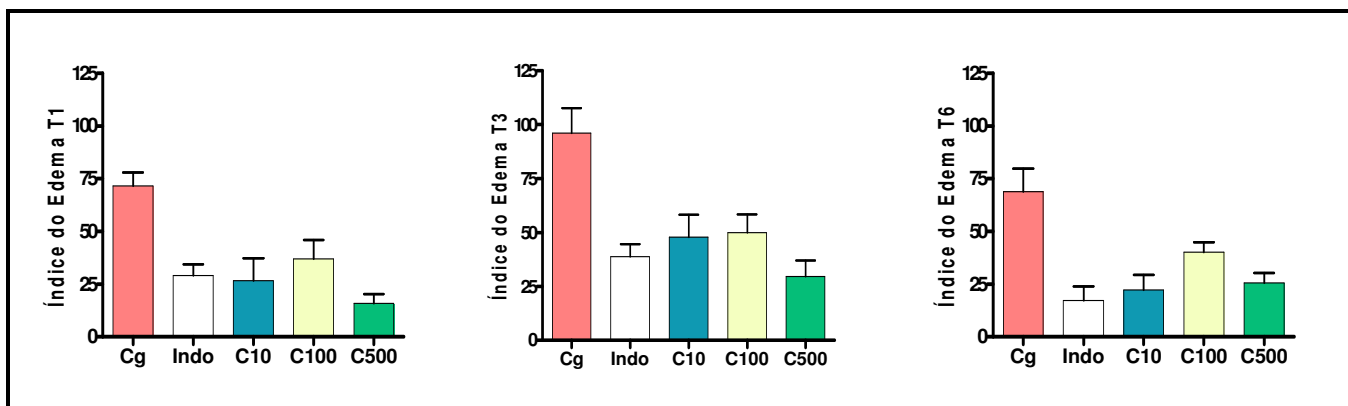


Figura 14: Índice do Edema conforme os Instantes (T1, T3, T6) e os Grupos (Cg, Indo, C10, C100, C500).

Na avaliação do Índice de Inibição do Edema no intervalo transversal não houve significância estatística entre os grupos Tratados (Indo, C10, C100 e C500), conforme mostrada na tabela 6.

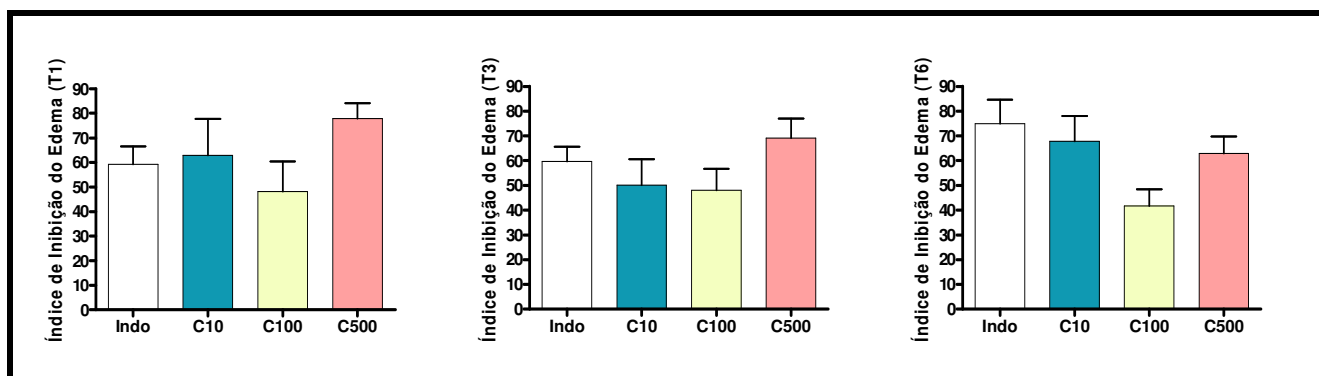
Tabela 6: Índice de Inibição do Edema conforme os Instantes (T1, T3, T6) e os Grupos (Indo, C10, C100, C500).

Índice de Inibição do Edema	Indo (n=6)	C10 (n=6)	C100 (n=6)	C500 (n=6)	p-valor
<b>T1</b>					0.2278
Média±dp	59.27±17.78	62.81±36.56	48.13±30.34	77.87±15.54	
Mediana	61.01	75.01	59.81	76.67	
(1°Q, 3°Q)	47.13, 72.01	55.01, 87.50	28.0, 66.45	68.78, 87.26	
<b>T3</b>					0.2669
Média±dp	59.58±14.70	50.04±25.96	47.94±21.37	69.21±18.98	
Mediana	53.67	44.23	47.95	70.10	
(1°Q, 3°Q)	51.55, 66.54	40.51, 64.68	43.95, 54.53	55.96, 82.65	
<b>T6</b>					0.0776
Média±dp	75.00±23.46	67.75±25.27	41.72±16.63	62.91±16.79	
Mediana	83.65	74.08	37.48	68.74	
(1°Q, 3°Q)	55.54, 90.15	55.94, 79.27	33.01, 49.20	58.13, 70.97	
<b>p-valor</b>	0.4131	0.4201	0.6753	0.3175	

Fonte: Dados da pesquisa de campo - 2008. ANOVA com post-hoc de Tukey.



Prospectivamente (T1 → T3 → T6): Não houve significância estatística quanto ao índice de inibição do edema em cada grupo, conforme figura 15.



**Figura 15:** Índice de Inibição do Edema conforme os Instantes (T1, T3, T6) e os Grupos (Indo, C10, C100, C500).

## 7.2 MODELO DE EDEMA DE PATA INDUZIDO POR BRADICININA (BK)

A avaliação quantitativa do efeito antiedematogênico do óleo-resina de copaíba foi realizada através da Análise de Variância (ANOVA) do Índice do Edema na pata do animal. Somente no instante T120 observou-se algum indício da eficácia do tratamento fitoterápico.

A avaliação transversal dos indicadores de Índice do Edema, nos intervalos T10, T30 e T60, não atestou diferença estatisticamente significativa ( $p = 0.5829$ ) entre os quatro grupos, portanto, este estudo inferiu que até o instante T60 não há evidências suficientes para atestar a atividade antidermatogênica dos grupos C10, C100 e C500.

Merece destaque a avaliação do grupo C100 no instante T120. Nesse instante observou-se redução do edema com diferença de 24.1% em relação ao C500. Entretanto, a diferença de 7.1%, entre o C100 e o Bk, quando foi avaliada pelo pós teste de Tukey não apresentou variação estatisticamente significativa ( $p > 0.05$ ).

**Tabela 7:** Índice de edema de pata induzido por bradicina nos intervalos de tempo – T10, T30, T60 e T120.

	Bk (n=8)	C10 (n=8)	C100 (n=8)	C500 (n=8)	p-valor
T10					0.5829
Min-Máx	25-69.23	14.29-76.92	21.43-	35.71-75	
Média±dp	48.4±16.4	48.8±25.0	42.8±23.5	57±14	
Mediana	50	51.6	30.9	61.5	
P25-P75	38.4-59.8	28.4-69.2	26.7-55.4	45.3-66.7	
T30					0.9280

Min-Máx	25-58.33	28.57-91.67	21.43-92.31	7.69-76.92	
Média±dp	45.8±13.1	48.9±21.0	42.0±23.2	46.3±23.8	
Mediana	48.1	44.5	34.5	46.4	
P25-P75	39.3-57.4	36.5-51.3	28.1-44.6	34.2-66.7	
T60					0.0528
Min-Máx	28.57-69.23	14.29-92.31	0-42.86	15.38-66.67	
Média±dp	51±13	43±28	25.3±14.6	41.2±16.1	
Mediana	53.57	40.4	32	42.3	
P25-P75	43.5-58.3	20-57.1	13.3-33.9	30.2-51.0	
T120					0.0342*
Min-Máx	0-33.33	-7.14-50	-13.33-46.15	7.69-50	
Média±dp	17.3±12.5	25±20.3	10.1±17.3	34.2±13.1	
Mediana	18.7	23.08	10.2	37.1	
P25-P75	10.7-25.9	13.3-41.3	0-13.6	32.6-41.7	

Fonte: Dados da pesquisa de campo – 2008. \*ANOVA com *post hoc* Teste de Tukey

A Figura 16 mostra a média e a variabilidade (desvios padrões) nos quatro grupos no instante T120, observou-se diferença de 24.1% entre os grupos C100 e C500, a qual obteve relevância estatisticamente significativa ( $p < 0.05$ ) a ser considerada. A diferença de 7.1% entre o C100 e o Bk não foi estatisticamente significativa ( $p > 0.05$ ).

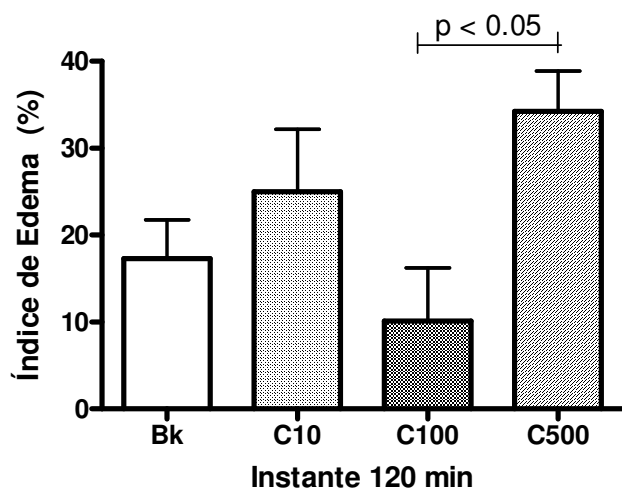


Figura 16: Índice do Edema (%) na pata do animal no T120.

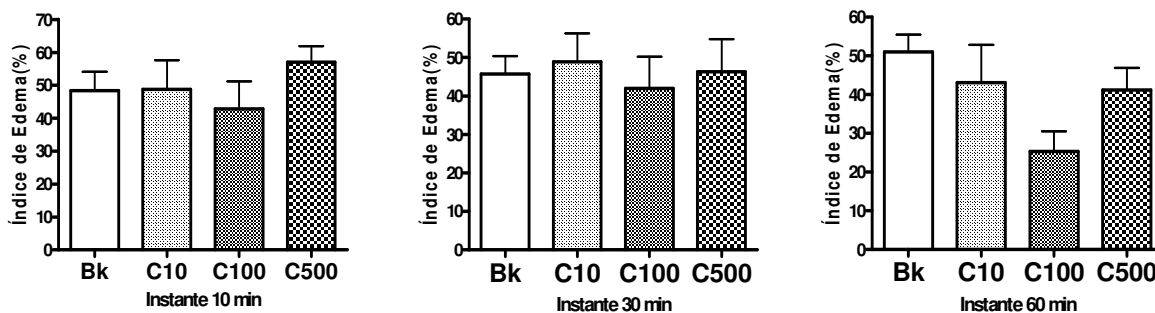
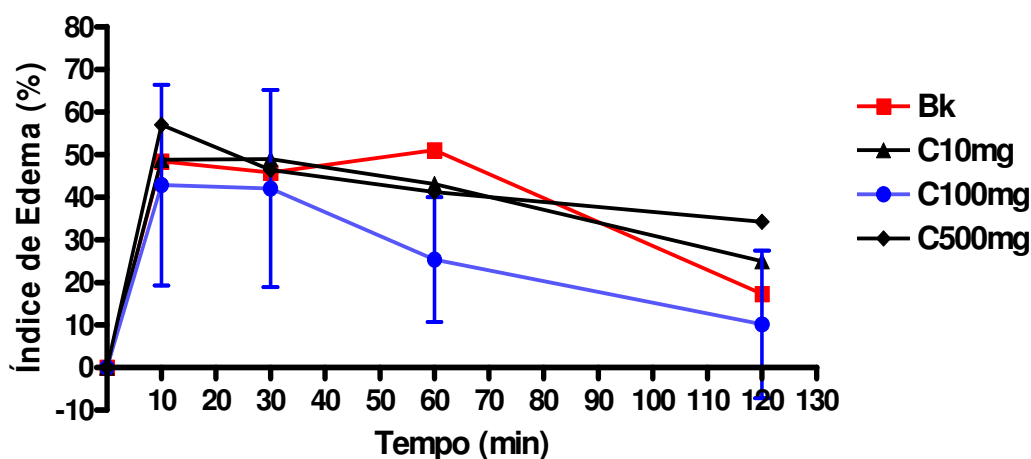


Figura 17: Índice do Edema (%) na pata do animal nos tempos T10, T30 e T60. Neste instante não foi quantitativamente evidente o efeito do tratamento.

A evolução prospectiva do experimento mostrou que nos grupos Bk e C100 a inflamação atingiu os níveis máximos no T10 e foi reduzindo significativamente ( $P < 0.01^*$ ) nos instantes T30 e T60 até atingir o nível mínimo em T120.



**Figura 18:** Desenvolvimento longitudinal do experimento. Evidencia a relação do índice de edema (%) com o tempo (minuto) para a bradidicidina (Bk), copaíba (C10mg), copaíba (100mg) e copaíba (500mg).

### 7.3 MODELO DE PLEURISIA INDUZIDA POR LPS

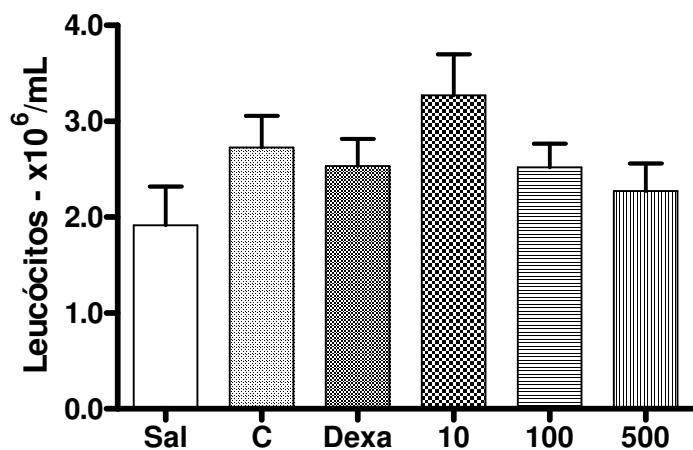
A variação do número de leucócitos, após o experimento, revelou que não houve variações estatisticamente significantes entre os grupos, visto que, o  $p$ -valor = 0.1488, o que permite a conclusão pela hipótese de nulidade, ou seja, que não há evidências de associação entre as intervenções e a alteração do número de leucócitos, conforme mostra na tabela 8.

**Tabela 8:** Número de Leucócitos conforme os grupos (Sal, LPS, Dexa, C10, C100, C500).

	Sal (n=6)	C (n=8)	Dexa (n=6)	C10 (n=7)	C100 (n=6)	C500 (n=7)
Min-Máx	1.1-3.8	1.9-4.5	1.3-3.4	1.5-4.9	2.0-3.6	1.4-3.5
Média±dp	1.92±0.98	2.73±0.95	2.53±0.7	3.27±1.13	2.52±0.62	2.27±0.76
Mediana	1.6	2.4	2.6	3.4	2.25	2.1
P25-P75	1.4-2.0	2.0-3.1	2.4-2.9	2.8-3.8	2.1-2.8	1.7-2.8

P-valor = 0.1488, ANOVA. ANOVA com *post hoc* Teste de Tukey.

Na análise do número de leucócitos na figura 19, verifica-se a redução quantitativa do número leucócitos, sem, no entanto, possuir evidência estatisticamente significativa, face ao desvio padrão encontrado nas amostras.



**Figura 19:** Efeito do tratamento com as doses da *copaifera reticulata* na migração de leucócitos induzida por LPS no modelo de pleurisia. As doses foram administradas por via oral. 1 hora antes do estímulo com o LPS (250 ng/cavidade). Como controles, um grupo foi tratado com dexametasona (Dexa 0,5 mg/kg i.p.), outro não recebeu o agente flogístico (Salina). Os resultados estão expressos em média  $\pm$  DP (n=6-8/grupo). Pelo teste de Tukey.

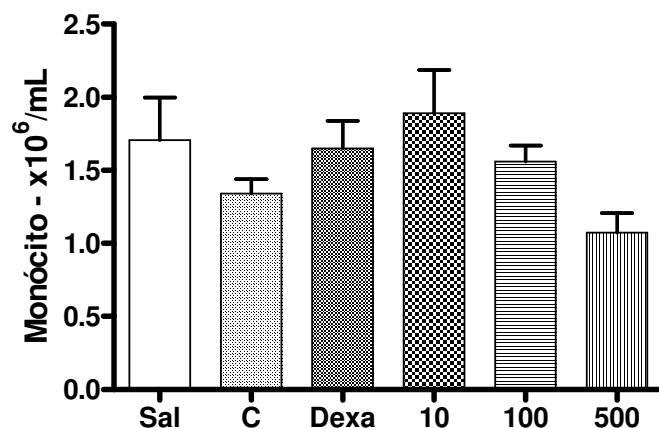
A avaliação estatística do número de monócitos, após o experimento, revelou que não houve variações estatisticamente significantes entre os grupos, visto que, o p-valor = 0.0692, permite a conclusão pela hipótese de nulidade, ou seja, que, também, não ocorrem evidências de associação entre as intervenções e a alteração do número de monócitos, conforme tabela 9.

**Tabela 9:** Número de monócitos conforme os grupos (Sal, LPS, Dexa, C10, C100, C500).

	Sal (n=6)	C (n=8)	Dexa (n=6)	C10 (n=7)	C100 (n=6)	C500 (n=7)
Min-Máx	1.1-3.002	0.98-1.8	0.832-2.204	0.615-2.891	1.08-1.8	0.684-1.484
Média $\pm$ dp	1.708 $\pm$ 0.706	1.341 $\pm$ 0.274	1.65 $\pm$ 0.460	1.891 $\pm$ 0.779	1.560 $\pm$ 0.267	1.074 $\pm$ 0.35
Mediana	1.4215	1.292	1.7145	2.244	1.5955	0.96
P25-P75	1.301-1.887	1.156-1.531	1.586-1.847	1.455-2.29	1.509-1.756	0.784-1.411

p-valor = 0.0692, ANOVA com *post hoc* Teste de Tukey.

Na análise do número de monócitos na figura 20 verificamos a redução do número de monócitos com o tratamento no grupo C500 em relação aos demais grupos de tratamento (Dexa, C10 e C100), sem, no entanto, possuir evidencia estatisticamente significativa, face ao desvio padrão encontrado nas amostras.



**Figura 20:** Efeito do tratamento com as doses da *copaifera reticulata* na migração de monócitos induzida por LPS no modelo de pleurisia. As doses foram administradas por via oral, 1 hora antes do estímulo com o LPS (250 ng/cavidade). Como controles, um grupo foi tratado com dexametasona (Dexa 0,5 mg/kg i.p.), outro não recebeu o agente flogístico (Salina). Os resultados estão expressos em média  $\pm$  DP (n=6-8/grupo). Pelo teste de Tukey.

Na análise do número de neutrófilo. Ao avaliar-se o número de neutrófilos (ver Figura 21) foram principalmente observadas algumas diferenças pontuais dos grupos Sal, Dexa, C10, C100 e C500 em relação ao grupo Controle. Para avaliar se essas diferenças são reais, foi aplicado o método ANOVA.

Somente o grupo Sal ( $0.1988 \pm 0.3216$ ) apresentou quantidade de neutrófilos, significativamente, menor (p-valor < 0.001\*) em relação ao grupo Controle ( $1.375 \pm 0.584$ ).

Nos grupos C10 ( $1.38 \pm 0.435$ ) e C500 ( $1.197 \pm 0.508$ ) observou-se contagem de neutrófilos significativamente (p-valor < 0.001\*) maiores que o grupo Sal ( $0.1988 \pm 0.3216$ ).

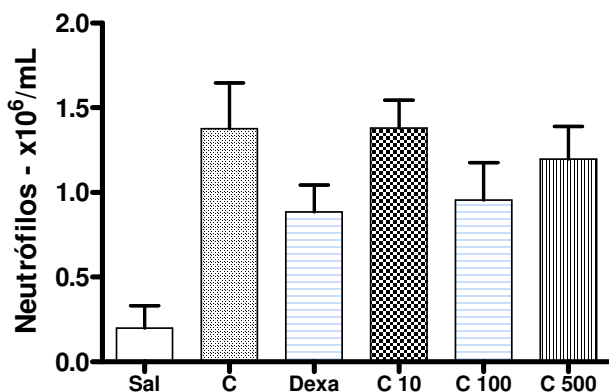
Não foram observadas diferenças estatisticamente significante entre todas as opções de terapia anti-inflamatória (Dexa, C10, C100, C500), entretanto, destacaram-se com a menor diferença (0.073 neutrófilos) os grupos Dexa ( $0.884 \pm 0.395$ ) e C100 ( $0.957 \pm 0.537$ ), embora essa diferença não seja significativa ao nível alfa = 0.05.

**Tabela 10:** Número de neutrófilos conforme os grupos - Sal, LPS, Dexa, C10, C100, C500.

	Sal (n=6)	C (n=8)	Dexa (n=6)	C10 (n=7)	C100 (n=6)	C500 (n=7)
Min-Máx	0 - 0.798	0.684 - 2.7	0.468 - 1.564	0.885 - 2.009	0.418 - 1.8	0.63 - 2.135
Média $\pm$ dp	$0.1988 \pm 0.3216$	$1.375 \pm 0.584$	$0.884 \pm 0.395$	$1.38 \pm 0.435$	$0.957 \pm 0.537$	$1.197 \pm 0.508$
Mediana	0.0275	1.126	0.756	1.156	0.7705	1.242
P25-P75	0.003-0.266	0.8751-1.546	0.662-1.034	1.119-1.686	0.596-1.274	0.878-1.309

P-VALOR = 0.0032, ANOVA 1 critério - *post hoc* Teste de Tukey.

Na análise da figura 21 verifica-se evidências quantitativas de redução do número de neutrófilos nos grupos Dexa e C100 em relação aos grupos C, C10 e C500, sem, entretanto, possuir significância estatística em decorrência do desvio padrão existente entre os grupos.



**Figura 21:** Efeito do tratamento com as doses da *copaifera reticulata* na migração de neutrófilos induzida por LPS no modelo de pleurisia. As doses foram administradas por via oral, 1 hora antes do estímulo com o LPS (250 ng/cavidade). Como controles, um grupo foi tratado com dexametasona (Dexa 0,5 mg/kg i.p.), outro não recebeu o agente flogístico (Salina). Os resultados estão expressos em média  $\pm$  DP (n=6-08/grupo). Pelo teste de Tukey.

#### 7.4 MODELO DE EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA (Cg) COM VEICULAÇÃO DO ULTRASSOM.

Na avaliação do efeito, após 1 hora das ministrações do óleo-resina de copaíba em duas modalidades: 500mg oral e tópica (*in natura*) veiculada através ultrassom, foram observadas diferenças entre as médias dos dois tratamentos em relação ao grupo controle. Para avaliar a hipótese de haver real redução do índice do edema foi utilizado o método estatístico da análise de variância (ANOVA) seguida de múltiplas comparações pelo pós-teste de Tukey.

A comparação entre Copaíba 500mg oral e Copaíba tópico (*in natura*) veiculada através do ultrassom teve diferença estatisticamente significativa (p-valor <0.05\*), visto que, entre a copaíba 500mg oral ( $34.8 \pm 18.8$ ) e a copaíba tópico (*in natura*) ( $15.8 \pm 9.5$ ) observou-se um delta de 19%.

Na aplicação do pós-teste de Tukey foi evidenciada a diferença (29.7%) entre o grupo Carragenina ( $43.7 \pm 20.0$ ) e o grupo Copaíba tópico (*in natura*) veiculada através

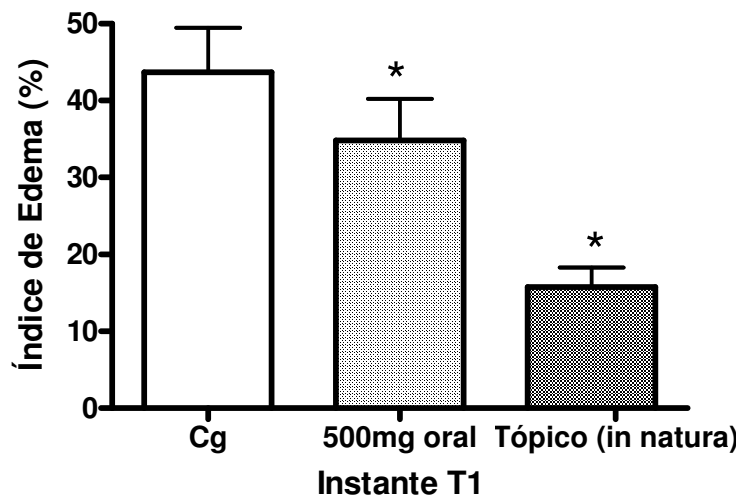
do ultrassom ( $15.8 \pm 9.5$ ), essa diferença ( $p$ -valor  $< 0.05^*$ ) foi estatisticamente significativa. Entretanto, quando o pós-teste de Tukey foi aplicado para avaliar a diferença (8.9%) entre o grupo Carragenina ( $43.7 \pm 20.0$ ) e o grupo Copaíba 500mg oral ( $34.8 \pm 18.8$ ), essa diferença ( $p$ -valor  $> 0.05^*$ ) não foi considerada estatisticamente significativa, evidenciado na tabela 11 e na figura 22.

**Tabela 11:** Índice de edema de pata induzido pela carragenina com a veiculação do ultrassom.

	Cg (n=12)	500mg oral (n=12)	tópico( <i>in natura</i> ) (n=14)	p-valor
T1				0.0006*
Min-Máx	14.3-83.3	8.33-58.33	0-36.36	
Média±dp	43.7±20.0	34.8±18.8	15.8±9.5	
Mediana	46.2	37.36	16	
P25-P75	27.7-55.0	16.3-51.0	7.85-20.0	
T3				0.0011*
Min-Máx	28.6-100	7.14-50.0	6.67-63.64	
Média±dp	55.2±21.3	31.18±13.0	28.58±17.4	
Mediana	50	34.52	26.9	
P25-P75	40.9-63.0	22.6-39.3	15-40.9	
p-valor		0.5850	0.0255**	

\*Teste ANOVA 1 critério post hoc de Tukey

\*\*Teste t de Student amostras independentes.



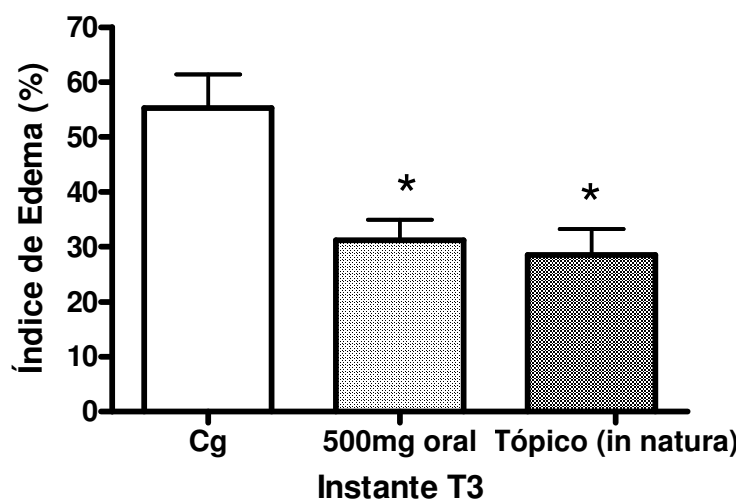
**Figura 22:** Efeito comparativo do tratamento com a *copaifera reticulata* e suas doses (500mg e *in natura*) no índice de inibição de edema, calculado em relação ao pico do edema (1 horas). As doses foram administradas por via oral (dose em mg/kg p.c.) e tópica (veiculada c/ us) 1 hora antes do estímulo com a carragenina (300 µg/50 µL). Como controle, um grupo de animais não recebeu tratamento (n = 12 - 14/grupo). Pelo teste de Tukey, todas as doses apresentaram diferença estatística em relação ao grupo da carragenina (sem tratamento) ( $p < 0,05$ ).

Na avaliação do efeito anti-inflamatório, após 3 horas, das ministrações do óleo-resina de copaíba em duas modalidades: 500mg oral e tópica (*in natura*) veiculada

através ultrassom, foram observadas diferenças entre as médias dos dois tratamentos em relação ao grupo controle. Para avaliar a hipótese de haver real redução do índice do edema foi utilizado o método estatístico da análise de variância (ANOVA) seguida de múltiplas comparações pelo pós-teste de Tukey.

A comparação entre Copaíba 500mg oral e Copaíba tópico (*in natura*) veiculada com ultrassom não houve diferença estatisticamente significativa (p-valor >0.05).

A aplicação do pós-teste de Tukey foi evidenciada a diferença (26.7%) entre o grupo Carragenina ( $55.2 \pm 21.3$ ) e o grupo Copaíba tópico (*in natura*) veiculada através do ultrassom ( $28.5 \pm 17.4$ ), essa diferença (p-valor <0.05\*) foi estatisticamente significativa. Quando o pós-teste de Tukey foi aplicado para avaliar a diferença (24%) entre o grupo Carragenina ( $55.2 \pm 21.3$ ) e o grupo Copaíba 500mg oral ( $31.18 \pm 13.0$ ), essa diferença (p-valor <0.05\*) foi estatisticamente significativa, conforme figura 23.

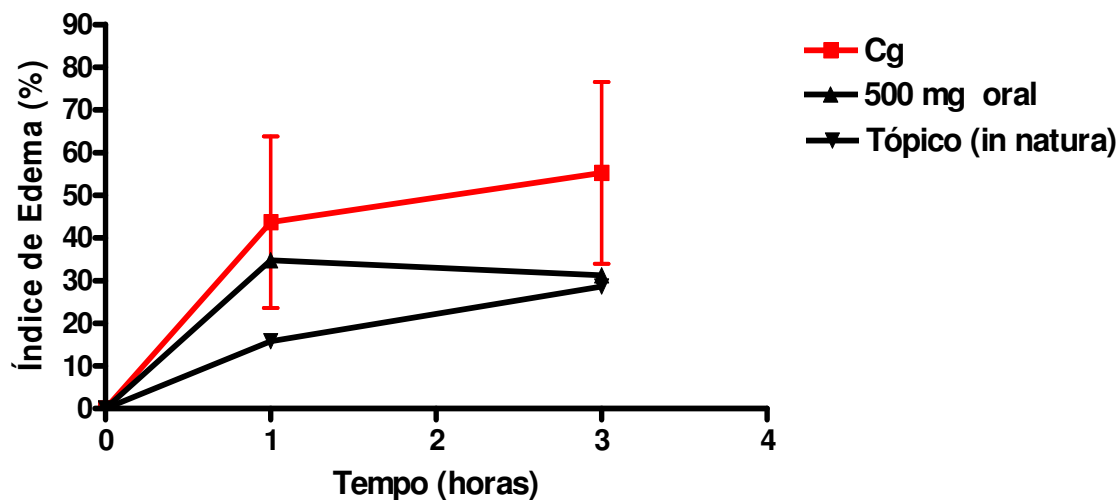


**Figura 23:** Efeito comparativo do tratamento com a *copaifera reticulata* e suas doses (500mg e *in natura*) no índice de inibição de edema, calculado em relação ao pico do edema (3 horas). As doses foram administradas por via oral (dose em mg/kg p.c.) e tópica (veiculada c/ us) 1 hora antes do estímulo com a carragenina (300 µg/50 µL). Como controle, um grupo de animais não recebeu tratamento (n = 12 - 14/grupo). Pelo teste de Tukey, todas as doses apresentaram diferença estatística em relação ao grupo da carragenina (sem tratamento) (p < 0,05).

A análise prospectiva aplicou-se o teste t Student – amostras pareadas. Análise longitudinal prospectiva do grupo que recebeu dose de copaíba 500mg oral mostrou que não houve redução significativa entre os instantes T1 e T3, visto que, o p-valor >0.05 (não significativo).



A avaliação longitudinal prospectiva T1→T3 do tratamento com óleo-resina de copaíba tópico (*in natura*) veiculada através do ultrassom mostrou que houve uma diferença estatística (p-valor=0.0255\*) entre as médias aritméticas dos instantes T1(15.8±9.5) e T3 (28.58±17.4), ou seja, o edema de pata sob o efeito de copaíba tópico (*in natura*) veiculada através do ultrassom reduziu no instante T1 em relação ao instante T3, conforme figura 24.



**Figura 24:** Efeito do tratamento com as doses da *copaifera reticulata* (500mg e tópico *in natura*) no edema agudo de pata induzida por carragenina. As doses foram administradas por via oral e tópica, 1 h antes da injeção subplantar de carragenina (300 µg/50 µL), utilizando como veículo etanol 15% Tween 1,25%. Como controle, um grupo de animais não foi tratado (n=12-14/grupo).

## 7.5 MODELO INFLAMATÓRIO DE BOLSA DE AR (*AIR POUCH*)

Na avaliação transversal, após 5 minutos de intervenção, a expressão das variáveis: Células totais e Células Mononucleares não mostraram diferenças estatisticamente significantes entre si nem em relação ao grupo copaíba.

A comparação do nível de proteínas apresentou diferença significativa (p-valor <0.01\*) somente entre Salina (0.2608±0.1557) e Carragenina (0.597±0.152), ou seja, foi evidente apenas que a inflamação na bolsa de ar (*air pouch*) foi menor na Salina quando comparada com a Carragenina.

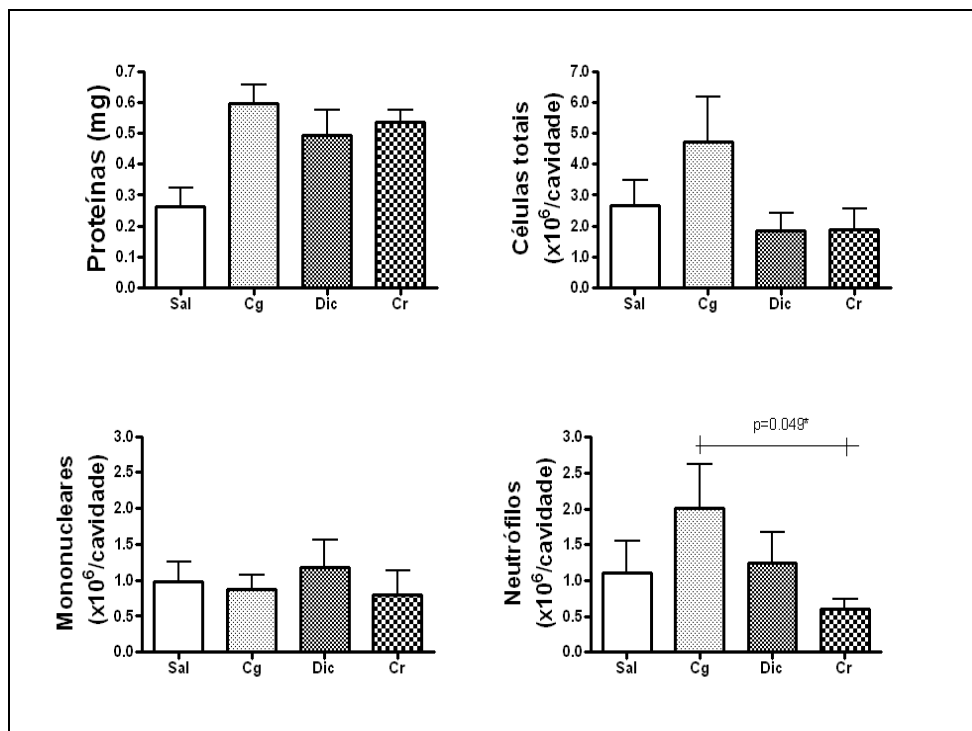
Foi observada diferença real (1.4 neutrófilos) entre os grupos Carragenina (2.0079±1.5231) e o grupo Copaíba (0.6063±0.32) o p-valor = 0.049 indica que esta diferença é estatisticamente significativa, conforme é mostrado na tabela 12 e evidenciado na figura 25.

**Tabela 12:** Avaliação do efeito da fonoforese da Copaíba *In natura*, sobre o Air pouch, em relação a três grupos controles: Salina, Carragenina, e Diclofenaco, realizada através da contagem do número de células.

	Salina (n=6)	Cg (n=7)	Dic (n=6)	Copaíba (n=6)	p-valor
<b>Células totais</b>					0.1625
Min-Máx	0.2-5.2	1.2-12.6	0.2-4.2	0.2-4.7	
Média±dp	2.7±2.0	4.7±3.9	1.9±1.4	1.9±1.6	
Mediana	2.8	2.9	1.4	1.3	
P25-P75	1.1-4.2	2.4-5-8	1.3-2.4	1.0-2.5	
<b>Proteínas</b>					0.0061*
Min-Máx	0.117-0.517	0.451-0.814	0.331-0.893	0.412-0.665	
Média±dp	0.2608±0.1557	0.597±0.152	0.4935±.2022	0.536±0.0997	
Mediana	0.214	0.545	0.4230	0.522	
P25-P75	0.145-0.339	0.478-0.708	0.4055-0.4743	0.4698-0.6125	
<b>Mononuclear</b>					0.8261
Min-Máx	0.1656-1.872	0.4176-1.5675	0.0954-2.646	0.1352-2.436	
Média±dp	0.9798±0.6796	0.8738±0.496	1.1802±0.9175	0.7904±0.8446	
Mediana	0.927	0.6912	0.9604	0.5561	
P25-P75	0.4786-1.4753	0.4961-1.2561	0.6542-1.6403	0.299-0.7733	
<b>Neutrófilo</b>					0.049*
Min-Máx	0.0144-2808	0.4608-4.7025	0.0846-3.234	0.1248-1.044	
Média±dp	1.1102±1.0908	2.0079±1.5231	1.2398±1.0828	0.6063±0.32	
Mediana	0.9455	1.5996	0.9639	0.6742	
P25-P75	0.2304-1.7033	1.0844-2.4789	0.737-1.3893	0.4361-0.7414	

\*Teste ANOVA 1 critério Post hoc de Tukey

A figura 25 evidencia a redução significativamente estatística na quantidade de células neutrófilos ( $p < 0.05^*$ ) no grupo Copaíba em relação ao grupo Carragenina, o que leva a constatação evidente da ação anti-inflamatória do óleo-resina de copaíba.



**Figura 25:** Efeito do tratamento com as doses da *copaifera reticulata* na contagem total do número de células, no número de proteínas, na migração de monócitos e neutrófilos induzida por carragenina no modelo de *air pouch*. A dose da *copaifera reticulata* foi administrada por via tópica (*in natura* 100 $\mu$ L) veiculada com ultrassom, 1 hora antes do estímulo com a carragenina (1% em solução salina). Como controles, um grupo foi tratado com diclofenaco dietilamônio (Dic = 11,6mg/g na dose 100 $\mu$ L) veiculada com ultrassom, outro não recebeu o agente flogístico (Salina), sendo tratado com óleo mineral (100 $\mu$ L) veiculado com ultrassom e outro grupo recebeu o agente flogístico (grupo Cg), sendo tratado com óleo mineral (100 $\mu$ L) veiculado com ultrassom. Os resultados estão expressos em média  $\pm$  DP (n=6-7/grupo). Pelo teste de Tukey.

## 7.6 MODELO DE CONTORÇÃO ABDOMINAL INDUZIDA POR ÁCIDO ACÉTICO (*WRITHING TEST*).

Na análise do número de contorções, o efeito analgésico da copaíba foi avaliado em relação ao grupo controle (AAS), todavia, ainda que as médias dos grupos tratados com copaíba C10 (28.0), C100 (27.8) e C500 (21.7) sejam pontualmente diferentes do grupo AAS (11.0 $\pm$ 9.1) o teste da ANOVA seguido pelas comparações feitas pelo post-hoc de Tukey aponta para a inexistência de reais diferenças (p-valor > 0.05). Entretanto, ocorreu diferença significativa (p-valor <0.05\*) entre as médias aritméticas do Veículo (34.8 $\pm$ 11.0) e o AAS (11.0 $\pm$ 9.1) e entre o Veículo (34.8 $\pm$ 11.0) e o C500 (21.7 $\pm$ 11.8). Desta forma camundongos utilizando AAS e C500 possuem menor número de contorções do que aqueles utilizando Veículo, conforme é evidenciado na tabela 13 e mostrado na figura 26.

**Tabela 13:** Número de contorções conforme a aplicação de AAS.

	Veículo (n=5)	AAS (n=5)	C10 (n=5)	C100 (n=6)	C500 (n=6)
Min-Máx	20-51	5-27	9-45	4-39	4-36
Média±dp	34.8±11.0	11.0±9.1	28.0±13.7	27.8±12.9	21.7±11.8
Mediana	35	7	30	32	26
P25-P75	33-35	6-10	21-35	25.25-35.75	14.5-27

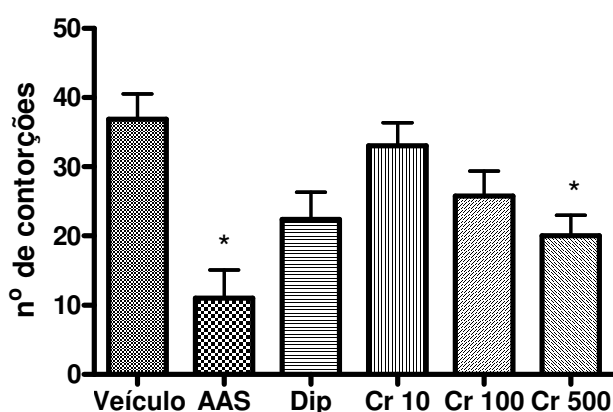
p-valor = 0.0468\*, ANOVA 1 critério post-hoc Teste de Tukey.

A análise do número de contorções foi realizada para comparar o efeito analgésico da copaíba em relação a Dipirona. Os resultados foram estatisticamente significativos. Houve diferença real (p-valor <0.05\*) entre Veículo (39±12.7) e Dipirona (22.4±8.8). Também foi observado resultado significativo (p-valor <0.05\*) quando comparado o número de contorções do grupo C10 (36.6±9.4) com o grupo C500 (18.7±10.2). O resultado mais evidente foi a diferença entre o grupo Veículo (39±12.7) e o grupo C500 (18.7±10.2) o qual obteve p-valor = 0.0117\* estatisticamente significante, conforme evidenciado na tabela 14 e mostrado na Figura 26.

**Tabela 14:** Número de contorções conforme a aplicação de Dipirona.

	Veículo (n=5)	Dip (n=5)	C10 (n=7)	C100 (n=7)	C500 (n=7)
Min-Máx	17-47	13-31	25-50	4-40	3-35
Média±dp	39±12.7	22.4±8.8	36.6±9.4	24±13.9	18.7±10.2
Mediana	46	23	36	26	16
P25-P75	39-46	14-31	30-42.5	15.5-33.5	15.5-23

p-valor = 0.0122\*, ANOVA com post-hoc Teste de Tukey.



**Figura 26:** Número de contorções abdominais resultante do tratamento com *copaifera reticulata* nas doses (10, 100 e 500mg) em modelo nociceptivo induzido por ácido acético, possuindo como controle positivo um grupo AAS e outro grupo Dip e um grupo somente com o veículo sem sofrer tratamento. P-valor < 0.05, ANOVA com post-hoc Teste de Tukey.

## 8 - DISCUSSÃO

Apesar da extensa literatura que trata dos óleos de copaíba, poucos são os estudos científicos onde é encontrada a identificação botânica da espécie estudada. Além de serem poucos os estudos que conseguem identificar os princípios ativos apesar de sugerirem que compostos fortemente ativos encontram-se presentes. Tudo isso indica que apesar de toda a pesquisa científica já realizada, os óleos de copaíba são potencialmente importantes como fonte de princípios ativos em estudos farmacológicos experimentais (VEIGA JÚNIOR & PINTO, 2001).

Com base nos conhecimentos da medicina popular e em resultados obtidos por pesquisas científicas, iniciou-se o estudo da propriedade anti-inflamatória do óleo-resina de copaíba da espécie *Copaifera Reticulata*, conhecida vulgamente no Brasil como óleo de copaíba, “copaíva” ou “pau-de-óleo” (VEIGA JÚNIOR & PINTO, 2001; VEIGA *et al.*, 2001). A fase botânica da pesquisa se iniciou com a identificação da árvore copaibeira da espécie *Copaifera Reticulata*, realizada pelo Dr. Antônio Sérgio Lima da Silva, Pesquisador do Museu Paraense Emílio Goeldi - MPEG, Belém - Pará, Brasil e a coleta do óleo-resina de copaíba da espécie *Copaifera Reticulata* realizada na Estação Científica Ferreira Penna – ECFPn, Floresta Nacional de Caxiuanã, localizada no município de Melgaço no Estado do Pará, Estação Científica administrada pelo Museu Paraense Emílio Goeldi - MPEG em Belém – Pará, autorizado através do Ofício MPEG/Caxiuanã nº 018/2008.

A inflamação induzida por carragenina, originalmente descrita em ratos por Winter e colaboradores (1962), é aguda, não imune, bem pesquisada, e altamente reprodutível. A carragenina, polissacarídeo obtido de alga marinha, é considerada um agente edematogênico não específico, que promove a liberação de vários mediadores quando injetada na pata do animal (WINTER *et al.*, 1962).

Os sinais cardeais do processo inflamatório – edema, hiperalgesia e eritema – se desenvolvem imediatamente após a injeção subcutânea da carragenina, resultado da ação de agentes pró-inflamatórios, tais quais: bradicinina, histamina, serotonina, complemento e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Estes agentes podem ser produzidos por células do local da injúria, ou por células que infiltraram migrando para a região da injúria. Os neutrófilos facilmente migram para os locais da inflamação e

podem gerar espécies reativas de oxigênio. A resposta inflamatória é frequentemente avaliada pelo aumento no volume da pata (característica do edema), e é modulada por diversas moléculas (MORRIS, 2003).

Os resultados descritos por Levy (1969) indicam que o edema de pata induzido por carragenina em camundongos é similar ao que foi mostrado por Winter e colaboradores (1962) em ratos. A injeção de carragenina na área subplantar da pata de camundongos produz um edema bifásico. A primeira fase se desenvolve até 24h, e a segunda fase, se desenvolve de 24h até 72h após a injeção de carragenina. A análise histológica da área subplantar realizada 4h depois da injeção de carragenina, revela um infiltrado celular difuso com predominância de neutrófilos. Entre 48 e 72h, um intenso acúmulo de macrófagos, eosinófilos e linfócitos são observados, junto com um grande aumento no número de leucócitos circulantes e plaquetas (HENRIQUES *et al.*, 1987).

Durante a primeira fase (correspondente as primeiras 24h) do edema de pata provocado pela carragenina (Cg) são descritos a ocorrência de três estágios (DI ROSA & WILLOUGHBY, 1971; BARROS *et al.*, 2004). O primeiro estágio ocorre na primeira hora após a injeção de carragenina (Cg), o aumento da permeabilidade vascular é mediado por histamina e serotonina. O segundo estágio ocorre na segunda hora, o aumento da permeabilidade é mediado por cininas, principalmente bradicinina. O terceiro estágio que ocorre entre 3-4 horas após o estímulo é o estágio de maior intensidade do edema e caracterizado pela a ação de prostaglandinas sobre a permeabilidade capilar (MORRIS, 2003).

O modelo de edema de pata, também, pode ser induzido por outros mediadores como a histamina, a bradicinina, a proteína quinase C, o dextran e o zimosan, cada qual agindo por um mecanismo de ação específico. O modelo de inflamação induzida por mediadores químicos tem sido amplamente utilizado para teste do potencial anti-inflamatório de fármacos e possui uma alta correlação entre a eficácia terapêutica neste modelo e a atividade em humanos (ZHANG *et al.*, 1997).

Avaliando o efeito de substância-teste sobre a redução do volume do edema induzido por carragenina ao longo do tempo, têm-se a noção de um possível mecanismo de ação (DE SOUZA *et al.*, 2003). É importante ressaltar que o modelo de edema de

pata fornece a resposta de que a substância-teste exibe efeito contra um dos eventos do processo inflamatório que é o extravasamento vascular (BUSNARDO, 2007).

O óleo-resina de copaíba da espécie *Copaifera Reticulata* em suas doses (C10mg, C100mg e C500mg) reduziram o edema de pata induzido por carragenina após 1, 3, e 6 horas, sendo que no grupo C500mg no intervalo T3 se evidenciou com o menor volume e menor índice de edema. No pico do edema (3h), os resultados são indicativos, com a redução do volume do edema na pata do camundongo, de que os componentes do óleo-resina de copaíba da espécie *Copaifera reticulata* estejam inibindo as vias da COX e LOX, indicando assim a presença no extrato de constituintes com ação anti-edematogênica. A indometacina, como observado nos resultados (tabela 4), inibiu as duas fases, o que significa a inibição da liberação de histamina, serotonina e bradicinina, além de inibir a via COX (GREPDIREMEN *et al.*, 2005), o que foi acompanhado pelas doses do óleo-resina de copaíba corroborando com a ação da indometacina que é um importante anti-inflamatório não-esteróide (FARSAM *et al.*, 2000).

Na confirmação da ação do efeito anti-inflamatório do óleo-resina de copaíba da espécie *Copaifera Reticulata* no modelo de edema de pata induzido por carragenina, a resposta vascular aguda que ocorre na segunda fase, entre 90 e 150 minutos, possui o seu desencadeamento pela liberação de cininas, como a bradicinina (DI ROSA *et al.*, 1971; DI ROSA & WILLOUGHBY, 1971); sendo assim, foi realizado modelo de edema de pata induzido por bradicinina nos intervalos de T10min, T30min, T60min e T120min, a fim de confirmar a etapa do processo de inflamação em que ocorre a ação do óleo-resina de copaíba, sendo verificado (tabela 7) que ocorreria uma ação redutora do índice de edema significativamente estatística da dose C100mg no intervalo T120min em relação as doses C10mg e C500mg, porém sem significância estatística em relação ao grupo Bk (diferença de 7.1% entre C100mg e Bk), o que leva a hipótese de uma maior ação eficaz do óleo-resina de copaíba na terceira fase do processo inflamatório induzido por carragenina, conforme Gomes e colaboradores (2006) evidenciou em ação antinociceptiva do óleo-resina de *Copaifera Reticulata* (100mg/kg) em modelo de contorção induzida por ácido acético associando-a a inibição de mediadores inflamatórios com bloqueio do sistema eicosanóide.

A pleurisia é uma metodologia que provoca em seu sítio de ação, ou seja, na cavidade pleural, reação semelhante ao que se desenvolve em processo infeccioso,

inflamação ou doença neoplásica que ocorre neste local. Mediadores químicos inflamatórios são liberados e podem se difundir para tecido pleural e subpleural, resultando em ativação de células constitutivas, incluindo células mesoteliais. Como consequência observa-se aumento de células inflamatórias na cavidade pleural, causando aumento do número de células na cavidade pleural (KROGEL *et al.*, 1990).

Em condições normais, o fluído pleural contém somente um pequeno número de células o que raramente ultrapassa 100 células  $\mu\text{L}^{-1}$  e consiste basicamente de linfócitos, contudo, o acometimento da pleural por certas doenças está associado com a infiltração de células do sistema imune, como neutrófilos, eosinófilos, linfócitos ou células acessórias, aumentando o número das mesmas, em variadas proporções (KROGEL *et al.*, 1990).

Lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), também conhecida como endotoxina, é um fragmento ativo da superfície da membrana externa de todas as bactérias gram-negativas. Ela tem sido usada como uma ferramenta importante para o estudo quer da fase aguda da inflamação ou da reação cruzada entre o sistema nervoso simpático e do sistema imunológico. É bem sabido que a emigração de neutrófilos da medula óssea para o sangue e tecidos é uma característica da inflamação aguda e que sistemicamente ou topicamente administrado LPS tem uma grande capacidade de recrutar essas células da medula óssea (BOZZA *et al.*, 1994b; BOZZA *et al.*, 1994a; ALTENBURG *et al.*, 1994; ALTENBURG *et al.*, 1997).

A presença de neutrófilos é limitada, porém, um número significativo deles indica fase aguda do processo inflamatório. A presença de IL-8 e C5a fazem com que sejam recrutados neutrófilos. Já IL-3 e IL-5 são fatores quimiotáticos para a presença de eosinófilos (KROGEL *et al.*, 1990). Bozza e colaboradores (1994a), afirmam que a injeção (i.t.) de LPS (250 ng/cavidade) induz um acúmulo de neutrófilos marcados dentro de 4h. Até 24 h, os números de neutrófilos diminuem e aumentos significativos na contagem de células mononucleares e eosinófilos são observados.

No modelo de pleurisia induzida por LPS no estudo realizado foi observado um número de neutrófilos com significativa diferença entre os grupos Dexametasona, C10mg, C100mg e C500mg em relação ao grupo Salina o que evidenciou a migração de neutrófilos para o local da injúria ( $p < 0.001^*$ ), conforme observado na tabela 10,



corroborando com os dados encontrados na literatura (BOZZA et al., 1994b; BOZZA et al., 1994a; BUSNARDO, 2007; ALTENBURG et al., 1994; ALTENBURG et al., 1997). Na comparação entre os grupos Dexametasona ( $0.884 \pm 0.395$ ) e C100mg ( $0.957 \pm 0.537$ ) em relação ao grupo controle ( $1.375 \pm 0.584$ ) observou-se uma redução do número de neutrófilos, entretanto, sem significância estatística em decorrência do desvio padrão existente entre os grupos, conforme é mostrado na figura 21. Em relação ao número de monócitos –  $\times 10^6/\text{mL}$  foi observado uma redução quantitativa do número de células no grupo C500mg ( $1.074 \pm 0.35$ ) em relação ao grupo controle ( $1.341 \pm 0.706$ ), sem, no entanto, possuir uma significância estatística ( $p > 0.05$ ) face ao desvio padrão encontrada nas amostras.

A ação do ultrassom foi verificada, em relato na literatura, que após insonação imediata do ultrassom em um grupo de ratos, houve diminuição do edema (FYFE, 1979, apud KITCHEN & PATRIDGE, 1990) ou mesmo após um período inicial de 48 horas (FYFE & CHAHL, 1984 apud KITCHEN & PATRIDGE, 1990), sugerindo ou uma redução da inflamação aguda ou uma aceleração da sua resolução. Pereira e colaboradores (1998), concluíram que a inibição significativa da hiperalgesia e do edema das patas dos ratos artríticos foi alcançada pela associação do ultrassom (intensidade de  $0,2 \text{ W/cm}^2$ ) com a droga indometacina (dose de  $0,5 \text{ mg/kg/dia}$ ).

Com relação a absorção cutânea do óleo-resina de copaíba, estudos realizados sobre a pele de camundongos mostraram que o óleo de copaíba é lentamente absorvido, por volta de noventa e dois minutos (MEYER & MEYER apud MACIEL et al., 2002). A indução à absorção transcutânea de drogas pela sonoforese se baseia na perturbação tecidual, ou seja, na mudança da estrutura das camadas cutâneas (LOW & REED, 2001). O ultrassom aumenta a penetração transcutânea por pressão somática, podendo chegar em média a atingir entre 4-5 cm de profundidade (AGNE, 2004).

Na confirmação da atividade anti-inflamatória do óleo-resina de copaíba da espécie *Copaifera Reticulata*, foi realizado o modelo inflamatório de edema de pata induzida por carragenina com a veiculação do óleo-resina da copaíba da espécie *Copaifera Reticulata* na dose *in natura* ( $50\mu\text{L}$ ), através de ondas ultrassônicas, em análise comparativa com a atividade do óleo-resina de copaíba aplicada via oral na dose 500mg, após 1h da ministração das doses (500mg (v.o.) e *in natura* (tópica c/ u.s), foi observado redução significativamente estatística ( $p < 0.05^*$ ) do índice de edema entre as

doses de tratamento e controle (Cg), conforme mostra a tabela 11, sendo expressiva a diferença entre a dose 500mg oral ( $34.8 \pm 18.8$ ) e dose tópica (*in natura*) com ultrassom ( $15.8 \pm 9.5$ ) observado um delta de 19%. Este resultado se encontra de acordo com os dados observados no modelo inflamatório de edema de pata por carragenina o que leva a crer uma ação de inibição da biossíntese de prostaglandinas (FORSAM *et al.*, 2000). Além de favorecer a aceleração da absorção do óleo-resina de copaíba através da pele do camundongo. Após 3h de tratamento com dose do óleo-resina de copaíba, foi evidenciada a diferença ( $p < 0.05^*$ ) entre o grupo carragenina ( $55.2 \pm 21.3$ ) e os grupos C500mg oral ( $31.18 \pm 13.0 \neq 24\%$ ) e tópico (*in natura*) com ultrassom ( $28.5 \pm 17.4 \neq 26.7\%$ ) evidenciadas com redução estatisticamente significativa do índice de edema corroborando com a ação de inibição da ciclooxigenase, reduzindo a biossíntese da prostaglandina (FORSAM *et al.*, 2000). Na análise longitudinal prospectiva no intervalo T1 → T3 do tratamento com óleo-resina de copaíba 500mg oral em relação a dose tópica (*in natura*) com ultrassom foi evidenciado ao final no intervalo T3 uma equiparação de ação, o que vem ao encontro do maior tempo de entrada do pico de ação metabólica da dose oral, o que corrobora com Byl e colaboradores (1993) que afirmam que o ultrassom proporciona a facilitação e aceleração da penetração transcutânea de fármacos de uso tópico com menor tempo de alcance do pico de ação farmacológica, ver figura 24.

O modelo de *air pouch* foi primeiramente descrito por Selye (1953) e adaptado por Ghosh e colaboradores (2000), tem sido utilizado para estudar os mecanismos envolvidos na resposta inflamatória. Neste modelo o exsudato inflamatório é coletado, podendo ser utilizado para diversas análises. Em uma segunda abordagem, este modelo permite a pesquisa de drogas anti-reumáticas, uma vez que a cavidade não inflamada é limitada por uma fina camada de fibroblastos e macrófagos, semelhante à cavidade sinovial (EDWARDS *et al.*, 1981; SEDGWICK *et al.*, 1983). A injeção de um irritante no interior da cavidade induz uma resposta inflamatória que se assemelha à observada na articulação reumatóide (ELLIS *et al.*, 2000). Estudos realizados por García-Ramallo e colaboradores (2002) mostraram o papel das células residentes na inflamação que, quando estimuladas, liberam TNF- $\alpha$ , responsável pela síntese de quimiocinas e, como consequência, pela migração de leucócitos. Outras citocinas como IL-1 e IL-6 também participam deste processo.

Neste estudo foram analisados os seguintes parâmetros no modelo *air pouch*: número de células na cavidade (exsudato) onde a inflamação foi induzida e o volume de exsudato formado. O tratamento com o óleo-resina de copaíba da espécie *Copaifera Reticulata in natura* com aplicação tópica na região da bolsa de ar veiculata pelo ultrassom inibiu a migração de células para o exsudato (Figura 25) com significância estatística ( $p < 0.05^*$ ), no entanto, não ocorreu uma inibição na formação do exsudato (Figura 25) estatisticamente significativa ( $p > 0.05$ ).

A injeção de carragenina na bolha, como supracitado, produz uma resposta inflamatória aguda caracterizada pela infiltração de células, aumento da exsudação e produção de mediadores inflamatórios, tais como prostaglandinas, leucotrienos e citocinas (YIN *et al.*, 2005). A diminuição da exsudação sugere que parte do efeito anti-inflamatório do óleo-resina de copaíba da espécie *Copaifera Reticulata in natura*, pode ser atribuído à redução da permeabilidade vascular. Pode ser sugerido então, que um dos possíveis mecanismos envolvidos na redução do processo inflamatório pelo óleo-resina de copaíba da espécie *Copaifera Reticulata in natura* seja a inibição da migração de células para o sítio inflamatório, o que poderia estar relacionado a liberação de leucotrieno B<sub>4</sub> (sintetizado pelo via da LOX), que é um potente quimioatraente para neutrófilos. Quanto à redução do número de neutrófilos ocorrida nos grupos copaíba ( $0.6063 \pm 0.32$ ) e diclofenaco ( $1.2398 \pm 1.0828$ ) merece consideração a ação do óleo-resina de copaíba da espécie *Copaifera Reticulata in natura*, pois o decréscimo acentuado no número de neutrófilos foi indicativo ocorrência de inibição da liberação de histamina, serotonina e/ou bradicinina (devido a inibição observada na primeira hora) bem como a atividade da COX, LOX e/ou citocinas, porém outros dados são necessários para comprovar estes efeitos.

Objetivando a confirmação de efeito associado do óleo-resina de copaíba, conforme descritos por Gomes e colaboradores (2006) que evidenciaram resultados de redução algica em modelos nociceptivo, concluindo pela hipótese que indicava que os óleos de copaíba podem possuir ação analgésica mediante a inibição da cascata do ácido araquidônico reduzindo a produção da ciclooxygenase ou lipoxigenase.

Na busca de evidências neste sentido foi adotado neste estudo o modelo de contorção abdominal induzida por ácido acético (*writhing test*). O ácido acético parece induzir nocicepção por um mecanismo indireto, através da liberação de substâncias

endógenas que excitam as terminações nociceptivas (COLLIER *et al.*, 1968). Ribeiro e colaboradores (2000) demonstraram que ácido acético induz nocicepção, pelo modelo de contorções abdominais, através da atuação em células residentes como macrófagos e mastócitos da cavidade peritoneal de camundongos, induzindo a liberação de mediadores inflamatórios.

O comportamento de contorção em camundongos, pela injeção intraperitoneal de ácido acético, induzindo nocicepção química, é utilizado para analisar a possibilidade de atividade analgésica central e periférica. Este comportamento pode ser uma resposta a estimulação direta das fibras aferentes nociceptivas, devido a redução do pH (acidez promovida pela presença do ácido acético) e a síntese de mediadores inflamatórios (FRANÇA *et al.*, 2001).

Neste trabalho foram analisados os seguintes parâmetros para o modelo de contorção abdominal induzida por ácido acético: tratamento dos camundongos com dose do óleo-resina de copaíba de 10mg, 100mg e 500mg (v.o), sendo verificada a ação do óleo-resina correlacionada com o controle positivo do ácido acetilsalicílico (200 mg/Kg/p.c.) e da dipirona (200 mg/Kg/p.c.). Na análise do número de contorções abdominais ocorreu evidência estatisticamente significativa de um número menor de contorções diante do tratamento com AAS, dipirona e copaíba 500mg, sugerindo, portanto, o efeito analgésico do óleo-resina de copaíba da espécie *Copaifera Reticulata* corroborando com os achados de Gomes e colaboradores (2006). O efeito inibitório observado com os óleos de copaíba sobre os modelos de analgesia, também, pode ser devido a uma redução direta na atividade evocada pelas fibras C, em axônios ascendentes, ou decréscimo na produção de PG que é responsável pela estimulação da fibra C (ROSSI *et al.*, 1993). A atividade observada pode ser atribuída aos efeitos globais dos constituintes dos óleos de copaíba ou seus compostos específicos, tendo ação semelhante a anti-inflamatório não-esteróide ou drogas opióides, sendo, um óleo natural ofertado pela natureza.

No tocante ao desenvolvimento de novos estudos a metodologia estabelecida pode preencher lacunas nos trabalhos reportados na literatura, no sentido de fornecer base quantitativa e qualitativa aos trabalhos científicos farmacológicos que se apóiam nos diferentes mecanismos de ação e atividade biológica do óleo-resina de copaíba,

assim como, respaldar analiticamente a formulação e os estudos de estabilidade de produtos fitoterápicos contendo o óleo objeto deste estudo.

## 9 CONCLUSÃO

A atividade anti-inflamatória do óleo-resina de copaíba da *Copaifera Reticulata* foi confirmada pelo modelo do edema de pata induzido por carragenina através da redução do volume deslocado e redução do índice de edema de pata. Como agente inflamatório, a carragenina induz inflamação pela liberação de prostaglandinas, ocasionando a formação de edema. Anti-inflamatórios não-esteróides, como a indometacina, inibem a ciclooxigenase, reduzindo a biossíntese de prostaglandina. Provavelmente, o óleo-resina de copaíba da espécie *Copaifera Reticulata* testado possui ação semelhante a este anti-inflamatório em concentrações elevadas como a testada de 100 mg/kg/p.c. e 500mg/Kg/p.c., porém, mais testes são necessários para comprovar esta afirmação com identificação dos princípios ativos envolvidos nesta ação.

Nossos resultados demonstraram que o óleo de copaíba testado desenvolveu atividades antinociceptiva periféricas, provavelmente, através de receptores de opióides na dose de 500mg/Kg/p.c., sendo provável o resultado deste efeito atribuído ao efeito eficaz da ação anti-inflamatória.

O estudo possibilitou o esclarecimento do mecanismo de ação desse óleo-resina e tornar possível a concepção de terapias menos onerosas e com menores efeitos adversos no tratamento de processos inflamatórios e algícos. Os dados resultantes do estudo em *in vivo* com redução do número de neutrófilos e redução do número de contorções abdominais nos modelos farmacológicos estudos com apresentação de resultados estatisticamente significativos, reforça a importância do óleo-resina de copaíba da espécie *Copaifera reticulata* como um importante fitoterápico com efeitos anti-inflamatório e analgésico de baixo custo para a população.

Outro dado importante verificado foi que o ultrassom proporcionou a facilitação e aceleração da penetração transcutânea do óleo-resina de copaíba, favorecendo o seu uso tópico, proporcionando um menor tempo de alcance do pico de ação farmacológica, sendo, portanto, indicada a associação da fonoforese com óleo-resina de copaíba como recurso a fazer parte do arsenal terapêutico da fisioterapia.

Apesar da extensa literatura que trata dos óleos de copaíba, pouco são os trabalhos que aprofundam o conhecimento sobre uma determinada espécie, objetivando esta pesquisa contribuir no estudo do potencial de ação biológica do óleo-resina de

copaíba da espécie *Copaifera Reticulata*. Tudo isso indica que o óleo-resina, em estudo, é potencialmente importante como fonte de princípios ativos em farmacologia necessários a pesquisas científicas de identificação de mecanismos de ação farmacológica isolada dos princípios ativos contidos em seu composto.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- AGNE, J.E. **Eletrotermoterapia Teoria e Prática**. Santa Maria (RS): Pallotti, 2004.
- ALBERT, A; BRAY, D; LEWIS, J; RAFF, M; ROBERT, K; WATSON, JD. **Biologia Molecular da célula**. 3 ed., Ed. Artes Médicas, Rio de Janeiro, 2004.
- ALENCAR, J. da C. **Estudos silviculturais de uma população natural de *Copaifera multijuga* HAYNE - LEGUMINOSAE, na Amazônia Central**. 2. Produção de óleo-resina. Acta Amazônica, v.12, n.1, p.79-82, 1982.
- ALON, R., FUHLBRIGGE, R.C., FINGER, E.B., SPRINGER, T.A.. **Interactions through I-selectin between leukocytes and adherent leukocytes nucleate rolling adhesions on selectins and VCAM-1 in shear flow**. J. Cell Biol. 135, pp. 849-865, 1996.
- AMERICAN COLLEGE OF RHEUMATOLOGY. **Recommendations for the medical management of osteoarthritis of the hip and knee**. 2000 Update.
- AMERICAN COLLEGE OF RHEUMATOLOGY. **Subcommittee on Osteoarthritis Guidelines**. Arthritis Rheum 43: 1905-15, 2000.
- AMOROZO, M. C.M.; GELY, A.. **Uso de Plantas Medicinais por Caboclos do Baixo Amazonas**. Barcarena: PA; Museu Paraense Emílio Goeldi. 4, p. 47. 1988.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. **Resolução RDC nº 48/04 para regulamentar produtos fitoterápicos**. Brasília, 2004.
- ARNOULD, T.W.. **Princípios e práticas de fisioterapia**. 4 ed. Porto Alegre: ArteMed, 1999.
- ASANUMA, M; NISHIBAYASHI-ASANUMA, S; MIYAZAKI, I; KOHNO, M; OGAWA, N. **Neuroprotective effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs by scavenging of nitric oxide radicals**. Journal of Neurochemistry. 76:1895-1904, 2001.
- ALTENBURG, S.P., BOZZA, P.T., MARTINS, M.A., TIBIRIÇÁ, E.V., SILVA, P.M.R., CORDEIRO, R.S.B., CASTRO-FARIA-NETO, H.C.. **Adrenergic modulation of blood neutrophilia induced by platelet-activation factor in rats**. Eur. J. Pharmacol. 256. 1994. p45–49.
- ALTENBURG, S.P., MARTINS, M.A., SILVA, A.R., CORDEIRO, R.S.B., CASTRO-FARIA-NETO, H.C.. **LPS-induced blood neutrophilia is inhibited by  $\alpha$ -adrenoceptor antagonists: a role for catecholamines**. J. Leukoc. Biol. 61. 1997. p 689–694.
- AZULAY, R. **Dermatologia**. 2ª ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 1997.
- BAGGE, E; BROOKS, P. **Osteoarthritis in older patients: optimum treatment**. Drugs Aging 7: 176-83, 1995.



BARATA, L.E.S., MENDONÇA, C. **Copaíba: Propriedades farmacológicas, etnofarmacologia, usos.** Rio de Janeiro: GEF/Instituto Pró-Natura. 1997 (Relatório 1).

BARE, A.C; McANAW, M.B; PRITCHARD, A.E.. **Phonophoretic delivery of 10% hydrocortisone through the epidermis of humans as determined by serum cortisol concentrations.** *Phys Thher.* 76:738-749, 1996.

BARRETO, J.G; MATOS, A.P.. **Efeito da fonoforese de óleo de andiroba (*Carapa guianensis*) sobre o edema inflamatório agudo.** Dissertação (Trabalho de Conclusão de Curso) – Universidade do Estado do Pará / Belém, 1998.

BARROS JR, E.A.. **Os efeitos do ultra-som na cicatrização de tendões flexores de coelhos após tenorrafia.** Ribeirão Preto. 57p. Dissertação (mestrado)- Escola de Engenharia de São Carlos/ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ Instituto de Química de São Carlos. Universidade de São Paulo, 2001.

BASILE, AC; SERTIE, JAA; FREITAS, PCD; ZANINI, AC. **Antiinflammatory activity of oleoresin from brasilian copaifera.** *J Eth,* 22: 101-9, 1988.

BASSET T.C., HOLTON, J.; O'MAHONY, R.; ROITT, I. **Innate immunity and pathogen-host interaction.** *Vaccine.*, 1;21 Suppl 2:S12-23, 2003.

BEUTLER, B.. **Innate immunity: an overview.** *Mol Immunol.*, 40(12): 845-859, 2004.

BOGLIOLO, L. **Patologia geral básica.** Rio de janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

BOZZA, P.T., CASTRO-FARIA-NETO, H.C., SILVA, A.R., LARANGEIRA, A.P., SILVA, P.M.R., MARTINS, M.A., CORDEIRO, R.S.B., 1994b. **Lipopolysaccharide-induced pleural accumulation depends on marrow neutrophils and platelet-activating-factor.** *Eur. J. Pharmacol* 270, 143–149.

BOZZA, P.T., CASTRO-FARIA-NETO, H.C., PENIDO, C., LARANGEIRA, A.P., SANTOS, R.R., CORDEIRO, R.S.B., 1994a. **Requirement for lymphocytes and resident macrophages in LPS-induced pleural eosinophil accumulation.** *J. Leukoc. Biol.* 56, 151–154.

BRASH, A.R.. **Arachidonic acid as a bioactive molecule.** *J. Clin. Invest.*, 107 (11), pp. 1339 – 1345, 2001.

BRASIL 1984. SVS/MS - Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. **Portaria no. 64, de 28 de dezembro de 1984.** Dispõe sobre modificação e autorização dos principais Grupos Terapêuticos e Respectivos Subgrupos. DOU. Poder Legislativo, Brasília, DF, 31 dez. 1984.

BRASIL 1999. Congresso Nacional. **Lei no. 9.782,** de 26 de janeiro de 1999. Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e dá outras providências. DOU. Poder Legislativo, Brasília, DF, 27 jan. 1999.

BRASIL 2000. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução de Diretoria Colegiada no. 102** de 30 de novembro de 2000. Aprova o

regulamento sobre propagandas, mensagens publicitárias e promocionais. DOU. Poder Executivo, Brasília, DF, 01 dez. 2000.

BRASIL 2003. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC no. 210**, de 04 de agosto de 2003. Determina a todos os estabelecimentos fabricantes de medicamentos, o cumprimento das diretrizes estabelecidas no Regulamento Técnico das Boas Práticas para a Fabricação de Medicamentos. DOU. Poder Executivo, Brasília, DF, 14 ago. 2003.

BRASIL 2004a. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução de Diretoria Colegiada no. 48** de 16 de março de 2004. Aprova o regulamento técnico de medicamentos fitoterápico junto ao Sistema Nacional de Vigilância Sanitária. DOU. Diário Oficial da União, Poder Executivo, DF, Brasília, 18 mar. 2004.

BRASIL 2004b. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução no. 88** de 16 de março de 2004. Dispõe sobre a Lista de referências bibliográficas para avaliação de segurança e eficácia de fitoterápicos. DOU. Poder Executivo, Brasília, DF, 18 mar. 2004.

BRASIL 2004c. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução no. 89** de 16 de março de 2004. Dispõe sobre a Lista de registro simplificado de fitoterápicos. DOU. Poder Executivo, Brasília, DF, 18 mar. 200c.

BRASIL 2004d. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução no. 90** de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o Guia para os estudos de toxicidade de medicamentos fitoterápicos. DOU. Poder Executivo, Brasília, DF, 18 mar. 2004.

BRASIL 2004e. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução no. 91** de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o Guia para realização de alterações, inclusões, notificações e cancelamento pós-registro de fitoterápicos. DOU. Poder Executivo, Brasília, DF, 18 mar. 2004e.

BRASIL 2006a. Ministério da Saúde. **Portaria no. 971**, de 03 de maio de 2006. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde. DOU. Poder Executivo, Brasília, DF, 04 mai. 2006.

BRASIL 2006b. Presidência da República. **Decreto no. 5813**, de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. DOU. Poder Executivo, Brasília, DF, 23 jun. 2006.

BRASILEIRO, J.S; ALVES, T.C; ESCOSSIA, C.C.. **Análise da transmissibilidade ultra-sônica de medicamentos utilizados na prática da fonoforese**. Rev.bras. fisiot., v.7, n.2, p.139-144, 2003.

BREDT, D.S.; HWANG PAUL, M.; SNYDER; SOLOMON, H. **Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide**. Nature, 347: 768 -770, 1990.

BRED, DS; SNYDER, SH. **Nitric oxide: a Physiologic messenger molecule.** Annu. Rev. Biochem. 63:175-195, 1994.

BRITO N.M.B.. **Aspectos morfológicos e morfométricos da cicatrização de feridas cutâneas abertas em ratos tratados com óleo de copaíba** [Tese de mestrado]- São Paulo (SP). Universidade Federal de São Paulo- Escola Paulista de Medicina, 1996.

BRUNETON, J.. **Eléments de Phytochimie et de Pharmacognosie**; Lavoisier: Paris, 1987, p. 585.

BUSNARDO, Tereza Cristina Pamplona Mosimann. **Estudo da propriedade antiinflamatória do extrato de *Coronopus didymus* através de modelos farmacológicos específicos.** 2007. 100f. Dissertação (Mestrado em ciências farmacêuticas), Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2007.

BYL, N; MCKENZIE, A; HALLIDAY, B; WONG, T; O'CONNELL, J.. **The effects of phomophoresis with corticosteroids: a controlled pilot study.** JOSPT, v.18, n.5, 1993. p.590-600.

CADIEUX, J.S., LECLERC, P., ST-ONGE, M., DUSSAULT, A.A., LAFLAMME, C., PICARD, S., LEDENT, C., BORGEAT, P., POULIOT, M.. **Potential of neutrophil cyclooxygenase-2 by adenosine: an early anti-inflammatory signal.** J. Cell Sci. 1(118), pp. 1437 - 1447, 2005.

CASAROTTO, R.A. **Agentes acoplantes em fisioterapia: perdas acústicas e térmicas.** 51f. Tese. Escola Paulista de medicina, São Paulo, 1999.

CALIXTO J.B., CABRINI D.A., FERREIRA J., CAMPOS M.M.. **Kinins in pain and inflammation.** Pain 87(1), pp. 1-5, 2000.

CALIXTO, J.B.; CAMPOS, M.M.; OTUKI, M.F.; SANTOS, A.R.. **Anti-inflammatory compounds of plant origin.** Part II. modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. *Planta Med.*, 70(2), pp. 93-103, 2004.

CALIXTO, J.B.; OTUKI, M.F.; SANTOS, A.R.. **Anti-inflammatory compounds of plant origin.** Part I. Action on arachidonic acid pathway, nitric oxide and nuclear factor kappa B (NF-kappaB). *Planta Med.*, 69(11), pp. 973-983, 2003.

CARLOS, T.M.; & HARLAN, J.M.. **Membrane proteins involved in phagocyte adherence to endothelium.** Immunol. Rev. 114: 5-28, 1990.

CARVALHO, Ana C. B. *et al.*. **Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil.** Revista Brasileira de Farmacologia/*Brasilian Journal of Pharmacology*. 18(2): 314-319, Abr/Jun. 2008.

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

CHARLIER, C., MICHAUX, C.. **Dual inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2) and 5-lipoxygenase (5-LOX) as a new strategy to provide safer non-steroidal anti-inflammatory drugs.** *Eur J Med Chem.*, 38(7-8): 645-659, 2003.

CLARK, R. & KUPPER, T. **Old meets new: the interaction between innate and adaptive immunity.** *J. Invest. Dermatol.* 125(4):629-637, 2005.

COHEN, M; ABDALLA, E.J.. **Lesões nos esportes: Diagnóstico, prevenção e tratamento.** Rio de Janeiro: Revinter, 2005.

COLLIER, H.O.J.; DINNIEN, L.C.; CHISTINE, A.; JOHNSON, A.; SCHNEIDER, C. **The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse.** *Br. J. Pharmacol. Chemother.* 32: 295, 1968.

COLLINS T. **Inflamação aguda e crônica,** In: Cotran RS, Kumar V, Collins T. Robbins patologia estrutural e funcional. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 44-77.

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

CORRÊA, P.M.. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas.** Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 1984. v.6, p.612-5.

COSTA, E; FRANÇA, AT; SILVA JOSÉ, R. **Oxido nítrico, asma brônquica e inflamação.** *Rev. Bras. Alergia e Imunopatologia.* 1999; 22(3): 83-93.

COSTA, V. B.; COUBE, C. S.; MARINHO, B. G.; MATHEUS, M. E.; LEITÃO, S. G.; FERNANDES, P.D. **Anti-inflammatory and Analgesic Activity of Bouchea fluminensis.** *Fitoterapia*, Vol.74, pp.364-371. 2003.

COTRAN, R.; KUMAR, V.; COLLINS ROBBINS: **Patologia Estrutural e Funcional.** 6.ed Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

CRAIG, R.D. **Modalidades terapêuticas para lesões atléticas.** 1ed. São Paulo: Manole, 2003. p. 23-25.

DANNHARDT, G. & KIEFER, W.. **Cyclooxygenase inhibitors – current status and future prospects.** *Eur. J. Med. Chem.*, v. 36, pp. 109 – 126, 2001.

DEDON, P.C. & TANNENBAUM, S.R.. **Reactive species in chemical biology of inflammation.** *Arch. Biochem. Biophys.*, 423, pp. 12 – 22, 2004.

DEL MASCHIO, A., ZANETTI, A., CORADA, M., RIVAL, Y.; RUCO, L.; LAMPUGNANI, M.G.; DEJANA, E.. **Polymorphonuclear leukocyte adhesion triggers the disorganization of endothelial cell-to-cell adherens junctions.** *J. Cell Biol.* 135: 497-510, 1996.

DELVES, P.J. & ROITT, I.M.. **The immune system – First of two parts.** *N. Eng. J. Immunol.*, v.343, pp. 37 – 49, 2000a.

DELVES, P.J. & ROITT, I.M.. **The immune system – Second of two parts.** N. Eng. J. Immunol., v.343, pp. 37 – 49, 2000b.

DE SOUZA, N.M.; BELLA CRUZ, A.; SCHUMACHER, M.B.; KREUGER, M.R.O.; DE FREITAS, R.A.; BELLA CRUZ, R.C. Método de avaliação de atividade biológica de produtos naturais e sintéticos. In: BELLÉ BRESOLIN, T.M.; CECHINEL FILHO, V. **Ciências farmacêuticas: contribuições ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos.** 1 ed. Ttajaí: UNIVALI, 2003. cap. 3. p119-131.

DI ROSA, M.; WILLOUGHBY, D.A. **Screens of anti-inflammatory drugs.** *J. Pharm. Pharmacol.*, v.23, n.4, p.297-8, 1971.

DI ROSA, M.; WILLOUGHBY, D.A.; GIROUD, J.P. **Studies of the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine.** *J. Pathol.*, v.104, n.1, p.15-29, 1971.

DOCKER, M.F.. **A review of instrumentation available for therapeutic ultrasound.** *Physiotherapy*, v.73, n.4, 1987. p.154-155.

DURIGAN, J.L.Q.; BARETTA, I.P.; COSTA, C.N.; BORGES, H.E. **Efeitos do ultrassom terapêutico pulsado associado à indometacina no edema de ratos artríticos.** *Rev. Fisioterapia Brasil.* 2005; 130-135.

DYSON, M; SUCKLING, J. **Stimulation of tissue repair by ultrasound: a survey of mechanisms involved.** *Physiotherapy*, v.64, n.4, p. 105-108, 1978.

EDWARDS, J.C.W., SEDGWICK, A.D., WILLOUGHBY, D.A.. **The formation of a structure with the features of synovial lining by the subcutaneous injection of air: an *in vivo* tissue culture system.** *J. Pathol.* 134: 147-156, 1981.

ELLIS, L., GILSTON, V., SOO, C.C., MORRIS, C.J., KIDD, B.L., WINYARD, P.G.. **Activation of the transcription factor NF- $\kappa$ B in the rat air pouch model of inflammation.** *Ann. Rheum. Dis.* 59: 303-307, 2000.

ENWEMEKA, C.S.. **The effects of therapeutic ultrasound on tendon healing: a biomechanical study.** *American Journal Physical Medicine & Rehabilitation.* V.68, n.6, p.283-287, 1989.

FALGARONE, G., JAEN, O., BOISSIER, M.C.. **Role of innate immunity in rheumatoid arthritis.** *Joint Bone Spine* 72, 17-25, 2005.

FARSAM H, AMANLOU M, DEHPOUR A.R, JAHANIANI F. **Antiinflammatory and analgesic activity of *Biebersteinia multifida* DC. root extract.** *J Ethnopharmacol* 2000; 71:443-7.

FEBRAFARMA 2007. **Fitoterápico atrai investimentos.** Disponível em: <http://www.febrafarma.org.br/areas.php?area=pu&secao=38&modulo=materias>. Acessada em agosto de 2007.

FELLINGER, K. & SCHMIDT, J.. **Klinik and Therapies des Chronischen Gelenkreumatismus**. Maudrich Vienna, Austria (1954) 549–552.

FERNANDES, J.. **Sobre o óleo-resina de copaíba e sua aplicação industrial**. Associação Comercial do Amazonas. 1949.

FERREIRA, S.H.. **A new method for measuring variations of rat paw volume**. J. Pharm Pharmacol. 1979;31(9):648.

FIERRO, I.M. & SERHAN, C.N.. **Mechanisms in anti – inflammation and resolution: the role of lipoxins and aspirin-triggered lipoxins**. Braz. J. Med. Biol. Res., v.34, pp. 555 – 566, 2001.

FITZPATRICK F.A., SOBERMAN R.. **Regulated formation of eicosanoids**. J. Clin. Invest.107(11), pp. 1347-1351, 2001.

FONSECA, E.T.. **Óleos Vegetais Brasileiro**. 2 ed. Rio de Janeiro, 1927.

FOX, I.H & KELLEY, W.N.. **The role of adenosine deaminase and 2' – deoxyadenosine in mammalian cells**. Ann. Rev. Biochem. 17:655-686, 1978.

FRANÇA, D.S.; SOUZA, A.L.S.; ALMEIDA, K.R.; DOLABELLA, S.S.; MARTINELLI, C.; COELHO, M.M. **European Journal of Pharmacology**, v. 421, p. 157-164, 2001.

GABRIEL V.A.. **Amazônia e a Sabedoria do seu Povo, [2002]**. Especial para o Portal Amazônia. Disponível em: <http://www.amazonia.com.br/canais /beleza/ chama3.asp>>. Acesso em: 15 de maio 2002.

GAN, B.S; SHEREBRIN, M.H.; SCLILLEY, C.G.. **The effects of ultrasound treatment on flexor tendon healing in the chicken limb**. *Journal of Hand Surgery*. V.20 , n.6, p.809, 1995.

GARCIA-RAMALLO, E., MARQUES, T., PRATS, N., BELETA, J., KUNKEL, S.L., GODESSART, N.. **Resident cell chemokine expression serves as the major mechanism for leukocyte recruitment during local inflammation**. J. Immunol. 169(11), pp. 6467-6473, 2002.

GHOSH, A.K., HIRASAWA, N., NIKI, H., OHUCHI, K.. **Cyclooxygenase-2-mediated angiogenesis in carrageenan-induced granulation tissue in rats**. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 295, 802–809. 2000.

GOMES, N.M. et al.. **Antinociceptive activity of Amazonian Copaiba oils**. *Journal of Ethnopharmacology* (2006), doi:10.1016/j.jep.2006.08.018.

GONÇALVES, G; PARIZOTTO, N.A.. **Fisiopatologia na reparação cutânea: Atuação da Fisioterapia**. *Revista Brasileira de Fisioterapia*. V.3, n.1, p. 5-13, 1998.

GIBLETT, E.R; ANDERSON, J.E; COHEN, F; POLLARA, B; MEUWISSEN, H.J.. **Adenosine deaminase deficiency in two patients with severe impaired cellular immunity.** Lancett, ii, 1067, 1972.

GOODWIN, D.C; LANDINO, L.M; MARNETT, L.J.. **Effects of nitric oxide and nitric oxide – derived species on prostaglandin biosynthesis.** The FASEB Journal. 13:1121-1136,1999.

GOTLIEB, R & IACHAN, A.. **Estudo do Bálsamo de copaíba.** Rev. Quim. Inds. 14(163):201, 1995.

GRANGER, D.N. & KUBES, P.. **The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte–endothelial cell adhesion.** J. Leukoc. Biol. 55: 662-675, 1994.

GROSSER, T., FRIES, S., FITZGERALD, G.A.. **Biological basis for the cardiovascular consequences of COX-2 inhibition: therapeutic challenges and opportunities.** J. Cli. Invest., 116(1), pp. 4 - 15, 2006.

HARBORNE, J.B.; BOULTER, D.; TURNER, B.L.. **Chemotaxonomy of the Leguminosae.** Academic Press: London, 1971, p. 1.

HATA, A.N. & BREYER, R.M.. **Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: multiple roles in inflammation and immune modulation.** Pharmacol. Ther. 103(2), pp. 147 – 166, 2004.

HENRICKS, P.A. & NIJKAMP F.P.. **Pharmacological modulation of cell adhesion molecules.** Eur. J. Pharmacol. 344 (1), pp. 1-13, 1998.

HENRIQUES, C.M.P.. **Política Vigente para a Regulamentação de Medicamentos no Brasil.** Brasília, 2004.

HENRIQUES, M.G.M.O.; SILVA, P.M.R.; MARTINS, M.A., et al. **Mouse paw edema. A new model for inflammation?** Braz. J. Med. Biol. Res. 1987;20(2):243–9.

HENRIQUES, M.G.M.O.; WEG, V.B.; MARTINS, M.A., et al.,. **Differential inhibition by two hetrozepine PAF antagonists of acute inflammation in the mouse.** Braz. J. Pharmacol. 1990;99(1):164–8.

HOVI, T; SMYTH, J.F.; ALLISON, A.C.; WILLIAMS, S.C.. **Ride of adenosine deaminase in lymphocyte proliferation.** Clin. Exp. Immunol. 23:385-403, 1976.

IGNARRO, L.J.. **Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide.** Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., 1990. 30: 535-60.

JACKSON, B.A.; SCHWANE, J.A.; STARCHER, B.C.. **Effects of ultrasound therapy on the repair of Achilles tendon injuries in rats.** *Medicine and Science in Sports and Exercise.* V.23, n.2. p.171-176. 1991.

JUDD, S. W.; CAMPBELL, S. C.; KELLOG, E. A.; STEVENS, P. S.. *Plant Systematics, A Phylogenetic Approach*. Ed. Sinauer: Sunderland, 1999, p. 283.

KAWAMURA, M., HATANAKA, K., SAITO, M., OGINO, M., ONO, T., OGINO, K., MATSUO, S., HARADA, Y.. **Are the anti – inflammatory effects of dexamethasone responsible for inhibition of the induction of enzymes involved in prostanoid formation in rat carrageenin – induced pleurisy**. Eur. J. Pharmacol., pp.127 – 135, 2000.

KITCHEN, S; BAZIN, S.. **Eletroterapia de Clayton**. 10 ed. São Paulo: Manole, 1996.  
KOEKE, P.U.. **Estudo comparativo da eficácia da fonoforese do ultra-som terapêutico e da aplicação tópica de hidrocortisona no tratamento de tendão de rato em processo de reparo tecidual**. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia)-Instituto de química de São Paulo, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2003.

KITCHEN, S.S.; PATRIDGE, C.J. **A review of therapeutic ultrasound:II. The efficacy of ultrasound**. Physiotherapy, v.76, p.595, 1990.

KORSTJENS, C.M. *et al.* **Stimulation of bone cell differentiation by low-intensity ultrasound: a histomorphometric in vitro study**. J Orthop Res, v.22, n.3, p.495-500, 2004.

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

KROEGEL, C.; GIEMBYCZ, M.A.; BARNES, P.J. **Characterization of eosinophil cell activation by peptides. Defferential effects of substance P, melittin, and FMET-Leu-Phe**. J Immunol [S.I], v.145, n8, p2581-2587, 1990.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N. **Patologia: bases patológicas das doenças**. 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

LANGENHEIM, J.H.; FEIBERT, E.B.. **Leaf resin variation in *Copaifera langsdorfii*: relation to irradiance and herbivory**. Phytochemistry, v.27, n.8, p.2527-32, 1988.

LANGE, F; KROTH, A; STEFFANI, J.A.; LORENCETTI, N.. **Influência da laserterapia no processo cicatricial de queimaduras de terceiro grau**. Rev. Fisio. Bras. Vol. 4, nº 5, setembro/outubro, 2003

LAPA, A.J.; SOUCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M.R.M.; GODINHO, R.O.; LIMA, T.C.M.. **Farmacologia e toxicologia de produtos naturais in Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 2<sup>a</sup> edição, Editora da UFSC, 2000.

LASKIN, D.L & LASKIN, J.D.. **Role of macrophages and inflammatory mediators in chemically induced toxicity**. Toxicology 160:111-118, 2001.

LAWRENCE, T.; WILLOUGHBY, D.A.; GILROY, D.W.. **Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation**. *Nat Rev Immunol.*, 2(10): 787-795, 2002.



LEITE, A. M. C.; LLERAS, E.; *Acta Bot. Bras.* 1993, 7, 61

LEITE, A.; ALECHANDRE, A.; RIGAMONTEAZEVEDO, C.; CAMPOS, C.A.; OLIVEIRA, A.. **Recomendações para o manejo sustentável do óleo de copaíba.** Rio Branco: UFAC/SEFE, 2001.38 p.

LEUNGE, B.P.; CULSHAW, S.; GRACIE, J.A.; HUNTER, D.; CANETTI, C.A.; CAMPBELL, C.; CUNHA, F.; LIEW, F.Y.; MCINNES, I.B.. **A role for IL-18 in neutrophil activation.** *J. Immunol.* 167, pp. 2879 – 2886, 2001.

LEVY, L.. **Carrageenan paw edema in mouse.** *Lif. Sci.* 8 (I), pp. 601 – 606, 1969.

LEWIS, W. H.; ELVIN-LEWIS, M. P. F.; **Medical Botany; John Wiley and Sons:** New York, 1977, p. 293.

LIPISKY, P.E.. **The clinical potential of cyclooxygenase – 2 – specific inhibitors.** *Am. J.Med.*, v. 106, pp.51S – 57S, 1999.

LOW, J. & REED, A.. **Eletroterapia explicada.** 3 ed. Barueri: Manole, 2001.

LUSTER, A.D., ALON, R., VON ANDRIAN, U.H.. **Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets.** *Nat Immunol.* 6(12), pp. 1182-1190, 2005.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C. & VEIGA JUNIOR, V.F. **Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares.** *Química Nova*, v.25, n.3, p.429-38, 2002.

MALE. **Migração celular e inflamação.** In: *Imunologia*, Roitt, Brostoff e Male, 5 ed., Manole, 1999.

MALININ, A., OSHRINE, B, VICTOR SEREBRUANY, V.. **Treatment with selective serotonin reuptake inhibitors for enhancing wound healing.** *Medical Hypotheses* 63, pp. 103–109, 2004.

MARLETTA, M.A.. **Nitric oxide synthase structure and mechanism.** *J.Biol.Chem.* 268(17): 12231-4, 1993.

MARTINS-DA-SILVA, R. C. V.; PEREIRA, J. F. & LIMA, H. C. **o gênero *copaifera* (*leguminosae – caesalpinioideae*) na Amazônia brasileira.** *Rodriguésia* 59 (3): 455-476. 2008.

McELNAY, JC; BENSON, HAE; HARLAND, R; HADGRAFT, J. **Phonophoresis of Methyl Nicotinate: A preliminary study to Elucidate the Mechanism of Action.** *Pharmaceutical Research.* V.10, n.12, p. 1726-1731, 1993.

McNEELA, E.A. & MILLS, K.H.. **Manipulating the immune system: humoral versus cell-mediated immunity.** *Adv. Drug Del.*, pp. 43 – 54, 2001.

MENEZES, D.F; VOLPON, J.B; SHIMANO, A.C.. **Aplicações de ultra-som terapêutico em lesão muscular experimental aguda.** Revista Brasileira de Fisioterapia. V. 4, n. 1, p.27-31,1999.

MENEZES-DE-LIMA JR, O.; KASSUYA, C.A.L.; NASCIMENTO, A.F.Z.; HENRIQUES, M.G.M.O.; CALIXTO, J.B. **Lipoxin A<sub>4</sub> inhibits acute edema in mice: Implications for the anti-edematogenic mechanism induced by aspirin.** Prostaglandins & other lipid mediators. [S.l], v 80, p 123-135, 2006.

MESQUITA, J.B. **Estudos dos processos de obtenção e qualidade do óleo essencial de óleo copaíba (Copaifera langsdorffii Bent.).** Lavras: UFLA, 1989. 93p. (Monografia)-UFLA, MG.

MITRAGOTRI, S.; BLANKSCHTEIN, D.; LANGER, R. **Ultrasound – mediated transdermal protein delivery.** Science, v.269, n.5225, 1995. p.850-3.

MITRAGOTRI, S; SUNDARAM, J; MELLEIN, BR. **An experimental and theoretical analysis of ultrasound-induced permeabilization of cell membranes.** *Biophysical Journal.* v.84, 2003 May; 3087-3101.

MONCADA, S.. **The L-arginine: Nitric oxide pathway, cellular transduction and immunological roles.** Advanced in Second messenger and Phosphoprotein Research 28:97-99, 1993.

MONCADA S; PALMER R.M.J; HIGGS E.A.. **Nitric oxide: pathophysiology, and pharmacology.** Pharmacol Rev, 1991; 43:109-42.

MONTI, H.; TILIACOS, N.; FAURE, R. **Two diterpenoids from copaiba oil.** Phytochemistry, v.42, n. 6, p. 1653-1656, 1996.

MRPHY, J; BACKER, D.C; BEHLING, C; TURNER, A.. **Critical reexamination of the continuous spectrophotometric assay for adenosine deaminase.** Analytical Biochemistry, 122:328-337, 1982.

MURTAUGH, M.P. & FOSS D.L..**Inflammatory citokines and antigen presenting cell activation.** Vet. Immunol. Immunopathol. 87, pp. 109 – 121, 2003.

NASCIMENTO, JLM; PIKANÇO-DINIZ, DLW; SILVEIRA, AJA; BASTOS, GNT. **Physalis angulata linneu extract exerting anti-inflammatory effects in rats inhibiting different pathway.** Universidade Federal do Pará, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Fisiologia, 2004.

OKUNO, T., YOKOMIZO, T., HORI, T., MIYANO, M., SHIMIZU, T.. **Leukotriene B<sub>4</sub> receptor and the function of its helix 8.** J. Biol. Chem. 280(37), pp. 32049 - 32052, 2005.

OLIVEIRA, F. M. M.; *Estudos de Matéria Médica Vegetal.* Escola Typographica Salesiana: São Paulo, 1905, p. 114.

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., Botucatu, v.8, n.3, p.14-23, 2006.

PALMER RMJ, FERRIGE AG, MONCADA S. **Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor.** Nature, 1987; 327:524-6.

PANCHAGNULA, R. **Transdermal Delivery of Drugs.** Indian J. Pharmacol. V. 29, p. 140-156, 1997.

PARKIN J. & COHEN B.. **An overview of the immune system.** Lancet. 2; 357(9270), pp.1777-1789, 2001.

PARIZZOTO, NA; KOEKE, PU; MORENO, BG. D; LOURENCIN, FTC. **Utilização da fonoforese em distúrbios musculoesqueléticos: uma meta-análise.** Revista Brasileira de Fisioterapia. V.7, n.1, p. 9-15, 2003.

PEREIRA, L. S. M. et al. **Os efeitos do ultra-som na hiperalgesia e no edema de ratos artríticos.** Rev. Fisioter. Univ. São Paulo, v.5, n.2, p.83-96, jul.-dez., 1998.

PRESCOTT, S.M., ZIMMERMAN, G.A., STAFFORINI, D.M., MCINTYRE, T.M.. **Platelet-activating factor and related lipid mediators.** Annu Rev Biochem. 69, pp. 419-445, 2000.

PHILLIPSON, J.D.. **50 years of medicinal plant research - every progress in methodology is a progress in science.** Planta Med. 69(6), pp.491-495, 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.** Journal Brazilian Chemical Society, v.11, n.4, p.355-60, 2000.

ROMAN, R.J.. **P-450 metabolites of arachidonic acid in the control of cardiovascular function.** Phys. Rev., v. 82, pp.131 – 185, 2002.

RAMOS, C.D.L.; HELUY-NETO, N.E.; RIBEIRO, R.A.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q.. **Neutrophil migration induced by IL-8-activated mast cells is mediated by CINK-1.** Citokine 21, pp. 214 – 223, 2003.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. **Farmacologia.** 4.ed Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

REIS, P. A.. **Fracionamento de Extratos de *Baccharis trimera* Less. DC. Biomonitorado pelo Potencial Antiinflamatório.** Rio de Janeiro. 147p. Tese (Doutorado) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG), Pós-Graduação em Biologia, área de Concentração Biociências Nucleares. Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ, 2006.

RIBEIRO, R.A.; VALE, M.L.; THOMAZZI, S.M.; PASCHOALATO, A.B.; POOLE, S.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q. **Involvement of resident macrophages and mast**

**cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice.** Eur J Pharmacol. Jan 3;387(1): 111-8, 2000.

RIGAMONTE-AZEVEDO, O. C.. **Copaíba: estrutura populacional, produção e qualidade do óleo-resina em populações nativas do sudoeste da Amazônia.** 2004. 84p. Dissertação Mestrado - Universidade Federal do Acre, Rio Branco, AC. 2004. 84p.

ROBBINS, R.A; GRISHAM, M.B.. **Nitric Oxide.** Int. J. Biochem. Cell. Biol. 29:6, 857-860, 1997.

RODRIGUES, L.E.A; DA CRUZ FILHO, A.A.S; E SILVA, J.P; ÁVILA MON; DE ARAÚJO, F.L.V.. **Simple method for the assay of adenosine deaminase (ADA) activity used for the rapid diagnosis of tuberculosis.** Arq. Biol. Tecnol. 37:2, 385-389, Jun., 1994.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D.. **Imunologia.** 5 ed. São Paulo: Manole, 1999.

ROOS, D..**The involvement of oxygen radicals in microbicidal mechanisms of leukocytes and macrophages.** Klin. Wochenschr. 69(21-23), pp. 975-980, 1991.

ROSEN, S.D.. **Cell surface lectins in the immune system.** Seminars in immunology, 5: 237-247, 1993.

ROSNER, B.. **Fundamentals of Bioestatics.** 4<sup>th</sup>. ed., Duxbury Press, Boston. 1995.

ROSIM, G. de C. **Análise da influência do ultra-som terapêutico na penetração transcutânea de diclofenaco sódico em humanos sadios.** Dissertação de Mestrado. São Carlos: Universidade de São Paulo. Escola de Engenharia de São Carlos: 2003.

ROSSI, G.C.; PASTERNAK, G.W.; BODNAR, R.J. **Synergistic brainstem interactions for morphine analgesia.** Brain Research 8, 1993.171-180.

RUNARSSON, G., LIU, A., MAHSHID, Y., FELTENMARK, S., PETTERSSON, A., KLEIN, E., BJORKHOLM, M., CLAESSON, H.E.. **Leukotriene B4 plays a pivotal role in CD40-dependent activation of chronic B lymphocytic leukemia cells.** Blood 105(3), pp. 1274-1279, 2005.

SAUTEBIN, L. **Prostaglandins and nitric oxide as molecular targets for anti-inflammatory therapy.** Fitoterapia 71:48-57, 2000.

SELYE, H.. **Induction of topical resistance to acute tissue injury; an experimental study with the granuloma pouch technique.** Surg. Clin. North. Am. Pp. 1417-1446, 1953.

SELLOUM L., REICHL S., MULLER M., SEBIHI L., ARNHOLD J.. **Effects of flavonols on the generation of superoxide anion radicals by xanthine oxidase and stimulated neutrophils.** Arch Biochem Biophys. 1; 395(1), pp. 49-56, 2001.

SERHAN, C.N. & SAVILL, J.. **Resolution of inflammation: the beginning programs the end.** Nat. Immunol. 6, pp. 1191-1197, 2005.

SHERWOOD, E.R., TOLIVER-KINSKY, T.. **Mechanisms of the inflammatory response.** *Best Pract Res Clin Anaesthesiol.*, 18(3): 385-405, 2004.

SIMPSON, K.J., LUKACS, N.W., COLLETTI, L., STRIETER, R.M., KUNKEL, S.L.. **Cytokines and the liver.** *J Hepatol.*, 27(6), pp. 1120-1132, 1997.

SMITH, C.J.; ZHANG, Y.; KOBOLDT, C.M.; JERRY, M.; MUHAMMAD, B.; ZWEINFEL, B.S.; SHAFFER, A.; TALLEY, J.J; MASFERRER, J.L.; SEIBERT, K.; ISAKSON, P.C.. **Pharmacological analysis of cyclooxygenase-1 in inflammation.** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 25, pp. 13313 – 13318, 1998.

SOUZA-JÚNIOR, OG; DAMOUS, SHB; LAMARÃO, LG. **Revisão crítica do uso do óleo de copaíba.** *Rev. Par Med.* V 14(1): 71-76, 2000.

STARKEY, C. **Recursos terapêuticos em fisioterapia.** 2.ed. São Paulo: Manole, 2001. 404p.

TAO, X; MA, L; LIPSKY, PE. **Suppression of carrageenan – induce inflammation in vivo by extract of Chinese herbal remedy Tripterygium Wilfordii Hook F.** *Inflammation research* 48:139-148, 1999.

TER HAAR, G. **Basic Physics of therapeutic ultrasound. Physioterapic.** v.73, n.3, p.110-113, 1987.

VACHIER, I., CHANEZ, P., BONNANS, C., GODARD, P., BOUSQUET, J., CHAVIS, C.. **Endogenous anti-inflammatory mediators from arachidonate in human neutrophils.** *Biochem Biophys Res Commun.*, 11;290(1): 219-224, 2002.

VEIGA JUNIOR, V.F., PINTO, A.C., PATITUCCI, M.L.. **Controle de autenticidade de óleos de copaíba comerciais por cromatografia gasosa de alta resolução.** vol. 20. *Química Nova*, pp. 612–617, 1997.

VEIGA JÚNIOR, V.F.; PINTO, A.C. **O gênero *Copaifera* L.** *Química Nova*, v.25. n.2. p273-86, 2002.

VEIGA JÚNIOR, V.F.et al. **Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne—A comparative study.** *Journal of ethnopharmacology* 112 (2007) 248–254.

VILLARREAL, G., ZAGORSKI, J., WAHL, S.M.. **Inflammation: acute.** *Encyclop. Life Sci.*: 1-8, 2001.

WANNMACHER, L.; FERREIRA, M.B.C. **Princípios gerais no tratamento da inflamação.** In: FUCHS, F.D.; WANNMACHER, L.; FERREIRA, M.B.C *Farmacologia clínica.* 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. cap 22. p 294-295.

WARA, DW; AMMANN, AJ. **Laboratory data. Combined immunodeficiency disease and adenosine deaminase deficiency. A molecular defect.** Ed.: by H.j.

Meuwissen, R.J. Pickering, B. Pollara; I.H. Porter, pp 247, Academic Press., New York, 1975.

WARNER, T.D. & MITCHELL, J.A.. **Cyclooxygenases: new forms, new inhibitors, and lessons from the clinic.** J. FASEB 18(7), pp. 790 - 804, 2004.

WORTHYLAKE, R.A. & BURRIDGE, K.. **Leucocyte transendothelial migration: orchestrating the underlying molecular machinery.** Curr. Op. Cell Biol., pp. 569 – 577, 2001.



WU, J; CHAPPELOW, J; YANG, J; WEIMANN, L. **Defects generated in human stratum corneum specimens by ultrasound.** Ultrasound in Med. & Biol.; v.24, n.5, 1998. p.705-10.

YIN, L.L., ZHANG, W.Y., LI, M.H., SHEN, J.K., ZHU, X.Z.. **CC05, a novel anti-inflammatory compound, exerts its effect by inhibition of cyclooxygenase-2 activity.** Eur. J. Pharmacol. 520(1-3), pp. 172-178, 2005.

YUNES, R.A., PEDROSA, R.C., CECHINEL FILHO, V.. **Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil.** Quim. Nova, v. 24, pp. 147 – 152, 2001.

ZIMMERMANN, M.. **Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals.** Pain, v. 16, p. 109-110, 1983.

## **ANEXOS**

 <p>Ministério do Meio Ambiente  <b>Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis</b></p>  <p><b>CADASTRO TÉCNICO FEDERAL                  CERTIFICADO DE REGULARIDADE</b></p>			
Nr. de Cadastro:	CPF/CNPJ:	Emitido em:	Válido até:
2518572	301.291.173-15	25/02/2008	25/05/2008
Nome/Razão Social/Endereço <b>Jose Wagner Cavlcante Muniz</b> <b>Tv. Barão do Triunfo, 3314. Apart. 1502</b> <b>Marco</b> <b>BELEM/PA</b> <b>66093-050</b>			
Este certificado comprova a regularidade no  <p style="text-align: center;"><b>Cadastro de Instrumentos de Defesa Ambiental</b></p> <p><b>Consultor Técnico Ambiental - Classe 5.0</b></p> <p><b>Ecossistemas Terrestres e Aquaticos</b></p>			
Observações: 1 - Este certificado não habilita o interessado ao exercício da(s) atividade(s) descrita(s), sendo necessário, conforme o caso de obtenção de licença, permissão ou autorização específica após análise técnica do IBAMA, do programa ou projeto correspondente. 2 - No caso de encerramento de qualquer atividade especificada neste certificado, o interessado deverá comunicar ao IBAMA, obrigatoriamente, no prazo de 30 (trinta) dias, a ocorrência para atualização do sistema. 3 - Este certificado não substitui a necessária licença ambiental emitida pelo órgão competente. 4 - Este certificado não habilita o transporte de produtos ou subprodutos florestais e faunísticos.		A inclusão de Pessoas Físicas e Jurídicas no Cadastro Técnico Federal não implicará por parte do IBAMA e perante terceiros, em certificação de qualidade, nem juízo de valor de qualquer espécie.  <p style="text-align: center;">Autenticação</p> <p style="text-align: center;"><b>qqmu.67ru.jt2r.rn8f</b></p>	

Inprimir tela Fechar janela





Ministério da  
Ciência e Tecnologia



Belém, 17 de março de 2008.

Ofício MPEG/Caxiuanã N° 018/2008

**Ilm° Sr. Dr. José Wagner Cavalcante Muniz**

Universidade Federal do Pará – UFPA – Instituto de Ciências Biológicas

Assunto: Autorização de execução de projeto na ECFPn – Caxiuanã.

Prezado Senhor,

Comunicamos a aprovação do projeto de pesquisa intitulado **Efeito do óleo da copaifera reticulada pela corrente ultra-sônica na reação do processo inflamatório produzido pela carregenina no modelo de bolsa de ar (air pouch) em camundongos**, apresentado na última reunião do Conselho Consultivo da ECFPn, ocorrida no dia 11 de março de 2008.

O relato feito pelo conselheiro Antonio Carlos Lobo Soares, Chefe de Serviço da Estação Científica Ferreira Penna – ECFPn, foi favorável a execução do projeto de pesquisa a ser executado na FLONA de Caxiuanã, sendo seguido pelos demais conselheiros.

Atenciosamente,

**Antonio Carlos Lobo Soares**  
Coordenador da Estação Científica Ferreira Penna



GOVERNO DO ESTADO DO PARÁ  
UNIVERSIDADE DO ESTADO DO PARÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

PROJETO DE PESQUISA ENVOLVENDO ANIMAIS

**Protocolo: Nº 44/08**

**Título do Projeto de Pesquisa: "Efeitos do óleo da copaifera reticulata veiculado pela corrente ultra-sônica na reação do processo inflamatório produzido pela carragenina no modelo de bolsa de ar (air puch) em camundongos"**

**Pesquisador Responsável: José Luiz Martins do Nascimento**

**Instituição / Unidade: UEPA - CCBS**

**Data de Entrada: 01.04.08**

**Data do Parecer: 23.04.08**

**PARECER**

O Comitê de Ética em Pesquisa da UEPA apreciou o protocolo em tela e, verificou que foram atendidas todas as exigências da Resolução CNS 196-96. Portanto, manifesta-se pela sua aprovação.

Parecer: **APROVADO**

**LIBERADO para o início da pesquisa, obrigatório entrega neste CEP, de relatório semestral e, de conclusão ao final da pesquisa.**

Belém, 06 de maio de 2008.

Prof. Dr. Marcus Vinícius Henriques Brito  
Coord. do Comitê de Ética em Pesquisa

**Prof. Dr. MARCUS VINÍCIUS HENRIQUES BRITO**  
Coordenador do CEP/UEPA

# 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](#)