



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

POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO DA OLEORRESINA DE
Copaifera paupera (HERZOG) DWYER - LEGUMINOSAE

HELEN SOARES DE LIMA

Santarém – Pará
Agosto/2015

HELEN SOARES DE LIMA

**POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO DA OLEORRESINA DE
Copaifera paupera (HERZOG) DWYER - LEGUMINOSAE**

**ORIENTADORA: PROF^a DRA. ELAINE CRISTINA PACHECO DE OLIVEIRA
CO-ORIENTADOR: PROF^o DR. WALDINEY PIRES MORAES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências, junto ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* Biociências.

**Santarém – Pará
Agosto/2015**

POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO DA OLEORRESINA DE
Copaifera paupera (HERZOG) DWYER - LEGUMINOSAE

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do Título de Mestre em Biociências. Aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Biociências, nível de mestrado, da Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA, em **07 de Agosto de 2015**.

Apresentada à Comissão Examinadora, integrada pelos Professores: Prof. Dr. Luís Carlos Crocco Afonso (UFOP) e Prof. Dr. Osmar Alves Lameira (EMBRAPA).

Profª. Dra. Elaine Cristina Pacheco de Oliveira (UFOPA)
Orientadora

Santarém, 07 de Agosto de 2015.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho
Aos meus pais Maria Helena e Francisco Brandão,
Aos meus irmãos Fredson, Fernanda e Fábio
E aos meus sobrinhos Maria Luíza, Helena e Gabriel

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Profa. Dra. Elaine Cristina Pacheco de Oliveira**, por ser minha orientadora de mestrado e pela confiança durante essa jornada.

Aos professores **Waldiney Pires Moraes** e **Adriana Caroprezo Morini** co-orientadores deste trabalho, sempre dispostos a auxiliar e colaborar.

Aos professores **Ricardo Bezerra de Oliveira** e **Rosa Helena Veras Mourão**, que disponibilizaram o Laboratório de Bioprospecção e Biologia Experimental (LabBEx) para que pudesse realizar meus experimentos.

Ao professor **Humberto Minervino**, que disponibilizou o laboratório de Sanidade Animal para análise e fotografia das lâminas.

Aos meus colegas de grupo de pesquisa, mestrandos **Daliane Ferreira Marinho** e **João Oliveira e Silva Filho** que diariamente me acompanhavam durante a pesquisa e foram essenciais para a obtenção desse resultado.

Aos colegas de laboratório, PIBICs de **graduação Jairo, Inaê, Victor, Daiane, Éden, Nazaré, Ályssa, Suelen, Jessé** que me auxiliaram nos experimentos.

Aos técnicos de laboratório **Jander, Gilson e Taiara**, que me auxiliaram na realização dos exames bioquímicos e hematológicos.

Às minhas alunas do PIBIC Ensino Médio (EM) **Jeane Cardoso** e **Sara Branches**, que apesar de nenhuma experiência prévia, sempre foram muito dedicadas e se esforçavam ao máximo para aprender e auxiliar.

Ao **Instituto Esperança de Ensino Superior (IESPES)** em especial ao técnico de biotério **Railson Branco** que contribuíram com animais para a pesquisa e material de biotério, e sempre se colocaram a disposição para nos auxiliar.

A **Universidade do Estado do Pará (UEPA)**, em especial ao **Profº Rodrigo Ferreira** e **Prof Thiago** que nos cederam materiais de biotério para que pudéssemos manter os animais da pesquisa.

Ao Biotério do Campus de Oriximiná, representado pelo **Profº Domingos Diniz** e o médico veterinário **Michel**, que nos cederam animais para a pesquisa.

A Faculdade de Zootecnia da USP, representada pela Profª **Angélica Miglino**, técnico de laboratório **Ronaldo Agostinho** e alunos de Pós Doc. **Phelipe Favaron** e **Juliana Guimarães**, que tão bem nos receberam em São Paulo para nosso treinamento e muito contribuíram nos repassando conhecimento, com toda a dedicação e presteza.

À minha amiga e colega de trabalho **Marissol Almeida**, que se dispôs a me ajudar diversas vezes e nos momentos em que foi solicitada, sem hesitar.

Aos meus colegas da turma **Andréa, Maria Beatriz, Marden, Mayara, Giovana, José, Juliana Almeida, Juliana Machado, Mônica, Suelen, Thiago, Lúcio, Osvaldo, Layla, Liliana, Caroline, Bárbara, Brena** e professores do mestrado – Biociências 2013, que me deram força e muitos momentos de alegria para aguentar essa caminhada.

Ao **Carlos Rocha Melo**, secretário do programa, sempre muito prestativo e solícito com todos os alunos.

Aos meus colegas de trabalho **Daniel, Erlane, Francimara, Marly, Patrícia, Priscila, Ruy, Wilson, Rubem, Márcia, Hosana, Sumaya** e em especial minha chefe **Daniele Ferreira** que sempre foram extremamente compreensivos, auxiliando e sempre dando força e incentivando minha qualificação profissional.

À Universidade Federal do Oeste do Pará, representada pela **Pró-Reitoria de Gestão de Pessoas** que aprovou minha liberação das atividades laborais para dedicação integral ao mestrado após minha estabilidade.

À minha família, em especial meus pais **Francisco Brandão e Maria Helena**, meus irmãos **Fredson, Fernanda e Fábio**, minhas cunhadas **Marcela e Railene**, meu cunhado **Jander Lopes** e meus queridos sobrinhos **Maria Luíza, Helena e Gabriel** pelo amor e carinho e por todo o apoio e incentivo aos meus estudos.

Aos órgãos financiadores **CAPES, CNPq e FAPESPA** pelo apoio financeiro ao projeto.

EPÍGRAFE

Acredite, é hora de vencer
Essa força vem de dentro de você
Você pode até tocar o céu, se crer
Acredite, que nenhum de nós
Já nasceu com jeito pra super-herói
Nossos sonhos a gente é quem constrói
É vencendo os limites, escalando as fortalezas,
conquistando o impossível pela fé
Essa fé que te torna imbatível, mostra o seu valor.
(Beno César e Solange de César)

LIMA, Helen Soares. **Potencial anti-inflamatório da oleorresina de *Copaifera paupera* (Herzog) Dwyer - Leguminosae**. 2015. 82 p. Dissertação de Mestrado em Biociências. Programa de Pós Graduação em Biociências. Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA, Santarém, 2015.

RESUMO

O uso de produtos naturais como opção terapêutica alternativa cada vez mais vem sendo estimulado. Dentre os mais utilizados, destaca-se a oleorresina de copaíba, por seus efeitos anti-inflamatório e cicatrizante. Em decorrência disso, o objetivo desse estudo foi avaliar o potencial anti-inflamatório da oleorresina da espécie *Copaifera paupera*. Para isso, a pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFOPA, nº 01001/2014, assim como pelo SISBIO 44380-1. Foi realizada a coleta e a caracterização química da oleorresina da espécie *C. paupera* procedente da Floresta Nacional do Tapajós. Para os ensaios biológicos foram utilizados *Rattus norvegicus*, machos e fêmeas, saudáveis e sedentários. Inicialmente foi feita a avaliação da toxicidade oral aguda. O grupo teste foi tratado com 2000 mg/kg (v.o.) de oleorresina de *C. paupera* e acompanhados durante 14 dias para observação de possíveis reações tóxicas. Também foi realizada a avaliação das enzimas alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase e gama-glutamil transferase, além de análise hematológica. No teste de irritação dérmica foi feita a tricotomia do dorso dos animais para aplicação da substância a ser testada (oleorresina de *C. paupera in natura*; gel de copaíba a 10% ou fonoforese), foram formados grupos de única aplicação e aplicações durante 6 dias. Foi observada a formação de eritemas/escaras e edema, graduados em grau 0 a 4. Para testar a ação da oleorresina sobre fase inflamatória da lesão muscular, os animais foram submetidos a um trauma contuso e divididos em grupos tratados por 1 e 6 dias: Controle, que não recebeu tratamento; Grupo ultrassom terapêutico; Grupo gel de *C. paupera* a 10%; E grupo fonoforese. O músculo gastrocnêmio dos animais foi extraído e submetido à rotina histológica, corado com hematoxilina-eosina e analisado em microscópio óptico. A análise envolveu os parâmetros: infiltrado inflamatório, necrose, fibrose, edema e células com núcleo centralizado. Para a avaliação da atividade antiedematogênica foi realizado o teste de edema de pata induzido por carragenina, e como tratamentos foram utilizadas duas formas de administração: uso tópico (*in natura* e em gel a 10%) e via oral (10, 100 e 500 mg/kg). Como resultados, a oleorresina de *C. paupera* apresentou os componentes majoritários: α -Copaeno (38,55%), β -Cariofileno (20,94%) e β -Bisaboleno (12,37%). Não gerou morbidade/mortalidade nos animais, nem alterações nas enzimas hepatobiliares ou no hemograma. Sua administração tópica não gerou irritação dérmica após única aplicação, porém, após 6 aplicações consecutivas, a forma *in natura* gerou eritema no dorso dos animais. Durante a avaliação histológica do tecido muscular, o gel de copaíba 10% gerou redução do edema tecidual no 2º dia, e redução do edema e do infiltrado inflamatório no 7º dia após a lesão. No teste de atividade antiedematogênica a oleorresina administrada por via oral inibiu o edema de pata na 1ª hora com as doses de 500 mg/kg e 100 mg/kg, e na 2ª e 3ª com a dose de 500 mg/kg. Já sua administração por via tópica não apresentou ação antiedematogênica. A partir disso, é possível sugerir que a oleorresina de *Copaifera paupera* além de possuir baixo índice de toxicidade, pode auxiliar na redução de processos inflamatórios agudos.

PALAVRAS – CHAVE: Copaíba. Inflamação. Edema. Toxicidade

LIMA, Helen Soares. **Anti-inflammatory potential of the oleoresin of *Copaifera paupera* (Herzog) Dwyer - Leguminosae**. 2015. 82 p. Dissertação de Mestrado em Biociências. Programa de Pós Graduação em Biociências. Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA, Santarém, 2015.

ABSTRACT

The use of natural products as an alternative therapeutic option is increasingly being stimulated. Among the most widely used, there is the oleoresin of copaiba, for its anti-inflammatory and healing effects. As a result, the objective of this study was to evaluate the anti-inflammatory potential of the oleoresin of the species *Copaifera paupera*. For this, the research was approved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) of UFOPA, No. 01001/2014, as well as the SISBIO 44380-1. The collection and the chemical characterization of oleoresin of the species *C. paupera* coming from the Tapajós National Forest was held. For biological assays, *Rattus norvegicus* individuals were used, males and females, healthy and sedentary. Initially, the assessment of acute oral toxicity was made. The test group was treated with 2000 mg / kg (orally) of oleoresin *C. paupera* and monitored for 14 days for observation of possible toxic reactions. An evaluation of the enzymes alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase and gamma-glutamyl transferase was also performed, and haematological analysis. The trichotomy of the dorsum of the animals for applying the substance to be tested (oleoresin of *C. paupera* in nature; gel copaiba 10% or phonophoresis) was made in the skin irritation test, forming single application groups and applications for 6 days. The formation of erythema / eschar and edema was observed, graduates from degree 0-4. To test the action of the oleoresin on the inflammatory phase of muscle injury, animals were subjected to blunt trauma divided into groups and treated for 1 to 6 days: Control, which received no treatment; Therapeutic ultrasound group; Gel Group of *C. paupera* 10%; and phonophoresis group. The gastrocnemius muscle of the animals was extracted and subjected to histological routine, stained with hematoxylin-eosin and examined under an optical microscope. The analysis included the parameters: inflammatory infiltrate, necrosis, fibrosis, edema and cells with central core. For evaluation of antiedematogenic activity, the paw edema test induced by carrageenan was carried out, and two administration forms were used as treatments: topical use (fresh and gel at 10%) and orally (10, 100 and 500 mg / kg). As a result, the oleoresin *C. paupera* presented the major components: α -copaene (38.55%), β -caryophyllene (20.94%) and β -bisabolene (12.37%). There was no morbidity/mortality in animals or changes in hepatobiliary enzymes or in the blood count. Topical administration did not produce skin irritation after a single application, but after 6 consecutive applications, in natura form generated erythema on the back of animals. During the histological evaluation of muscle tissue, the gel copaiba 10% generated reduction of tissue edema on the 2nd day, and reduction of edema and of the inflammatory infiltrate on day 7 after injury. In antiedematogenic activity test, the oleoresin administered orally inhibited the paw edema within 1st hour with 500 mg/kg and 100 mg/kg, and the 2nd and 3rd with the dose of 500 mg/kg. Its administration by topical use showed no antiedematogenic action. From this it is possible to suggest that the oleoresin of *Copaifera paupera* besides having low toxicity index, can help reduce the acute inflammatory processes.

KEYWORDS: Copaiba. Inflammation. Edema. Toxicity

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Caracterização química da oleorresina de *C. paupera* do período chuvoso – em destaque (*) os componentes majoritários.
- Tabela 2** – Aumento de peso (g) (média \pm erro padrão) dos animais no 7º e no 14º dia comparados com o dia da administração.
- Tabela 3** – Parâmetros bioquímicos analisados. Os resultados estão expressos em médias \pm erro padrão, n= 6/grupo. ANOVA, seguido de teste Tukey.
- Tabela 4** – Parâmetros hematológicos analisados. Os resultados estão expressos em médias \pm erro padrão, n= 5/grupo. ANOVA, seguido de teste Tukey, p**<0,01.
- Tabela 5** – Classificação do edema e eritema/escaras no dorso dos animais após diferentes modalidades de administração da oleorresina de *C. paupera* – única aplicação.
- Tabela 6** – Classificação do edema e eritema/escaras no dorso dos animais após diferentes modalidades de administração da oleorresina de *C. paupera* – 6 aplicações.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – No centro da foto um exemplar de *Copaifera sp.*
- Figura 2** – Oleorresina de três espécies de *Copaifera* da Floresta Nacional do Tapajós (FLONA). (A) *C. paupera*, (B) *C. reticulata* e (C) *C. dukei*
- Figura 3** – Oleorresina de *C. paupera*
- Figura 4** – Gel de *C. paupera* 10%
- Figura 5** – Técnica para extração do óleo de copaíba. Trado (A), Orifícios (B), Cano de PVC (C)
- Figura 6** – (A) Dorso dos animais após tricotomia; (B) Dorso protegido com gaze
- Figura 7** – Mecanismo de lesão adaptado
- Figura 8** – Mecanismo de lesão. Local do impacto.
- Figura 9** – Processamento das amostras – rotina histológica. (A) Desidratação; (B) Diafanização; (C) Parafinização; (D) Emblocamento; (E) Solidificação da parafina; (F) Blocos com as amostras; (G) Realização dos cortes histológicos no micrótomo e (H) Cortes histológicos da amostra na lâmina.
- Figura 10** – (A) Pletismômetro digital; (B) Imersão da pata do animal.
- Figura 11** – Coleta da oleorresina de copaíba
- Figura 12** – Oleorresina de *C. paupera* (*in natura*)
- Figura 13** – Peso dos animais nos diferentes dias de observação – Teste de confirmação. Os resultados estão expressos em médias \pm erro padrão, $n= 3/\text{grupo}$. ANOVA, seguido de teste Tukey.
- Figura 14** – Dorso dos animais um dia após única aplicação. Parte superior utilizada como controle, na parte inferior foram aplicadas as substâncias testadas. (A) Oleorresina de *C. paupera* pura; (B) Gel de *C. paupera* 10% e (C) Fonoforese (Gel 10% + US).
- Figura 15** – Dorso dos animais após 6 dias de aplicação. Parte superior utilizada como controle, na parte inferior foram aplicadas as substâncias testadas. (A) Oleorresina de *C. paupera* pura, dorso do animal apresentando sinais de irritação; (B) Gel de *C. paupera* 10% e (C) Fonoforese (Gel 10% + US)
- Figura 16** – Tecido muscular que não foi submetido ao trauma, nem ao tratamento. (A) Aumento de 4x; (B) Aumento de 10x.
- Figura 17** – Gráfico com a análise quantitativa dos parâmetros analisados no segundo dia após o trauma. Os resultados estão expressos em médias \pm erro padrão, $n= 5/\text{grupo}$. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, quando comparados com o grupo controle, ANOVA, seguido de teste Tukey.
- Figura 18** – Grupo controle - tecido muscular no segundo dia após o trauma. (A) e (B) - aumento de 4x, (C) e (D) – aumento de 10x. Triângulos indicam áreas de infiltrado inflamatório; Setas longas áreas de necrose; (*) áreas de edema.
- Figura 19** – Grupo Ultrassom - tecido muscular no segundo dia após o trauma. (A) - aumento de 4x, (B) e (C) – aumento de 10x. Triângulos indicam área de infiltrado inflamatório; Setas longas necrose; (*) áreas de edema.
- Figura 20**- Grupo gel *C. paupera* 10% - tecido muscular no segundo dia após o trauma. (A) e (B) - aumento de 4x, (C) – aumento de 10x. Triângulos indicam infiltrado inflamatório; Setas longas áreas de necrose; (*) áreas de edema; Cabeça de seta área de fibrose.

- Figura 21** – Grupo Fonoforese - tecido muscular no segundo dia após o trauma. (A) - aumento de 4x, (B) e (C) – aumento de 10x. Triângulos indicam infiltrado inflamatório, setas longas áreas de necrose, (*) áreas de edema.
- Figura 22** – Gráfico com a análise quantitativa dos parâmetros analisados no sétimo dia após o trauma. Os resultados estão expressos em médias \pm erro padrão, $n= 5/\text{grupo}$. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, quando comparados com o grupo controle, ANOVA, seguido de teste Tukey.
- Figura 23** – Grupo Controle - tecido muscular no sétimo dia após o trauma. (A) e (B) - aumento de 4x. (C) – aumento de 10x. Triângulo indica infiltrado inflamatório; Cabeça de seta: fibrose; (*) Edema; Setas curtas: células com núcleo centralizado.
- Figura 24** – Grupo Ultrassom - tecido muscular no sétimo dia após o trauma. (A) - aumento de 4x. (B) e (C) – aumento de 10x. Triângulo indica infiltrado inflamatório; Cabeça de seta: fibrose, (*) edema; Setas curtas: células com núcleo centralizado.
- Figura 25** – Grupo gel de *C. paupera* 10% - tecido muscular no sétimo dia após o trauma. (A) - aumento de 4x. (B) e (C) – aumento de 10x. Triângulos indicam infiltrado inflamatório; Cabeça de seta: fibrose; (*) edema; Setas curtas: células com núcleo centralizado;
- Figura 26** – Grupo Fonoforese - tecido muscular no sétimo dia após o trauma. (A) e (B) - aumento de 4x. (C) – aumento de 10x. Triângulos indicam infiltrado inflamatório; Cabeça de seta – fibrose; (*) Edema; Setas curtas: células com núcleo centralizado.
- Figura 27** – Volume do edema em função do tempo. Os resultados estão expressos em médias \pm erro padrão, $n= 5/\text{grupo}$. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, quando comparados com o grupo controle, ANOVA, seguido de teste Tukey.
- Figura 28** – Comparação do volume do edema (mL) durante as diferentes horas de avaliação (1^a, 2^a, 3^a e 4^a) após a aplicação dos diferentes tratamentos por via oral. Os resultados estão expressos em médias \pm erro padrão, $n= 5/\text{grupo}$. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, quando comparados com o grupo controle, ANOVA, seguido de teste Tukey.
- Figura 29** – Volume do edema (mL) em função do tempo (h). Os resultados estão expressos em médias \pm erro padrão, $n= 6/\text{grupo}$. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, quando comparados com o grupo controle, ANOVA, seguido de teste Tukey.
- Figura 30** – Comparação do volume do edema (mL) durante as diferentes horas de avaliação (1^a, 2^a, 3^a e 4^a) após a aplicação dos diferentes tratamentos por via tópica. Os resultados estão expressos em médias \pm erro padrão, $n= 6/\text{grupo}$. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, quando comparados com o grupo controle, ANOVA, seguido de teste Tukey.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIEs – Anti-inflamatórios esteroidais
AINEs – Anti-inflamatórios não esteroidais
ALT – Alanina aminotransferase
AST – Aspartato aminotransferase
C. paupera – *Copaifera paupera*
CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais
CFMV – Conselho Federal de Medicina Veterinária
CGAR – Cromatografia gasosa de alta resolução
CGAR-EM – Cromatografia gasosa de alta resolução acoplada a espectrometria de massas
CHCM – Concentração da hemoglobina corpuscular média
CMH – Hemoglobina corpuscular média
DL₅₀ – Dose Letal 50%
EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético
FLONA – Floresta Nacional do Tapajós
Gama-GT – Gama-glutamil transferase
HCT – Hematócrito
HE – Hematoxilina-eosina
HGB – Hemoglobina
mg/kg – miligrama/kilograma
NF- κB – Fator nuclear-κB
OECD – Organization for Economic Co-Operation and Development
OMS – Organização Mundial de Saúde
PLT – Plaquetas
PVC – Policloreto de vinila
RBC – Eritrócito
SISBIO – Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
UFOPA – Universidade Federal do Oeste do Pará
US – Ultrassom terapêutico
VCM – Volume corpuscular médio
VPM – Volume médio plaquetário
WBC – Leucócito total

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	8
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	11
1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 PLANTAS MEDICINAIS.....	15
2.1.1 Copaíba - <i>Copaifera paupera</i>	16
2.1.2 Toxicidade de plantas medicinais	20
2.2 INFLAMAÇÃO	22
2.2.1 Mediadores Inflamatórios	24
2.2.2 Sinais clínicos da inflamação - Edema	25
2.2.3 Tratamento da Inflamação	26
2.3 VIAS DE ADMINISTRAÇÃO DE MEDICAMENTOS	27
2.3.1 Via oral e tópica	27
3. OBJETIVOS	30
3.1 OBJETIVO GERAL.....	30
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
4. MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 MATERIAL BOTÂNICO	31
4.2 COLETA E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA OLEORRESINA	31
4.3 ANIMAIS UTILIZADOS NO ESTUDO	32
4.4 PROTOCOLO EXPERIMENTAL	33
4.4.1 Gel de <i>C. paupera</i> 10%	33
4.4.2 Teste de toxicidade aguda - oral	33
4.4.3 Teste de irritação/corrosão dérmica	35
4.4.4 Lesão muscular - Contusão	37
4.4.5 Teste de edema de pata	41
4.5 DELINEAMENTO ESTATÍSTICO	43
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	44

5.1 COLETA E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA	44
5.2 TOXICIDADE	47
5.2.1 Teste de toxicidade aguda – oral.....	47
5.2.2 Teste irritação/corrosão dérmica.....	51
5.3 ANÁLISE DO TECIDO MUSCULAR APÓS TRAUMA INDUZIDO	54
5.3.1 Análise do tecido muscular 2 dias após a lesão	55
5.3.2 Análise do tecido muscular 7 dias após a lesão	58
5.4 TESTE DE EDEMA DE PATA	63
5.4.1 Tratamento por via oral	64
5.4.1 Tratamento por via tópica.....	67
6. CONCLUSÃO.....	70
REFERÊNCIAS	71
ANEXOS	79

1. INTRODUÇÃO

O uso de produtos naturais como opção terapêutica alternativa para o tratamento de doenças vem sendo cada vez mais estimulado. Na região amazônica a diversidade de recursos naturais proporcionou a detenção de um importante conhecimento dentro da medicina popular, que vem sendo repassado de geração a geração. Devido a isso, de forma a desenvolver tratamentos com menos efeitos colaterais e menor custo, ou com indicação terapêutica complementar, o uso de produtos naturais tem sido objeto de muitos estudos (BRASIL, 2009; MUNIZ, 2009).

Entre os mais utilizados, destaca-se a oleorresina de copaíba, um líquido composto por sesquiterpenos e diterpenos, extraído do tronco das árvores do gênero *Copaifera*. Possui várias espécies descritas, dentre elas, a *Copaifera paupera*. Trata-se de um dos mais importantes produtos da flora brasileira, difundido na medicina popular desde o século XVI (MUNIZ, 2009). É comumente utilizada por via oral, associado ou não a outros produtos naturais, assim como, por via tópica, na sua forma pura e também em forma de pomadas e géis (GARCIA; YAMAGUCHI, 2012; LEANDRO et al., 2012; MACIEL; PINTO; VEIGA JUNIOR, 2002).

A oleorresina de copaíba é reconhecida popularmente por seus efeitos terapêuticos, principalmente o anti-inflamatório e o cicatrizante, sendo muito utilizada para redução dos sinais clínicos da inflamação e recuperação dos tecidos após lesões de diversas origens (ALMEIDA, 2011; BRITO et al., 2006; CARVALHO, 2005; NOGUEIRA et al., 2012).

O processo inflamatório é uma resposta protetora do organismo a qualquer estímulo nocivo e tem como principal objetivo a eliminação do agente lesivo e preparo do tecido atingido para recuperação. Pode ter causa endógena ou exógena e é caracterizado pelos sinais clínicos de dor, calor, eritema, edema e em alguns casos, perda de função (CARVALHO et al., 2013; SILVA; MACEDO, 2011). Tradicionalmente, independente da origem, esse processo é tratado com anti-inflamatórios esteroidais (AIEs) ou não esteroidais (AINEs), entretanto, diversos estudos vêm buscando formas alternativas e eficazes de reduzi-lo e otimizar o tempo e a recuperação do tecido lesionado produzindo menos efeitos colaterais (ALFREDO, 2008; MAIA-FILHO et al., 2011). Nesse contexto, o uso de produtos naturais vem sendo intensamente investigado.

Em decorrência disso, o objetivo desse estudo foi avaliar o potencial de ação da oleorresina de *Copaifera paupera* sobre o processo inflamatório agudo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PLANTAS MEDICINAIS

Para a Organização Mundial de Saúde (1998), planta medicinal é “todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semi-sintéticos”. A utilização desse recurso com finalidade medicinal é uma prática comum desde os primórdios da humanidade (MACIEL; PINTO; VEIGA JUNIOR, 2002), e há registros de sua utilização por civilizações antigas na China, Grécia, Roma e Egito (LAMEIRA; PINTO, 2008).

A partir da década de 1950 o uso de plantas medicinais diminuiu em decorrência da evolução da medicina alopática, porém, devido aos custos elevados dessa forma de tratamento, o uso de produtos naturais continuou sendo a alternativa terapêutica de populações carentes de países em desenvolvimento (GARCIA; YAMAGUCHI, 2012; VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005). Somente a partir de 1978 o investimento em plantas medicinais voltou a ser feito, estimulando a abertura do mercado nacional e internacional na área de fitoterápicos. Esse incentivo se deu em decorrência das descobertas constantes da efetividade de algumas plantas medicinais, além do menor custo e sua aceitação pelos profissionais da saúde e comunidade em geral (SILVEIRA; BANDEIRA; ARRAIS, 2008).

Devido ao consumo crescente desses produtos, muitas vezes, sem nenhuma regulamentação, a Organização Mundial de Saúde (OMS) orienta que haja uma conexão entre a medicina tradicional empírica e a medicina científica, visto que as observações populares sobre a utilização e eficácia dessas plantas contribuem significativamente para a divulgação e estudos sobre suas propriedades medicinais (ALMEIDA, 2011; MACIEL; PINTO; VEIGA JUNIOR, 2002).

No Brasil, o uso de produtos naturais é bastante difundido em decorrência de fatores econômicos, herança cultural africana, indígena e europeia e pela vasta biodiversidade do país, principalmente nas regiões da Floresta Amazônica, Mata Atlântica, Pantanal Matogrossense e Cerrado (ALMEIDA, 2011; LIMA, 2014). Dentre os produtos naturais mais utilizados na medicina popular no Brasil, destaca-se a oleorresina extraída das diversas espécies de árvores do gênero *Copaifera*. Em decorrência disso, avaliar as propriedades medicinais da oleorresina da espécie *C. paupera* foi o objetivo deste estudo.

2.1.1 Copaíba - *Copaifera paupera*

As “copaibeiras” são árvores nativas da região tropical da América Latina e também da África Ocidental (VEIGA JÚNIOR; PINTO, 2002). A maioria dos estudos sobre o gênero *Copaifera* está relacionada com o óleo que é exsudado do tronco destas árvores, a oleorresina de copaíba, muito utilizado na medicina popular para fins terapêuticos em decorrência de seus efeitos anti-inflamatório, analgésico, antiedêmico e bactericida (GOMES et al., 2010; MASSON et al., 2013; MUNIZ, 2009; SANTOS et al., 2008; VEIGA JUNIOR et al., 2007).

Pertence à família *Leguminosae*, subfamília *Caesalpinoideae*, gênero *Copaifera*. Possui 72 espécies descritas, sendo 16 delas encontradas no Brasil. As espécies botânicas mais frequentemente utilizadas na produção de óleo são: *C. reticulata* (70%), *C. guianensis* (10%), *C. multijuga* (5%) e *C. officinalis* (5%) (PIERI; MUSSI; MOREIRA, 2009; VEIGA JÚNIOR; PINTO, 2002).



Figura 1 – No centro da foto um exemplar de *Copaifera* sp.
Foto: Inaê Ferreira.

São árvores de crescimento lento, alcançam de 25 a 40 metros de altura, podendo viver até 400 anos. A floração e frutificação ocorre a partir dos 5 anos de idade, em plantios. A floração ocorre entre outubro e julho e a frutificação entre junho e outubro (NOGUEIRA et al., 2012; VEIGA JÚNIOR; PINTO, 2002).

A origem do nome copaíba vem do tupi cupa-yba, que significa árvore de depósito, ou que tem jazida, fazendo referência ao óleo que guarda em seu interior. A designação correta

para o óleo de copaíba é “a oleorresina”, pois se trata de uma seiva vegetal constituída por ácidos resinosos e compostos voláteis (MUNIZ, 2009; RAMOS, 2006). Suas características variam em decorrência da espécie, condições ambientais e sazonalidade (RIGAMONTE-AZEVEDO et al., 2004). É um líquido com aroma forte e sabor amargo, que pode apresentar baixa ou alta viscosidade e coloração amarelo-pálido até castanho dourado ou vermelho (VEIGA JÚNIOR; PINTO, 2002).

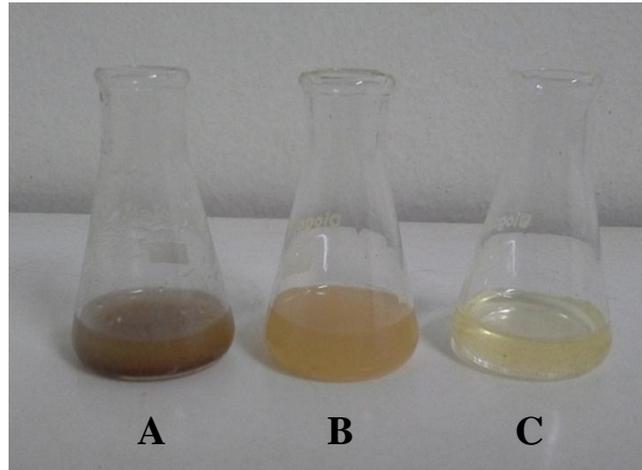


Figura 2 – Oleorresina de três espécies de *Copaifera* da Floresta Nacional do Tapajós (FLONA).
(A) *C. paupera*, (B) *C. reticulata* e (C) *C. dukei*
Foto: Helen Lima

Essa oleorresina provém de canais secretores localizados principalmente no tronco da árvore. São canais formados pela dilatação de espaços intercelulares (meatos) que se intercomunicam no meristema, chamados de canais esquizógenos (PIERI; MUSSI; MOREIRA, 2009). Para a extração do óleo, atualmente a técnica que tem sido considerada como prática não agressiva e sustentável, e é hoje a mais utilizada, foi descrita por Oliveira, Lameira e Zoghbi (2006). Consiste na perfuração do tronco com um trado de aproximadamente 2 cm de diâmetro e 45 cm de comprimento, fazendo-se dois orifícios na altura de 1 m e 1,50 m acima da base da planta, por onde é feita a extração. Após o completo escoamento do óleo, os orifícios são vedados com cano do tipo PVC com $\frac{3}{4}$ de diâmetro e 10 cm de comprimento contendo uma tampa de plástico que é utilizada para facilitar as próximas coletas e proteger a árvore (GARCIA; YAMAGUCHI, 2012).

Para a caracterização química dessa oleorresina, as técnicas utilizadas são a cromatografia gasosa de alta resolução (CGAR) e cromatografia gasosa de alta resolução acoplada a espectrometria de massas (CGAR-EM) (RIGAMONTE-AZEVEDO et al., 2004).

Quanto a sua composição, o óleo de copaíba é uma resina líquida rica em sesquiterpenos e diterpenos em diferentes concentrações. Sendo o ácido copálico considerado

o marcador biológico da copaíba por estar presente em todos os óleos analisados (VEIGA JÚNIOR; PINTO, 2002).

As propriedades medicinais desse óleo já eram bastante difundidas entre os povos locais que viviam no Brasil na época que aqui chegaram os primeiros exploradores europeus no século XVI. Atualmente, trata-se de um dos produtos mais conhecidos e populares da flora brasileira e vem sendo indicado para diversos fins, tanto farmacológicos como também cosméticos e industriais (CARVALHO et al., 2005; LEANDRO et al., 2012; VEIGA JÚNIOR; PINTO, 2002). Como opção terapêutica, através das vias de administração oral e tópica, a oleorresina das diversas espécies do gênero *Copaifera* é comumente utilizada, principalmente na região norte do país, devido ser conhecida popularmente pelos seus efeitos cicatrizantes sobre os tecidos (GOMES et al., 2010; NOGUEIRA, et al., 2012).

Alguns estudos científicos descrevendo a composição química e atividade farmacológica da oleorresina de copaíba ainda são contraditórios. Isso muitas vezes se dá devido à carência de informações de campo sobre a variação de características morfológicas, ausência de ilustrações demonstrativas e dificuldade na identificação botânica (MARTINS-DASILVA; PEREIRA; LIMA, 2008). Além disso, essa contradição de resultados ocorre principalmente durante a análise de óleos comerciais, já que nesses casos a mistura de amostras de diferentes espécies, ou coletados em árvores de idades e locais diferentes é frequente. Também é comum encontrar adulteração do óleo com água, banha animal ou outros tipos de óleos de menor valor agregado (RIGAMONTE-AZEVEDO et al., 2004; VIEIRA et al., 2008).

Sobre seus diversos efeitos terapêuticos, Veiga Junior et al. (2007), através de testes *in vitro* com três espécies de copaíba, *C. multijuga*, *C. reticulata* e *C. cearensis* constataram que todas as espécies testadas apresentaram ação anti-inflamatória, inibindo a produção de óxido nítrico (NO).

Santos et al. (2008) testaram a atividade antimicrobiana e antifúngica da oleorresina de oito espécie do gênero *Copaifera*, e observaram boa atividade dos óleos de *C. martii*, *C. officinalis* e *C. reticulata* contra bactérias gram-positivas, atividade moderada da *C. lucens* contra fungos *T. rubrum* e *M. canis* e ação antifúngica também moderada das espécies *C. cearensis*, *C. langsdorffii* e *C. multijuga* contra o *T. rubrum*.

Estevão et al. (2009) com o intuito de testarem a ação cicatrizante do óleo, produziram uma pomada com a oleorresina de *C. langsdorffii* a 10% e realizaram a aplicação tópica diária em ratos submetidos à elevação do retalho cutâneo dorsal subdérmico, ao final de oito dias de

tratamento constataram o aumento significativo da neoangiogênese quando comparado ao grupo controle.

Gomes et al. (2010), utilizando oleorresina de *Copaifera multijuga*, demonstraram o efeito antinociceptivo da espécie, com possível ação sobre os receptores opióides e também sua ação reduzindo o aumento da permeabilidade vascular, através da inibição dos mediadores histamina e serotonina.

Uma espécie de copaíba que possui poucos estudos científicos sobre seus aspectos físico-químicos e propriedades farmacológicas é a *Copaifera paupera*, que tem como nome científico *Copaifera paupera* (Herzog) Dwyer, também chamada de *Copaifera reticulata* Ducke var. peruviana (REYNEL et al., 2003; RIGAMONTE-AZEVEDO; WADT; WADT, 2006). Trata-se de uma espécie encontrada no Brasil, Bolívia e Peru (MARTINS-DA-SILVA; PEREIRA; LIMA, 2008). Na Amazônia Brasileira está presente na sua porção ocidental, principalmente no estado do Acre, onde se encontra amplamente distribuída. Ocorre frequentemente nessa região, pois, tem preferência por áreas com alto índice pluviométrico, solos argilosos, férteis e bem drenados (REYNEL et al., 2003). Apresenta comumente um óleo de coloração amarelo médio, límpido e com baixa viscosidade e tem como característica a alta produtividade (MARTINS et al., 2012; RIGAMONTE-AZEVEDO; WADT; WADT, 2006).

Dentre os estudos analisando a atividade farmacológica da espécie *Copaifera paupera* estão o de Tincusi et al. (2002) que constataram a ação antibacteriana contra as espécies *B. subtilis*, *S. aureus*, *S. epidermidis*. A ação antileishmanial foi descrita por Kvist et al. (2006) e Santos et al. (2008b). Já Santos et al. (2008a), demonstraram a ação antifúngica moderada da oleorresina após teste *in vitro* contra as espécies *T. rubrum* e *M. cani*.

Atualmente, a utilização da oleorresina de copaíba se dá de forma inespecífica, na maioria das vezes sem o controle sobre qual espécie está sendo utilizada, e sem observar quais propriedades terapêuticas e efeitos aquele óleo apresenta. Dessa forma, como não foram encontrados estudos sobre a ação da oleorresina da *C. paupera* sobre o processo inflamatório, e por haver diferença na composição química das diversas espécies do gênero *Copaifera*, há necessidade de estudos específicos, a fim de se conhecer mais sobre suas propriedades químicas e seu potencial farmacológico.

2.1.2 Toxicidade de plantas medicinais

Apesar da crença de que o uso de produtos naturais é totalmente seguro, atualmente sabe-se que muitas plantas utilizadas para fins medicinais apresentam substâncias agressivas, com potencial risco tóxico, principalmente para o fígado e rins (LIMA, 2014; VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005). No Brasil, estudos sobre o uso seguro de plantas medicinais ainda são escassos, e muitos produtos são vendidos livremente em feiras e mercados, frequentemente sem nenhuma fiscalização ou regulamentação (VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005; VEIGA JUNIOR; PINTO, 2005).

O uso indiscriminado e sem acompanhamento de plantas medicinais pode gerar reações através de causas intrínsecas como: toxicidade, overdose, interação com outros medicamentos e reação alérgica; e extrínsecas como: contaminação, adulteração e preparação e estocagem incorreta (FERREIRA et al., 2013; SILVEIRA; BANDEIRA; ARRAIS, 2008).

A toxicidade trata-se do potencial que determinada substância tem de gerar um estado patológico após ser introduzida e interagir com o organismo, podendo ser gerada de forma aguda ou crônica. A toxicidade aguda é aquela gerada a partir da administração de uma única dose da substância, que leva a uma rápida resposta, em um período de poucas horas, provocando geralmente mortalidade (LIMA, 2014). Dentre as alterações geradas de forma aguda, destacam-se efeitos colaterais como: irritação gastrointestinal, diarreia, sialorréia e depressão do sistema nervoso (MACIEL; PINTO; VEIGA JUNIOR, 2002).

Além dos sinais clínicos, o aumento das enzimas hepatobiliares ocorre em cerca de 90% dos casos de doenças hepáticas agudas, incluindo as induzidas por drogas, sendo consideradas dessa forma, como marcadores sensíveis para avaliação do potencial tóxico de uma substância. Dentre essas enzimas, destacam-se as transaminases (alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST)) e a gama-glutamil transferase (Gama-GT) (ALCÂNTARA, 2007).

As transaminases são enzimas distribuídas nos tecidos e presentes em grandes quantidades nos hepatócitos. Suas concentrações no sangue aumentam significativamente quando ocorre uma lesão nessas células, em decorrência disso, são consideradas como bons indicadores de dano hepatocelular agudo e crônico, pois seu aumento pode ser detectado mesmo em lesões hepáticas leves e antes do aparecimento dos sintomas clínicos. Dentre as causas de lesão no fígado que geram aumento das transaminases no sangue estão as lesões de origem medicamentosas, induzidas por drogas ou toxinas (COSTA et al., 2012).

A gama-glutamil transferase trata-se de uma enzima presente em vários tecidos, como rim, fígado e intestino, porém, seus níveis séricos elevados são decorrentes principalmente de lesões de origem hepática, referindo-se as doenças do fígado e vias biliares. É considerada uma das enzimas de maior sensibilidade nos distúrbios hepáticos e apresenta alterações laboratoriais mais frequentes nesses tipos de patologias (ALCÂNTARA, 2007; LIMA, 2009).

Outro importante parâmetro de avaliação da toxicidade aguda é o sistema hematopoiético, por ser bastante sensível a atividades de agentes citotóxicos. Dessa forma, após a administração de uma substância, é possível a detecção de alterações no exame laboratorial como leucopenia, trombocitopenia e anemia já nas primeiras vinte e quatro horas, dependendo no nível de toxicidade provocada (MEDEIROS, 2009).

O potencial de toxicidade comumente está relacionado ao uso de substâncias terapêuticas através da administração por via oral, porém, a via tópica, que tem como finalidade uma ação local e geralmente apresenta baixa toxicidade, também pode gerar efeitos indesejáveis, como irritação da pele e dano celular, sendo essencial também analisar o potencial irritante de qualquer produto antes de sua utilização (LIMA, 2014). Dessa forma, para o comércio e utilização adequada de produtos de origem natural são indispensáveis testes para identificação dos princípios ativos que geram os efeitos biológicos, e testes de avaliação de toxicidade aguda, com o intuito de classificar as substâncias de acordo com seu potencial de toxicidade ou letalidade (LIMA et al., 2011).

Com a eliminação do uso do teste DL_{50} em 2002, se têm buscado protocolos internacionalmente aceitos e validados, que avaliam esse potencial de toxicidade e atendam a todos os requisitos da experimentação que se relacionam com a ética na pesquisa e bem estar animal (SACHETTI et al., 2009; VALADARES, 2006). Dentre estes, destacam-se os publicados pela Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (Organization for Economic Co-Operation and Development – OECD) (SACHETTI et al., 2009).

Estudos toxicológicos com algumas espécies do gênero *Copaifera* foram realizados e demonstraram baixos níveis de toxicidade. Sachetti et al. (2009) constataram que a espécie *C. reticulata* apresentou toxicidade letal aguda em administração por via oral para valores maiores que 2000 mg/kg. Já Gomes et al. (2010) testaram a toxicidade da espécie *C. multijuga*, administrando 500 mg/kg por via oral em ratos, e verificaram que não houve nenhuma alteração nos animais. Em 2011, Sachetti et al. analisaram a administração por via oral de 500 mg/kg da oleoresina de *C. reticulata* em ratas gestantes e ao final do teste, não houve dano tóxico ou neurotóxico nos fetos. Lima et al. (2011), testaram o uso tópico da espécie *C. duckei*, através de uma pomada vaginal a 2,5% em ratas gestantes e também verificaram

ausência de toxicidade materna e embriofetal, dando dessa forma, relativa segurança de uso desse oleorresina como agente terapêutico dentro dos limites estabelecidos nas pesquisas.

Assim, mesmo já tendo sido testada a toxicidade de diversas espécies do gênero *Copaifera*, a espécie *C. paupera* ainda não possui estudos nesse sentido, e pelo fato da oleorresina apresentar variação química relacionada a fatores como, por exemplo, genéticos e ambientais, torna-se indispensável analisar o potencial tóxico dessa espécie.

2.2 INFLAMAÇÃO

Em decorrência de qualquer lesão tecidual, independente da origem, que pode ser biológica (microrganismos), física (mecânica, térmica ou radiação) ou química (agente irritante de natureza variada como ácidos, formaldeído, cáustica), o organismo gera uma resposta uniforme, o processo inflamatório, que pode ser dividido em eventos vasculares e celulares (CAMARGO, 2006; MUNIZ, 2009).

Trata-se da primeira resposta orgânica diante de uma lesão, e visa defender o organismo de um agente agressor e eliminar através da fagocitose os tecidos lesionados, favorecendo as condições de recuperação do tecido (BRITO et al., 2006; SILVA; MACEDO, 2011). Caracteriza-se pelo aumento do fluxo sanguíneo e lentidão da circulação, o sangue torna-se mais viscoso em decorrência da saída de líquido dos vasos sanguíneos, ocorre aumento da permeabilidade microvascular pela contração das células endoteliais, além da marginalização de leucócitos nas paredes dos capilares e migração para o tecido lesionado de principalmente neutrófilos, permanecendo até 24 horas após a lesão e posteriormente linfócitos e macrófagos, estando presentes até 14 dias após a lesão (KUMAR et al., 2010).

Todo esse processo é dividido em fases, a fase inicial, chamada de aguda, dura entre 24 e 72 horas, seguida então por uma fase subaguda que pode durar por volta de 14 dias e uma fase mais tardia que se caracteriza por remodelamento tecidual (ALFREDO, 2008; NOGUEIRA et al., 2012). Apesar de fazer parte do mecanismo de defesa contra vários tipos de agressões e ser importante no processo de regeneração no tecido lesado, em muitos casos, a continuidade do processo inflamatório de forma prolongada pode também provocar danos ao próprio organismo, gerando lesões secundárias e morte celular, retardando assim, a recuperação do tecido. Dessa forma, é importante que o período de fase aguda da inflamação seja o menor possível, proporcionando assim uma recuperação mais rápida e de melhor qualidade, com menos prejuízos funcionais (ALFREDO, 2008; BRASILEIRO FILHO, 2011; SILVA; MACEDO, 2011).

Uma das formas mais frequentes de dano tecidual com conseqüente indução do processo inflamatório são as lesões de origem mecânica. O músculo estriado esquelético constitui a maior parte da massa muscular voluntária do corpo, sendo intensamente solicitado durante as atividades de vida diária dos indivíduos. Devido a isso, apresenta alta suscetibilidade à lesão, que podem ser decorrentes de contusões diretas, rupturas parciais e totais ou por microtraumatismos de repetição (ALFREDO, 2008; PERTILLE; MACEDO; OLIVEIRA, 2012; SILVEIRA et al., 2010).

Após uma lesão, esse tecido geralmente passa por um processo de “cura” que vai da degeneração até a regeneração, e compreende três fases essenciais: a primeira é a fase inflamatória, também denominada aguda ou de destruição. Essa fase se inicia com a ruptura do sarcolema e é caracterizada pela formação de hematoma, infiltrado de células inflamatórias (principalmente neutrófilos) e edema. A segunda é a fase de reparação (ou regeneração), em que há fagocitose do tecido lesado, regeneração das miofibrilas e produção de tecido cicatricial, caracterizada pela proliferação celular com intensa atividade protéica. A terceira é a fase de cicatrização, ocorre normalmente a partir do 21º dia e é caracterizada pela recuperação gradual das propriedades funcionais do tecido (FARCIC et al., 2012; FERNANDES; PEDRINELLI; HERNANDEZ, 2011; FREITAS, et al., 2007; NOGUEIRA, et al., 2012).

Sob condições biológicas normais, os tecidos, quando lesionados, possuem importante capacidade de autorreparo. Porém, como o processo de recuperação tende a ser lento, diversos tipos de tratamento para amenizar ou inibir os efeitos indesejados do processo inflamatório e promover a aceleração dessa etapa tem sido estudados, incluindo o uso de produtos naturais, já comumente utilizados na medicina popular para essa finalidade (ARTILHEIRO et al., 2012; BRITO et al., 2006). E para avaliar esse processo, modelos experimentais de indução mecânica de lesão muscular podem ser utilizados (CARVALHO et al., 2013; HOLTERMAN; RUDNICKI, 2005; PIOVESAN, 2010).

A contusão muscular é o tipo mais frequente de lesão em seres humanos, ocorre quando o músculo é exposto a uma forte compressão não penetrante, diretamente sobre o ventre muscular. Esse processo gera ruptura das miofibrilas e um quadro geral de inflamação com formação de hematoma, infiltrado inflamatório, edema e necrose (FERNANDES; PEDRINELLI; HERNANDEZ, 2011; SOUZA; GOTTFRIED, 2013). O modelo de contusão para investigação de recursos terapêuticos tem extrema relevância. É um dos métodos mais utilizados pelo fato de ser o mais próximo do que ocorre com seres humanos, não ser invasivo e poder ser utilizado para avaliar a eficiência de diversos métodos de tratamento para

inflamação e recuperação do tecido muscular como o ultrassom terapêutico, crioterapia e uso de substâncias anti-inflamatórias (CARVALHO et al., 2013; PERTILLE; MACEDO; OLIVEIRA, 2012).

Souza e Gottfried (2013) realizaram uma extensa revisão de literatura sobre os diversos modelos de contusão muscular e constataram que para que o método seja adequado, a padronização dos parâmetros da lesão é essencial, para posterior reprodução e melhor comparação dos estudos, pois o mecanismo de lesão pode interferir no processo de recuperação. Dentre os modelos de trauma utilizados, o desenvolvido por McBrier et al. (2009) padronizou e classificou a lesão muscular de acordo com a carga aplicada (peso e altura). A partir desta classificação, o pesquisador pode escolher os parâmetros mais adequados para o experimento proposto, visto que a utilização de diferentes massas e alturas pode gerar lesões leves, moderadas ou graves.

2.2.1 Mediadores Inflamatórios

Após qualquer lesão, o organismo gera uma resposta, a reação inflamatória, isso só ocorre devido a ação de mensageiros químicos que atuam no local da inflamação, denominados mediadores químicos (BRITO et al., 2006).

A histamina é o primeiro mediador da fase inflamatória imediata, encontra-se pré-formada principalmente nos grânulos dos mastócitos, porém, também é encontrada em basófilos e plaquetas sanguíneas. É liberada a partir de estímulos como traumatismos e reações imunes, promove aumento da permeabilidade vascular das vênulas e dilatação arteriolar, favorecendo tanto a saída de células inflamatórias dos vasos sanguíneos, quanto o extravasamento de proteínas plasmáticas. O segundo mediador vasoativo é a serotonina, encontrada nas plaquetas e tem ação semelhante a histamina (COELHO, 2009; LENZ, 2009).

Já as cininas, principalmente a bradicinina, são peptídeos vasoativos liberados a partir de substratos proteicos, que causam aumento da permeabilidade vascular e dilatação dos vasos sanguíneos, contribuindo para a migração celular, dor e hiperalgesia (CAMARGO, 2006).

Outra classe de mediadores que tem grande importância durante o processo inflamatório são os formados a partir do ácido aracdônico, este é liberado a partir da ação da enzima fosfolipase A₂ sobre os fosfolípidios da membrana plasmática das células. O ácido aracdônico sofrerá ação das enzimas cicloxigenase e hiperoxidase sintetizando

prostaglandinas e tromboxanos e ação das lipoxigenases, formando leucotrienos. Esses produtos são importantes, pois, promovem vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e atraem leucócitos para o local lesado (COELHO, 2009; RIO, 2001).

2.2.2 Sinais clínicos da inflamação - Edema

A inflamação caracteriza-se por sinais e sintomas similares, independente da causa da lesão. Celsus (30 a. C. – 36 d. C.) identificou e definiu quatro principais sinais desse processo: dor, calor, rubor e tumor. Posteriormente, já no século XIX, Galeno incluiu a perda de função do local lesionado como quinto sinal (BRASILEIRO FILHO, 2011; MUNIZ, 2009). Esses sinais são decorrentes dos eventos celulares e vasculares que ocorrem no tecido lesado. Em decorrência da dilatação arteriolar e aumento do fluxo sanguíneo no local, ocasionado pelos mediadores químicos, a região tende a ficar avermelhada (rubor) e quente. A dor é decorrente da liberação dos metabólitos do ácido araquidônico e alteração no limiar de dor. Já a perda da função ocorre quando não há uma resolução adequada de todo esse processo, e deve ser evitada sempre que possível, com o intuito de não gerar prejuízos na qualidade de vida do indivíduo (MUNIZ, 2009).

Outro importante sinal da inflamação é o edema. Trata-se de uma tumefação tecidual provocada pela exsudação de líquidos e proteínas dos vasos para o interstício e a sua intensidade pode estar relacionada ao tipo e ao grau da agressão tecidual. Apesar de ser uma resposta fisiológica do organismo, quando persistente, pode gerar consequências desagradáveis, tais como dor, diminuição da amplitude de movimento, perda da função e fibrose. Em virtude disso, é um parâmetro bastante utilizado em pesquisas sobre a inflamação (COELHO, 2009; STARKEY, 2001). E com o intuito de avaliar esse sinal da resposta inflamatória, muitos modelos experimentais podem ser utilizados, dentre eles, sua indução por agentes químicos.

Dentre as técnicas utilizadas para essa finalidade, destaca-se o teste de edema de pata induzido em ratos. Consiste em avaliar a capacidade de determinada substância de inibir um edema, em diferentes tempos, provocado por um agente flogístico. Sendo que o uso da carragenina para este fim é considerado como um modelo padrão de avaliação anti-inflamatória (BRITO et al., 2006; WINTER; RISLEY; NUSS, 1962). A carragenina é um polissacarídeo sulfatado, extraído de algas da família *Rhodophyceae*, principalmente da espécie *Chondrus crispus* (BRASILEIRO FILHO, 2011; LENZ, 2009). Seu uso para induzir a

formação de edema em pata de ratos foi introduzido por Winter, Risley e Nuss (1962) e adaptado por diversos autores como Tasleem et al. (2014), Xu et al. (2014) e Wang et al. (2014).

O edema formado neste modelo é classicamente dividido em fases, promovidas por diferentes mediadores. A primeira fase corresponde a primeira e segunda hora após a administração do agente flogístico, na primeira hora o processo inflamatório é mediado pela histamina e a serotonina. Na segunda hora o principal mediador envolvido é a bradicinina. Já a segunda fase, que compreende a terceira e quarta hora, é mediada pela ação das prostaglandinas e corresponde ao período inflamatório mais intenso (GOMES et al., 2010; MOURA, 2010). Esse método tem como vantagem permitir avaliação de substâncias aplicadas tanto por via tópica, quanto sistêmica (BRITO et al., 2006). É utilizado principalmente para a observação de respostas agudas, visto que avalia a atuação de substâncias sobre a produção de mediadores químicos da inflamação. E para essa análise, é utilizado um aparelho específico, denominado pletismômetro (VIRIATO, 2009).

2.2.3 Tratamento da Inflamação

Tradicionalmente os processos inflamatórios são tratados por duas classes de anti-inflamatórios: os glicocorticoides (esteroides) e os anti-inflamatórios não-esteroidais (AINES). Os primeiros exercem seus efeitos pela ligação a receptores citoplasmáticos nas células alvo, interferindo nas diversas vias de sinalização e alterando a atividade de fatores de transcrição como o NF- κ B, modulando negativamente genes pró-inflamatórios, incluindo os que codificam principalmente a enzima fosfolipase A2. Essa classe de medicamentos pode gerar como efeitos colaterais: imunossupressão, osteoporose e síndrome de Cushing (CARVALHO et al., 2013; MUNIZ, 2009).

Já os AINES são os mais comumente utilizados no tratamento de processos inflamatórios, sendo que os mais populares atuam de forma a suprimir a atividade da enzima ciclo-oxigenase, evitando a formação dos produtos derivados do ácido aracdônico, porém, por reduzirem a produção tanto de prostaglandinas pró-inflamatórias, como as fisiológicas, podem gerar como efeitos colaterais irritação da mucosa gástrica e toxicidade hepática e renal. Além disso, também representam um alto custo, principalmente para populações de países em desenvolvimento (LENZ, 2009).

Em decorrência disso, cada vez mais tem sido estimulada a busca de substâncias com atividade anti-inflamatória que possam vir a ter menos efeitos colaterais, ou que possam ser utilizadas como terapia complementar as já existentes. Dentre essas substâncias e métodos alternativos estudados, está o uso de produtos de origem natural.

2.3 VIAS DE ADMINISTRAÇÃO DE MEDICAMENTOS

As vias de administração representam a maneira que uma substância entra em contato com o organismo, podendo ser por via oral (boca), retal (ânus), parenteral (injetável), dermatológica ou tópica (pele), nasal (nariz), entre outras. A indicação de cada via se dá pelas necessidades específicas do tratamento, como: condição do indivíduo que irá receber a medicação, propriedades físico-químicas da substância e efeito desejado. Em todos os casos há vantagens e desvantagens (ANVISA, 2010).

2.3.1 Via oral e tópica

Dentre as diversas modalidades de administração de medicamentos, a via oral é a mais frequentemente utilizada pela sua alta eficiência, simplicidade e a não necessidade de equipamentos específicos para sua administração. Através dessa via, os medicamentos podem exercer seu efeito local no trato gastrointestinal ou serem absorvidos pela mucosa (boca, estômago ou intestino delgado) e atingirem o sangue ou a linfa, agindo de forma sistêmica (SILVA, 2010). Apesar das inúmeras vantagens, a administração por via oral apresenta desvantagens, pois, produz absorção limitada ou irregular da droga, movimenta as substâncias através da parede intestinal e do fígado, que podem inativar as substâncias antes que elas cheguem à circulação sistêmica. Além disso, as medicações orais também podem irritar o trato gastrointestinal, descolorir os dentes e ter um sabor desagradável. Em alguns casos podem inclusive ser contraindicadas, como nos casos em que o paciente apresenta vômito, síndrome da má absorção e inconsciência (CABRAL, 2002).

Em decorrência dos efeitos colaterais indesejáveis e contraindicações da administração oral, a via de aplicação tópica, através da penetração transdérmica tem sido uma alternativa muito estudada (LENZ, 2009). A administração tópica de medicamentos objetiva a penetração do princípio ativo nos tecidos abaixo do sítio de aplicação, tais como músculo e articulações (PELIZZARI et al., 2012). Trata-se de uma via utilizada para produzir efeitos locais, e possui

a vantagem de ser um método de fácil aplicação, indolor, não invasivo e que tem poucos efeitos colaterais, além disso, seu uso é bem aceito pela população (CERRUTI, 2009). A desvantagem dessa forma de aplicação é que a pele atua como uma barreira seletiva, evitando a entrada no organismo de moléculas do meio externo. É composta por três camadas: epiderme, derme e hipoderme. Na primeira camada, encontra-se o estrato córneo, barreira mais importante contra a permeação de compostos através da pele. Devido a isso, inúmeras alternativas têm sido desenvolvidas para facilitar a permeação nessa barreira como: diferentes formas de dosagem, utilização de transportadores (nanoemulsões, nanopartículas) e métodos de melhoramento de penetração, tanto químicos, quanto físicos (HAROUTIUNIAN; DRENNAN; LIPMAN, 2010; LENZ, 2009).

Dentre essas técnicas, uma bastante utilizada entre as terapias físicas por possuir baixo custo e facilidade de aplicação é a fonoforese, ou seja, a associação de uma substância aplicada por via tópica, com um recurso físico, o ultrassom terapêutico (US) (ALFREDO, 2008).

Para Camargo (2006) a fonoforese é definida como

“o movimento de drogas introduzidas, sob influência de ondas ultrassônicas, em tecidos moles através da pele intacta”.

O US é utilizado para auxiliar o transporte transdérmico, inclusive de substâncias hidrofílicas e é muito utilizado para facilitar a penetração de substâncias aplicadas topicamente. (AGNE, 2004; PELIZZARI, et al., 2012; SOUZA, et al., 2013). É utilizado por contato direto, com associação de um agente acoplador para evitar reflexões de energia ultrassônica na interface ar/tecido. Esse agente acoplador deverá ser viscoso, para agir como um lubrificante quando o transdutor for movido sobre a pele. Os mais utilizados são na forma de géis, visto que essa forma apresenta melhor transmissão quando comparada com cremes e pomadas (FARCIC et al., 2012; ORELLANA; KOBAYASHI, 2006).

A técnica agrega os efeitos da droga introduzida com os do ultrassom, recurso terapêutico muito utilizado para bioestimulação do reparo tecidual, essa associação gera perturbação dos tecidos e movimentação rápida das partículas, o que facilita a absorção da substância. Apresenta diversas vantagens, pois promove a administração de medicamentos de maneira segura e indolor (CAMARGO, 2006; KOEKE et al., 2005; YANG et al. 2005).

As ondas ultrassônicas são absorvidas pelos tecidos e transformadas em calor, ocorrendo principalmente em nível molecular, sendo as proteínas os tecidos que mais absorvem. Ao penetrarem nos tecidos, provocam vibração celular (micromassagem),

produzindo o aumento da permeabilidade da membrana, acelerando assim, a velocidade de difusão iônica através dela (MAIA-FILHO et al., 2011). Os efeitos tidos como efetivos na reparação e na regeneração de lesões de tecidos moles são a cavitação e o micro fluxo acústico (AGNE, 2004).

O termo cavitação define-se como a formação microscópica de bolhas de gás em decorrência das alterações de pressão nos fluidos teciduais causadas pela energia ultrassônicas (SOUZA et al., 2013). É considerada benéfica para o organismo, pois aumenta o fluxo do fluido circulante. Já o microfluxo acústico, trata-se de um movimento unidirecional de fluídos ao longo e ao redor das membranas celulares, tem a capacidade de deslocar pequenas moléculas e íons, ocorre como resultado das variações de pressão mecânica causada pelo US podendo alterar a estrutura, a função e a permeabilidade da membrana celular, estimulando assim o transporte de mensageiros secundários, tais como o cálcio (RIBEIRO, 2009; SILVEIRA et al., 2010).

Isoladamente, o ultrassom tem potencial de acelerar o curso normal da inflamação desde que o estímulo inflamatório seja removido, fazendo com que a fase de reparo seja adiantada. Essa aceleração dever-se à agitação do líquido dos tecidos que pode aumentar a taxa de fagocitose e o movimento das partículas e células. Parece haver consenso que o ultrassom pode exercer a ação pró-inflamatória, através de seu efeito estimulante sobre os mastócitos, plaquetas, e glóbulos brancos com funções fagocíticas e macrófagos, promovendo a liberação de histamina (ALFREDO et al., 2008; MAIA-FILHO, et al., 2011; SILVEIRA, 2010).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL:

- Avaliar o potencial anti-inflamatório da oleorresina de *Copaifera paupera* (Herzog) Dwyer – Leguminosae.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Realizar a coleta e caracterização química da oleorresina da espécie *C. paupera*;
- Avaliar a toxicidade oral aguda da oleorresina de *C. paupera*;
- Avaliar o potencial de irritação dérmica da oleorresina de *C. paupera*;
- Avaliar os efeitos da oleorresina de *C. paupera* na fase inflamatória aguda de uma lesão muscular induzida;
- Avaliar a ação antiedematogênica da oleorresina de *C. paupera*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O desenvolvimento da presente pesquisa ocorreu no período de junho de 2013 a maio de 2015, nos Laboratórios de Biotecnologia Vegetal, Farmacologia, Bioprospecção e Biologia Experimental, Morfofisiologia Animal e Sanidade Animal da Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA).

4.1 MATERIAL BOTÂNICO

A oleorresina utilizada foi procedente da Floresta Nacional do Tapajós (FLONA), localizada no Km 83, no município de Belterra, estado do Pará (latitude 3° S 07' 36,2528517843", longitude 54° W 99' 59,896691144"). Foi coletada no mês de abril/2014, correspondendo ao período de maior precipitação pluviométrica do ano na região.



Figura 3 – Oleorresina de *C. paupera*
Foto: Helen Lima

A pesquisa e coleta foram autorizadas pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade – SISBIO, sob o número 44380-1. A espécie utilizada nesse estudo foi identificada botanicamente e suas exsiccatas estão depositadas no Herbário IAN da Embrapa Amazônia Oriental, sob o número de identificação botânica (NID): 69/2011.

4.2 COLETA E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA OLEORRESINA

A coleta foi realizada na Floresta Nacional do Tapajós (FLONA), no mês de abril de 2014. O método de extração utilizado foi o descrito por Oliveira, Lameira e Zoghbi (2006), que consiste na abertura de dois orifícios na altura de 1 m e 1,5 m no tronco da árvore com um

trado de aproximadamente 2 cm de diâmetro e 45 cm de comprimento. Após a perfuração, foram introduzidos 2 canos, tipo PVC com $\frac{3}{4}$ de diâmetro e 10 cm de comprimento para facilitar o escoamento do óleo.

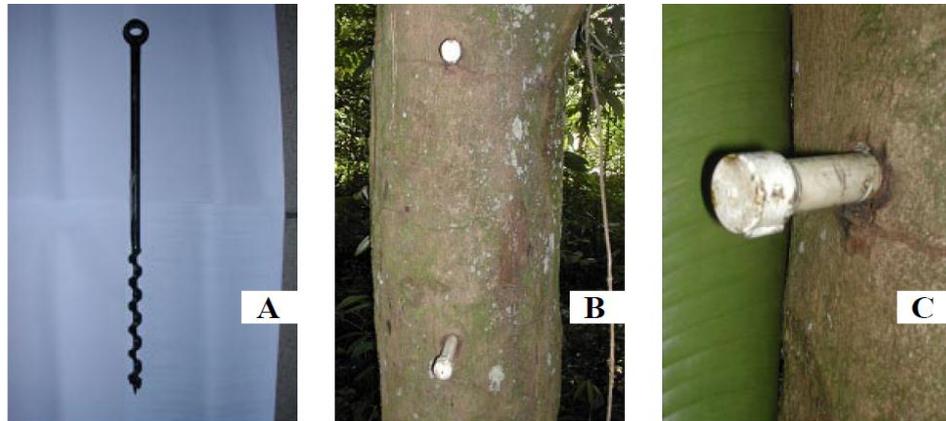


Figura 5 - Técnica para extração do óleo de copaíba. Trado (A), Orifícios (B), Cano de PVC (C)
Fonte: Oliveira, Lameira e Zoghbi (2006)

A caracterização química da oleorresina foi feita através das técnicas de cromatografia gasosa de alta resolução (CGAR) em parceria com Centro de Análises e Pesquisas da Universidade Federal de Santa Maria.

4.3 ANIMAIS UTILIZADOS NO ESTUDO

O projeto de pesquisa foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFOPA, sob o protocolo nº 01001/2014 (Anexo I) e atendeu às normas de ética em experimentação animal. Para a realização dos testes, foram utilizados ratos da espécie *Rattus norvegicus albinus*, linhagem Wistar, adultos, saudáveis e sedentários, provenientes do biotério da Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA) – Campus Oriximiná. Esses animais ficaram alojados em gaiolas de contenção de polipropileno, com temperatura ambiente de 25°C e fotoperíodo de 12 horas claro/escuro controlados, recebendo água e ração *ad libitum*.

4.4 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

4.4.1 Gel de *C. paupera* 10%

Neste estudo, foi utilizada a oleorresina da espécie *Copaifera paupera*, tanto na forma pura (*in natura*), quanto manipulada em forma de gel a 10% (Figura 4), produzido e fornecido pela Bioativa Farmácia de Manipulação Ltda – Santarém/Pará. A escolha dessa concentração foi baseada no Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira (2011) e no estudo de Estevão et al. (2009), visto que esta forma de administração tem vantagens em decorrência da diminuição da concentração do fármaco e facilidade de aplicação sem causar oleosidade excessiva.



Figura 4 – Gel de *C. paupera* 10%
Foto: Helen Lima

4.4.2 Teste de toxicidade aguda - oral

O teste se baseou no protocolo recomendado pelo guia OECD 423/2001, que tem como princípio a utilização de doses moderadamente tóxicas, a fim de se evitar doses que causem dor ou sofrimento excessivo e morte dos animais. Dessa forma, estabelece doses fixas de 5, 50, 300 e 2000 mg/kg para esse tipo de estudo. Para a realização, foram utilizados animais fêmeas, nulíparas, não grávidas, com idade entre 8 e 12 semanas, com variação de peso de no máximo 20%. Os animais ficaram em jejum de ração 12 horas antes do teste, recebendo apenas água a vontade, e tiveram acesso a ração após 3 horas da administração da oleorresina de *C. paupera*. O peso corporal dos animais foi verificado no dia da administração, no 7º e no 14º dia pós-administração.

Inicialmente foram formados dois grupos experimentais, com três animais em cada. O grupo controle recebeu apenas o veículo de diluição (tween 80 a 2% e solução salina a 0,9%). Já o grupo teste foi tratado com 2000 mg/kg de oleorresina de *C. paupera* diluído em tween 80 a 2% e solução salina 0,9% por via oral, através de gavagem. O volume final administrado em cada animal foi de 1 mL/100 g de peso corporal. A dose inicial administrada se baseou em estudos prévios com outras espécies de copaíba que não demonstraram efeito tóxico (GOMES et al., 2010; SACHETTI et al., 2009), e o protocolo de diluição foi baseado no estudo de Sachetti et al. (2011).

Após a administração da dose da oleorresina, os animais foram observados individualmente pelo menos uma vez durante os primeiros 30 minutos e periodicamente durante as primeiras 24 horas, com especial atenção durante as primeiras 4 horas, e diariamente a partir de então até um total de 14 dias. Os parâmetros observados como possíveis reações tóxicas foram: alterações na pele, pelo, olhos e mucosas, salivação, tremores/convulsão e alterações comportamentais como irritabilidade e sonolência. Caso fosse observado algum desses sinais, o tempo de início e duração do período de recuperação seriam registrados.

No décimo quarto dia os animais foram eutanasiados através de técnica padronizada de injeção intraperitoneal, com aplicação de uma superdose (overdose) de pentobarbital sódico, (de 90 a 150 mg/kg), conforme recomenda a Resolução CFMV n.1000/2012 (CEUA UNINOVE, 2012). Após a eutanásia, os animais passaram por necropsia para análise de órgãos da cavidade corpórea como estômago, fígado e rins. Foram observados aspectos como coloração, consistência e tamanho.

Dependendo da mortalidade observada durante as primeiras 24 horas e dos efeitos adversos e quantidade de indivíduos que apresentaram tais efeitos, seria determinada a continuidade dos experimentos com a dose imediatamente inferior (300 mg/kg). Cada dose foi testada duas vezes e a partir dos resultados foi estimada a categoria toxicológica da oleorresina a partir do guia da OECD 423/2001 (Anexo II).

Com o intuito de complementar o teste de toxicidade aguda foram mensurados:

- Parâmetros bioquímicos: alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e gama-glutamil transferase (Gama-GT);
- Parâmetros hematológicos: leucócito total (WBC), eritrócito (RBC), hemoglobina (HGB), hematócrito (HCT), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (CMH), concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM), plaquetas (PLT) e volume médio plaquetário (VPM).

Para isso, após 24 horas da administração da dose da oleorresina de *C. paupera* (2000 mg/kg) foi feita a coleta de 1,5 mL de sangue de cada animal através de punção cardíaca, e o sangue distribuído em tubos contendo anticoagulante EDTA. Para a realização dos exames bioquímicos os tubos contendo as amostras foram centrifugados durante 5 minutos em centrífuga Benfer® a 3.000 rpm para a separação do soro. Foram utilizados kits de diagnóstico padronizados (Labtest®) para as avaliações dos parâmetros e a análise feita através do aparelho Labmax 240 - Labtest® - automático. Para a realização do exame hematológico o aparelho utilizado foi o BC-2800Vet - Mindray® – automático. Os resultados foram comparados aos animais do grupo controle e aos parâmetros de normalidade para *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar, encontradas na literatura.

4.4.3 Teste de irritação/corrosão dérmica

O teste foi baseado no protocolo recomendado pelo guia da OECD 404/2002 para única aplicação e de forma adaptada para avaliar a irritação através de doses repetidas.

Para a realização do teste, foram utilizados animais fêmeas, nulíparas, não grávidas, com idade entre 8 e 12 semanas, com variação de peso de no máximo 20%. Aproximadamente 24 horas antes da aplicação da oleorresina de *Copaifera paupera* (na forma pura, gel a 10% e fonoforese) foi feita a tricotomia de 6 cm² no dorso desses animais em duas regiões. A região superior foi utilizada como controle e não recebeu nenhum tipo de substância e na região inferior foi aplicada a substância a ser testada (Figura 6A). Para o teste foram formados grupos experimentais com um animal em cada, como estabelece o protocolo, para uma aplicação única da substância e grupos experimentais para aplicação de doses repetidas durante 6 dias.

❖ Grupos experimentais (n= 1; teste de confirmação n= 3)

- **Única aplicação por via tópica:**
 - Grupo copaíba (0,5 mL de oleorresina de *C. paupera in natura*);
 - Grupo gel de copaíba 10% (0,5 mL de gel de *C. paupera* a 10%);
 - Grupo fonoforese (0,5 mL de gel de *C. paupera* a 10% associada ao ultrassom terapêutico).
- **Aplicação de doses repetidas por via tópica – 6 dias:**
 - Grupo copaíba (0,5 mL de oleorresina de *C. paupera in natura*);
 - Grupo gel de copaíba 10% (0,5 mL de gel de *C. paupera* a 10%);

- Grupo fonoforese (0,5 mL de gel de *C. paupera* a 10% associada ao ultrassom terapêutico).

Após a aplicação, a pele desses animais foi coberta com uma gaze e fixada com fita adesiva não irritante (Figura 6B).

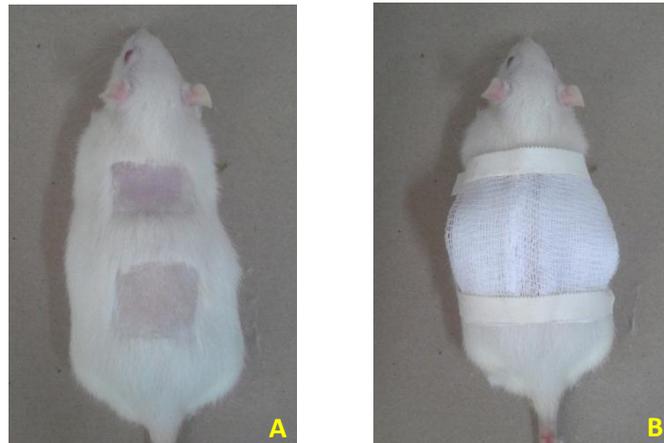


Figura 6 – (A) Dorso dos animais após tricotomia; (B) Dorso protegido com gaze
Foto: Helen Lima

Quatro horas após a aplicação, a substância foi retirada cuidadosamente. No caso de identificação durante esse período de qualquer reação que tenha gerado dor ou sofrimento excessivo ao animal, o teste seria encerrado imediatamente. Caso não se observasse qualquer sinal corrosão da pele, o teste de confirmação deveria ser realizado com mais 3 animais. A inspeção do tecido foi realizada: imediatamente após a retirada da gaze e substância da pele, e em seguida, após 1, 24, 48 e 72h. Durante a observação foram registrados sinais de eritema e edema a serem classificados da seguinte forma:

Eritema e formação de escaras:

- Sem eritema (grau 0);
- Eritema leve (quase imperceptível) (grau 1);
- Eritema bem definido (grau 2);
- Eritema moderado a grave (grau 3);
- Eritema grave e formação de escara (grau 4).

Edema:

- Sem edema (grau 0);
- Edema leve (quase imperceptível) (grau 1);

- Edema ligeiro (bordas área bem definidas por elevação) (grau 2);
- Edema moderado (elevado a cerca de 1 mm) (grau 3);
- Edema grave (com elevação superior a 1 mm e excedendo a área de exposição) (grau 4).

Também foram observados possíveis efeitos sistêmicos de toxicidade, como análise de mucosas e alterações comportamentais como letargia e irritabilidade. Ao final, caso a aplicação da oleorresina na pele do animal resultasse em produção de lesões reversíveis, a mesma seria considerada como uma substância que provoca irritação dérmica. Caso a aplicação promovesse danos irreversíveis na pele como necrose visível através da epiderme e na derme, úlceras e hemorragia, a substância seria considerada como corrosiva.

4.4.4 Lesão muscular - Contusão

Para este teste foram utilizados animais machos, adultos, com 8 a 12 semanas de idade, pesando entre 300 e 350 g. A sequência dos procedimentos foi: indução anestésica, tricotomia, trauma muscular, aplicação das terapias, eutanásia, preparo e análise histológica das lâminas.

- **Indução anestésica e tricotomia**

A técnica de indução anestésica empregada foi o método de injeção intraperitoneal de quetamina (90 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) (CEUA UNINOVE, 2012). Após isso foi feita a tricotomia no membro posterior esquerdo do animal.

- **Mecanismo lesional:**

Para a produção da lesão muscular, foi utilizada a técnica descrita por McBrier et al. (2009). Consiste na queda de um cilindro metálico com 267 g, de uma altura de 60 cm sobre região posterior do membro posterior (esquerdo) do animal. Para isso, foi empregado um equipamento que consiste em uma plataforma dupla de madeira, transpostas em seu centro por uma peça de policloreto de vinila (PVC) (Figura 07 e 08).



Figura 7 – Mecanismo de lesão adaptado
Foto: João Oliveira.



Figura 8 – Mecanismo de lesão. Local do impacto.
Foto: João Oliveira.

O animal foi posicionado anestesiado e em decúbito ventral, sobre a tábua de base do mecanismo lesional com o membro esquerdo no centro da porção terminal da peça de PVC. O membro a ser lesionado foi então posicionado de forma que o músculo gastrocnêmio ficasse voltado para cima. A lesão foi provocada pela liberação de um cilindro metálico que percorreu o trajeto interior da peça de PVC e então atingiu o ventre do músculo gastrocnêmio do membro dos animais. Todos os animais foram submetidos a um único trauma.

Os animais foram observados durante todo o experimento, e os que apresentassem sinais macroscópicos de lesão de continuidade na pele ou infecção em decorrência do trauma, seriam retirados da pesquisa.

- **Aplicação das terapias**

O tratamento foi iniciado 24 horas após a produção da lesão, com a primeira aplicação, sendo que as seguintes ocorreram na mesma hora do dia, observado o período de vinte e quatro horas entre as aplicações.

- **Grupos experimentais (n= 5)**

Grupos para análise 2 dias após o trauma:

- Grupo I (Controle): Animal não foi submetido ao trauma, nem ao tratamento;
- Grupo II (Trauma): Lesão;
- Grupo III (US): Lesão + tratamento com US e gel convencional;

- Grupo IV (Copaíba tópico): Lesão + tratamento tópico com gel de *Copaifera paupera* a 10%;
- Grupo V (Fonoforese): Lesão + US e gel de *Copaifera paupera* a 10%;

Grupos para análise 7 dias após o trauma:

- Grupo I (Controle): Animal não foi submetido ao trauma, nem ao tratamento;
- Grupo II (Trauma): Lesão;
- Grupo III (US): Lesão + tratamento com US e gel convencional;
- Grupo IV (Copaíba tópico): Lesão + tratamento tópico com gel de *Copaifera paupera* a 10%;
- Grupo V (Fonoforese): Lesão + US e gel de *Copaifera paupera* a 10%;

- **Protocolo de aplicação da terapia**

- Grupo I (Controle): Os animais não foram submetidos a nenhum trauma e não receberam nenhum tipo de tratamento;
- GRUPO II (Trauma): Os animais foram submetidos ao trauma e não receberam nenhum tipo de tratamento.
- GRUPO III (US): Os animais foram tratados com o aparelho ultrassom terapêutico (Ibramed®), tendo como parâmetros: frequência de 1 MHz, modalidade pulsado a 20%, intensidade de 0,6 W/cm² e duração de pulso de 2 ms, durante 1 minuto.
- GRUPO IV (Copaíba tópico): Os animais foram tratados com 0,5 mL de gel de *Copaifera paupera* a 10%, administrado por via tópica na região lesionada. A aplicação ocorreu durante 1 min, para isso foi utilizado o cabeçote do ultrassom terapêutico desligado, assim, todos os animais foram expostos ao mesmo estresse durante a aplicação, como recomendado por Ricoldy (2010).
- GRUPO V (Fonoforese): Os animais foram tratados com administração por via tópica de 0,5 mL de gel de *Copaifera paupera* a 10% associada ao ultrassom terapêutico (Ibramed®), com os parâmetros: frequência de 1 MHz, modalidade pulsado a 20%, intensidade de 0,6 W/cm² e duração de pulso de 2 ms, durante 1 minuto.

Os parâmetros do ultrassom utilizados na pesquisa foram baseados no estudo de feito por Camargo (2006), que após comparar diferentes parâmetros, constatou que este é o mais efetivo em casos de processo inflamatório agudo.

- **Eutanásia**

Os dias de eutanásia foram: no segundo e no sétimo em decorrência da primeira semana após a lesão corresponder ao período inflamatório. Dessa forma foi possível analisar os efeitos iniciais do tratamento no processo inflamatório e a fase inicial da recuperação do tecido lesionado (KUMAR et al., 2010). A técnica de eutanásia padronizada utilizada neste estudo foi o método de injeção intraperitoneal, com aplicação de uma superdose (overdose) de pentobarbital sódico duas a três vezes a dose anestésica (3 x 30 a 50 mg /kg) ou seja, de 90 a 150 mg/kg, conforme recomenda a Resolução CFMV n.1000/2012 (CEUA UNINOVE, 2012).

- **Coleta e análise histológica das amostras**

Depois de detectada a morte destes animais foi feita retirada cirúrgica do músculo gastrocnêmio. Os músculos foram acondicionados em recipientes contendo paraformaldeído a 4%. Para a análise histológica, as amostras passaram por um processo de desidratação através de 6 banhos de álcool de 1 hora de duração cada, em concentrações progressivas de 75%, 85%, 95%, 100%, 100% e 100%. Após a desidratação, as amostras foram submetidas à diafanização com dois banhos consecutivos em xilol de 1 hora de duração cada. Na fase seguinte realizou-se a parafinização onde as amostras foram imersas em parafina líquida à 75° C. As amostras foram então agrupadas e após o resfriamento e a solidificação da parafina, o bloco foi levado ao micrótomo. No micrótomo foram realizados cortes histológicos transversais na espessura de 05 micrômetros que após a desparafinização foram corados pela técnica da hematoxilina-eosina (HE), montados com lamínula, analisados ao microscópio óptico comum, fotografados e analisados (Figura 09).



Figura 9 – Processamento das amostras – rotina histológica. (A) Desidratação; (B) Diafanização; (C) Parafinização; (D) Emblocamento; (E) Solidificação da parafina; (F) Blocos com as amostras; (G) Realização dos cortes histológicos no micrótomo e (H) Cortes histológicos da amostra na lâmina

Foto: Helen Lima

As amostras foram submetidas a exames microscópicos com avaliações qualitativas observando-se o foco de maior atividade celular para definir o campo microscópico a ser analisado. A análise histológica qualitativa dos cortes compreendeu os parâmetros importantes para recuperação tecidual envolvendo: presença de células com núcleos centralizados, fibrose, edema, necrose e presença de infiltrado inflamatório.

A análise quantitativa consistiu na graduação dos componentes teciduais descritos acima em ausente (grau 0), discreto (grau 1), moderado (grau 2) e intenso (grau 3).

4.4.5 Teste de edema de pata

O teste de atividade antiedematogênica da oleorresina de *Copaifera paupera* foi realizado conforme o modelo de edema de pata induzido por carragenina proposto por Winter, Risley e Nuss (1962). Para isso, foram utilizados animais machos, adultos, pesando entre 250 e 300 g divididos nos seguintes grupos de acordo com a forma de administração do tratamento:

Tratamento por via tópica (n= 6):

- Grupo I (Controle): Gel a base de carbopol (neutro);
- Grupo II (Controle positivo): Diclofenaco dietilamônio (11,6 mg/kg);
- Grupo III: Gel da oleorresina de *C. paupera* a 10%;
- Grupo IV: Oleorresina de *C. paupera* pura;

Tratamento por via oral (n= 5):

- Grupo I (controle): solução salina 0,9% + tween a 2% (1 mL/kg);
- Grupo II (Controle positivo): indometacina (10 mg/kg);
- Grupo III: oleorresina de *C. paupera* (10 mg/kg);
- Grupo IV: oleorresina de *C. paupera* (100 mg/kg);
- Grupo V: oleorresina de *C. paupera* (500 mg/kg).

Os tratamentos administrados por via oral foram aplicados por meio de uma cânula orogástrica acoplada a uma seringa contendo as quantidades de solução de acordo com o peso de cada animal. Para a administração oral dos tratamentos, a oleorresina foi diluída em solução salina a 0,9% associada ao tween 80 a 2% (SCHARETTI et al., 2009). As doses administradas por via oral foram baseadas no protocolo de Muniz (2009), que realizou o mesmo teste, porém, com outra espécie de *Copaifera*. Além disso, a maior dose utilizada neste teste (500 mg/kg) representou $\frac{1}{4}$ da dose teste utilizada no protocolo de toxicidade aguda (2000 mg/kg), dando assim, margem de segurança para sua realização sem riscos de mortalidade e/ou morbidade nos animais.

Os tratamentos por via tópica foram realizados com aplicação de 0,1 mL do gel de *C. paupera* a 10% ou oleorresina de *C. paupera* pura sobre a região subplantar da pata posterior de direita dos animais com leve fricção durante um minuto para a absorção das substâncias na pele.

Sessenta minutos após a administração destes tratamentos cada animal recebeu no tecido subcutâneo do coxim da pata posterior direita, uma injeção de 0,1 mL de carragenina diluída a 1% (p/v) em solução salina 0,9% (WINTER; RISLEY; NUSS, 1962).

O volume da pata foi mensurado através de um pletismômetro digital de pata para ratos EFF 304 Insight®, quantificando – se o volume de água deslocado com a imersão da pata do animal numa câmara de água até a região da articulação tíbiotársica (Figura 10).



Figura 10 – (A) Pletismômetro digital; (B) Imersão da pata do animal.

Foto: Helen Lima

A primeira mensuração foi feita imediatamente após a aplicação da carragenina (correspondendo ao tempo zero) e nas horas seguintes até quatro horas após a aplicação da carragenina, com intervalo de uma hora entre as medições. O volume do edema foi considerado como a diferença entre o volume da pata em cada hora de medição e o volume da pata no tempo zero. Esses valores foram registrados e colocados em gráficos em função do tempo.

4.5 DELINEAMENTO ESTATÍSTICO

Os dados foram registrados e armazenados em planilhas do programa *Excel* (*Microsoft for Windows*[®] - EUA, versão 2010). Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média para os respectivos experimentos e analisados empregando-se o teste de Análise de Variância ANOVA *one way* e teste de Tukey, considerando o valor de $p \leq 0,05$ como nível de significância estatística.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 COLETA E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA

A coleta da oleorresina foi realizada no mês de abril de 2014, correspondendo ao período chuvoso do ano e foi obtida a quantidade de 34 mL de um único indivíduo identificado como da espécie *C. paupera*. A oleorresina coletada foi um líquido transparente, com aspecto límpido, pouco viscoso e com a coloração amarelo – claro.



Figura 11 – Coleta da oleorresina de copaíba
Foto: João Oliveira.

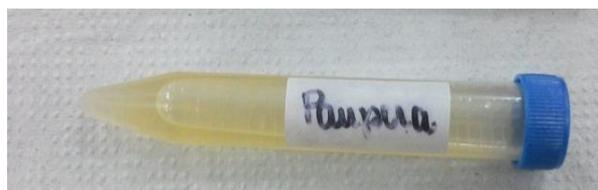


Figura 12 – Óleorresina de *C. paupera* (*in natura*)
Foto: Helen Lima

Através da caracterização química realizada por cromatografia gasosa de alta resolução constatou-se que os componentes majoritários presentes na oleorresina utilizada neste estudo e expostos na Tabela 1 são: α -Copaeno (38,55%), β -Cariofileno (20,94%) e β -Bisaboleno (12,37%).

Tabela 1 – Caracterização química da oleorresina de *C. paupera* do período chuvoso – em destaque (*) os componentes majoritários

Componentes	Período chuvoso Area (%)	Fórmula Molecular
δ-elemeno	0.49	C ₁₅ H ₂₄
α-Cubebeno	1.57	C ₁₅ H ₂₄
α-Copaeno*	38.55 *	C ₁₅ H ₂₄
Cipereno	0.12	C ₁₅ H ₂₄
β-Cariofileno*	20.94 *	C ₁₅ H ₂₄
<i>t</i> -α-Bergamoteno	0.81	C ₁₅ H ₂₄
α-aromadendreno	-	C ₁₅ H ₂₄
α-Humuleno	1.22	C ₁₅ H ₂₄
Germacreno-D	1.68	C ₁₅ H ₂₄
β-Selineno	2.32	C ₁₅ H ₂₄
α-Zingibereno	5.83	C ₁₅ H ₂₄
α-Muurolo	1.04	C ₁₅ H ₂₄
β-bisaboleno*	12.37 *	C ₁₅ H ₂₄
δ-Cadineno	4.15	C ₁₅ H ₂₄
γ-Cadineno	1.63	C ₁₅ H ₂₄
<i>t</i> -Calameneno	-	C ₁₅ H ₂₂
α-Cadideno	2.11	C ₁₅ H ₂₄
Germacreno-B	0.32	C ₁₅ H ₂₄
Espatulenol	0.19	C ₁₅ H ₂₄ O
Cariopileno oxido	3.14	C ₁₅ H ₂₄ O
Globulol	0.09	C ₁₅ H ₂₆ O
Eudesmol	-	C ₁₅ H ₂₆ O
Epi- α –muurolol	0.05	
α-Muurolol	0.31	C ₁₅ H ₂₆ O
α-Cadinol	1.08	C ₁₅ H ₂₆ O
Cadaleno	-	C ₁₅ H ₂₈
Total identificado (%)	99.96	

De maneira geral, a oleorresina de copaíba trata-se de uma mistura de sesquiterpenos e diterpenos em diferentes concentrações. A grande variabilidade tanto na composição química, quanto na produção da oleorresina está relacionada a fatores como genética, nutrição, luminosidade e sazonalidade, mas principalmente a fatores bióticos, pois sua produção é resultado da desintoxicação do organismo vegetal, servindo como defesa contra a ação de fungos, insetos, bactérias e outros agentes lesivos (GARCIA; YAMAGUCHI, 2012; LUCCA, 2013; OLIVEIRA; LAMEIRA; ZOGHBI, 2006).

Ao estudar três espécies do gênero *Copaifera* (*C. paupera*, *C. piresii* e *C. pubiflora*) procedentes do Acre, Zoghbi, Martins-da-Silva e Trigo (2007) detectaram na espécie *C. paupera* os compostos majoritários α -Copaeno (42,5%), β -Cariofileno (14,1%) e δ -Cadineno (10,4%). Já Santos et al. (2008b) utilizaram oleorresina da espécie *C. paupera* procedente também do Acre para testar sua ação antileishmanial e na composição química foram identificados como compostos majoritários o β -bisaboleno (20,2%) e α -zingibereno (19,4%), dados diferentes dos que foram encontrados com a mesma espécie, utilizada neste estudo.

Cascon e Gilbert (2000) pesquisaram a composição química de três espécies de copaíba da Amazônia brasileira: *C. guianensis*, *C. duckei* e *C. multijuga* e verificaram diferenças na composição química de todas, inclusive entre indivíduos da mesma espécie, e detectaram a presença em maior frequência dos compostos: β -Cariofileno (60%) e α -Bergamoteno, e em menor quantidade compostos como β -Selineno, β -Bisaboleno e α -Copaeno. Demonstrando assim, que é comum a grande variabilidade entre espécies diferentes.

Em 2006, Oliveira, Lameira e Zoghbi compararam a composição química de três espécies de copaíba no município de Mojú/Pará em vários meses do ano e verificaram que a espécie *C. duckei* apresentou como componentes majoritários o β -Bisaboleno (17,6%) e β -Cariofileno (15,5%), a *C. reticulata* apresentou com maior frequência o β -Cariofileno (61,8%) e β -Bisaboleno (17,4%), já a espécie *C. martii* apresentou como componente majoritário o α -Copaeno (51,2%).

Nascimento et al. (2012) pesquisaram a diferença na composição química intra-específica de cinco indivíduos da espécie *C. langsdorffii*, e encontraram terpenóides como compostos predominantes, principalmente sesquiterpenos e diterpenos em diferentes concentrações. Como compostos majoritários: α -Copaeno, β -Cariofileno, Ggermacreno D, Spathulenol, Óxido Cariofileno, Iso-spathulenol e α -Cadinol.

Dentre todos esses compostos, a ação terapêutica da oleorresina é atribuída principalmente a sua fração volátil, composta por sesquiterpenos (cerca de 80%), porém, o sinergismo entre os compostos parece ser essencial para a efetividade dessa ação, visto que frações isoladas dos compostos apresentam menor atividade do que quando comparadas com a utilização da oleorresina bruta (LEANDRO et al., 2012; SANTOS et al., 2008b).

Dos compostos majoritários encontrados neste estudo, não há relatos sobre a ação anti-inflamatória do α -Copaeno, sendo citado apenas em estudos de comprovação antifúngica da oleorresina (DEUS; ALVES; ARRUDA, 2011). Porém, os compostos β -Cariofileno e o β -Bisaboleno apresentam importância significativa para esta atividade, pois são tidos como responsáveis pela ação terapêutica da oleorresina nos processos inflamatórios. O primeiro é

descrito na literatura como antiedematogênico, anti-inflamatório e bactericida e o segundo como tendo propriedades anti-inflamatórias e analgésicas (LUCCA, 2013; VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002).

A composição química encontrada neste estudo corrobora que há grande diversidade intra e inter espécies do gênero *Copaifera*, que podem ocorrer por variações genéticas e ambientais (OLIVEIRA; LAMEIRA; ZOGHBI, 2006). Além disso, demonstra a importância de que cada espécie seja estudada a fim de ser conhecer mais seus compostos e suas propriedades específicas, para que possa ser adequadamente utilizada, pois essa variação pode influenciar tanto na toxidez, quanto na ação biológica desse recurso natural (MARTINS-DASILVA; PEREIRA; LIMA, 2008).

5.2 TOXICIDADE

A partir dos resultados obtidos, apresentados a seguir, constatou-se que os protocolos 423 e 404 publicados pela OECD – Organization for Economic Co-Operation and Development – nos anos de 2001 e 2002 respectivamente, apresentaram boa reprodutibilidade e utilizaram uma quantidade mínima de animais.

5.2.1 Teste de toxicidade aguda – oral

Neste estudo, após 14 dias da administração, a dose de 2000 mg/kg de oleorresina de *C. paupera* não gerou mortalidade e/ou morbidade nos animais do grupo teste. Os animais também não apresentaram alterações macroscópicas nos rins, estômago ou fígado quando comparados ao grupo controle e a variação de peso dos animais não apresentou diferença estatística significativa entre os grupos tratados e controle (Tabela 2, figura 13). Após a finalização do primeiro teste, o mesmo foi repetido com mais 3 animais, como estipula o protocolo, e também não foi constatado sinais de morbidade/mortalidade. Dessa forma, a oleorresina de *C. paupera* pode ser considerada através do protocolo 423 da OECD, como uma substância da categoria 5, ou seja, de toxicidade letal aguda > 2000 mg/kg.

Tabela 2 – Aumento de peso (g) (média \pm erro padrão) dos animais no 7º e no 14º dia comparados com o dia da administração

Grupos	Teste 1		Teste de confirmação	
	7º dia	14º dia	7º dia	14º dia
Controle	16,66 \pm 4,50	13 \pm 5,56	18,33 \pm 5,03	33,66 \pm 1,52
<i>C. Paupera</i> (2000 mg/kg)	11,66 \pm 1,52	11 \pm 2,64	13 \pm 2	30 \pm 1,73

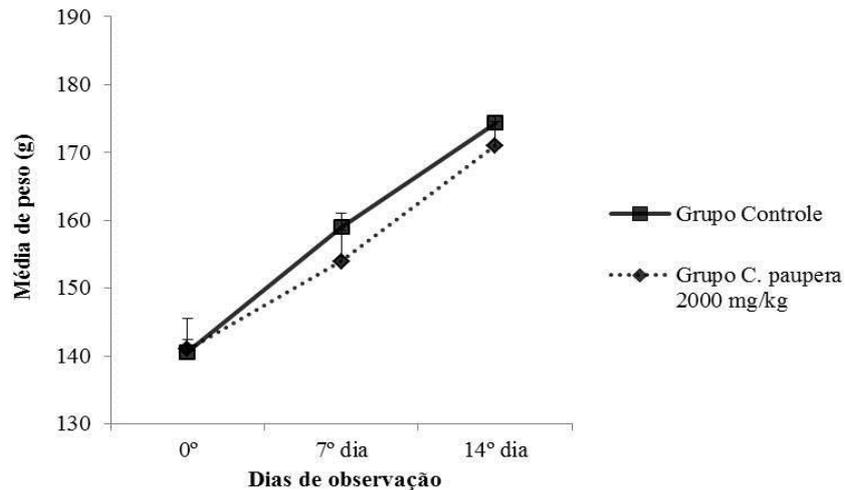


Figura 13 – Peso dos animais nos diferentes dias de observação – Teste de confirmação. Os resultados estão expressos em médias \pm erro padrão, n= 3/grupo. ANOVA, seguido de teste Tukey.

Apesar de não serem encontrados dados com esse teste utilizando a espécie *C. paupera*, estudos com outras espécies de *Copaifera* observaram letalidade apenas com o uso de altas doses da oleorresina. Rio (2001) testou a toxicidade aguda de frações isoladas sesquiterpênicas e diterpênicas de oleorresina de *C. reticulata* e de óleo de copaíba comercial. A DL₅₀ das frações sesquiterpênicas foi de 9,14 e 20 mL/kg respectivamente, enquanto a DL₅₀ das frações diterpênicas foi de 2,85 e 1,29 mL/kg para as amostras comercial e *C. reticulata*. Sugerindo que a toxicidade da oleorresina provavelmente está relacionada com sua fração diterpênica. Sachetti et al. (2009), testaram a dose máxima indicada da administração por via oral da oleorresina de *C. reticulata* (2000 mg/kg), e ao final, foi classificada como na categoria 5, visto que não gerou morbidade e/mortalidade nos animais testados.

Uma dose inferior (500 mg/kg) foi testada por Gomes et al. (2010) utilizando a espécie *C. multijuga* e os animais utilizados também não apresentaram nenhuma alteração durante 5 dias de observação após a administração. Ao testar o tratamento com três doses de *C. reticulata* (500, 1000 e 1250 mg/kg) em ratas gestantes, Sachetti et al. (2011) não observaram sinais de teratogenicidade em nenhum dos grupos, porém, houve ligeiro atraso no crescimento

pré-natal dos fetos e aumento do número de variações esqueléticas de forma moderada nos grupos de maior dose (1000 e 1250 mg/kg). Ao mesmo tempo, o grupo 500 mg/kg não demonstrou nenhum sinal de toxicidade, apresentando parâmetros semelhantes ao grupo controle, que recebeu apenas o veículo de diluição. Sugerindo assim, que a dose de 500 mg/kg não foi tóxica, nem embriotóxica.

Como parâmetros bioquímicos, foi feita a dosagem das transaminases (alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST)) e da gama-glutamil transferase (Gama-GT) e os resultados analisados estão expressos na Tabela 3.

Tabela 3 – Parâmetros bioquímicos analisados. Os resultados estão expressos em médias \pm erro padrão, n= 6/grupo. ANOVA, seguido de teste Tukey.

Parâmetros	Controle	<i>C. paupera</i> (2000 mg/kg)	Faixa de referência ¹
Alanina aminotransferase – U/L	76 \pm 8,27	81.5 \pm 4,44	38 - 82
Aspartato aminotransferase – U/L	147,33 \pm 15,43	170.16 \pm 28,52	61 - 210
Gama-glutamil transferase – U/L	2,66 \pm 0,49	2 \pm 0,57	1 - 6

¹Lima et al. (2014)

Através da avaliação das enzimas hepáticas (Tabela 3) constatou-se que não houve alteração significativa entre os valores do grupo controle e do grupo teste, assim como, não houve diferença quando comparada com a faixa de referência para a espécie, podendo-se sugerir então, que a oleorresina de *C. paupera* não possui efeito hepatotóxico agudo na dose testada.

Além do exame bioquímico, realizou-se a avaliação do hemograma, e através da análise dos parâmetros hematológicos obteve-se os resultados expressos na tabela 4.

Tabela 4 – Parâmetros hematológicos analisados. Os resultados estão expressos em médias \pm erro padrão, n= 5/grupo. ANOVA, seguido de teste Tukey, p**<0,01.

Parâmetros	Grupo Controle	Grupo <i>C. paupera</i> (2000 mg/kg)	Faixa de referência ¹
WBC x 10 ³ /uL	10.04 \pm 0.79	6.88 \pm 0.47**	4,7 – 12,98
RBC x 10 ⁶ /uL	7.4 \pm 0.13	7.73 \pm 0.17	7,3 – 8,64
HGB g/dL	13.62 \pm 0.23	13.8 \pm 0.37	13,2 – 15,1
HCT %	40.92 \pm 0.71	42.02 \pm 1.30	39,1 – 48,5
VCM fL	54.98 \pm 1.26	54.34 \pm 0.98	49,1 – 62,5
CMH pg	18.22 \pm 0.38	17.78 \pm 0.21	16,6 – 18,9
CHCM g/dL	33.24 \pm 0.22	32.78 \pm 0.25	29,9 – 34,9
PLT x 10 ³ /uL	924.8 \pm 47.80	870.8 \pm 37.43	757 – 1476
VPM fL	6.14 \pm 0.13	5.96 \pm 0.12	6,8 – 8,0

¹Melo et al. (2012)

Através da análise hematológica foi possível observar que os resultados tanto do grupo controle, quanto do grupo teste ficaram dentro dos parâmetros de normalidade estipulados por Melo et al. (2012). Houve diferença estatística na quantidade de leucócitos entre os grupos controle e teste, sem indicativo de importância clínica, já que os valores estão dentro dos limites da faixa de referência e não houve alteração simultânea de outros parâmetros.

Apesar de a oleorresina da espécie *C. paupera* não ter estudos sobre sua ação aguda em enzimas hepáticas e células sanguíneas, alguns estudos sobre a toxicidade crônica e subcrônica do uso da oleorresina de diferentes espécies foram realizados.

Após a administração por 30 dias consecutivos de *C. reticulata*, Rio (2001) indicou toxicidade subcrônica da espécie na dose de 2,02 mL/kg, visto que gerou alteração de peso do fígado, rins e baço, além de alterações na enzima ALT e creatinina, sugerindo sinais de toxicidade hepática e renal. Ao serem realizados os mesmos testes utilizando apenas a fração volátil, não foi evidenciado sinais de toxicidade, atribuindo assim a toxicidade da oleorresina à fração resinosa.

Noguchi et al. (2002) administraram por 5 dias consecutivos oleorresina de *Copaifera sp.* na dose de 0,63 mL/kg em ratos, com o intuito de verificar os níveis séricos de aminotransferases, bilirrubinas e gama-glutamil transferase. Ao final, verificaram que o uso da oleorresina gerou uma diminuição nos níveis de ALT e AST, assim como da Gama GT. E elevou os níveis de bilirrubina total e direta. Sugerindo assim possível congestão hepática ou dano biliar.

Júnior et al. (2005) testaram o efeito da oleorresina de *C. officinalis* sobre as aminotransferases após tratamento de 7 dias em ratos submetidos a isquemia e reperfusão hepática, e constataram que não houve alteração significativa dos parâmetros quando utilizada no pré-operatório, comparados com o grupo padrão, indicando assim que não houve dano hepatotóxico significativo. Porém, gerou discreto aumento da ALT no grupo em que foi associada a isquemia-reperfusão, além disso, inibiu o efeito protetor do processo de pré-condicionamento isquêmico, quando comparada ao controle. Sugerindo assim, algum sinal de hepatotoxicidade.

Lima (2014) testou a toxicidade subcrônica da oleorresina de *C. duckei*, e mesmo após 22 dias de tratamento, a dose de 320 mg/kg não gerou alteração hematológica, nem das enzimas ALT e AST em ratos machos e fêmeas, porém, gerou elevação dos parâmetros colesterol total e HDL, assim como hipoglicemia quando comparados ao grupo controle, permanecendo ainda dentro da faixa de referência para a espécie. Já em ratas gestantes, a dose

de 1874 mg/kg gerou toxicidade aguda pois desencadeou os sinais clínicos de estresse, sialorréia, piloereção e hemorragia nasal, além de aborto espontâneo.

A partir desses dados, percebe-se a importância de testes de avaliação da toxicidade de cada espécie, antes da realização dos testes farmacológicos, para a utilização adequada e segura da oleorresina, pois pode haver variação dos resultados entre as diferentes espécies em decorrência de sua diversidade química.

Neste estudo, os resultados bioquímicos e hematológicos associados a ausência de morbidade/mortalidade nos animais durante a observação indicam que dentro dos limites estabelecidos na pesquisa, utilizando-se animais, a oleorresina pode ser utilizada com segurança, pois não gerou sinais característicos de toxicidade aguda (única aplicação) mesmo utilizando-se a dose máxima recomendada para esse tipo de teste (2000 mg/kg). Percebeu-se também que para gerar sinais de toxicidade, a oleorresina de outras espécies do gênero *Copaifera* precisa ser administrada em altas doses e por vários dias consecutivos.

5.2.2 Teste irritação/corrosão dérmica

Durante a observação feita após 24 horas da retirada dos pelos do dorso dos animais, não foram detectados sinais de irritação na pele de nenhum deles em decorrência da tricotomia, não sendo necessário dessa forma realizar substituições.

5.2.2.1 Teste de única aplicação

No teste de única aplicação da oleorresina na forma pura, em gel a 10% e fonoforese (gel 10% + US) no dorso dos animais, os mesmos foram observados diariamente, e após 72 horas da aplicação, não foi observado formação de eritema/escaras, nem formação de edema, classificando-se esses sinais como grau 0 na escala (Tabela 5 e Figura 14). Após esse resultado, o teste de confirmação foi repetido com mais 3 animais, que também apresentaram grau 0 durante a observação dos sinais eritema/escaras e edema. Também não foi observado alterações na alimentação e comportamento dos animais.

Tabela 5 – Classificação do edema e eritema/escaras no dorso dos animais após diferentes modalidades de administração da óleorresina de *C. paupera* – única aplicação

Única aplicação						
Animais	<i>C. paupera</i> pura		Gel de <i>C. paupera</i> 10%		Fonoforese	
	Eritema/ Escaras	Edema	Eritema/ Escaras	Edema	Eritema/ Escaras	Edema
Teste 1						
1	Grau 0	Grau 0	Grau 0	Grau 0	Grau 0	Grau 0
Teste 2						
1	Grau 0	Grau 0	Grau 0	Grau 0	Grau 0	Grau 0
2	Grau 0	Grau 0	Grau 0	Grau 0	Grau 0	Grau 0
3	Grau 0	Grau 0	Grau 0	Grau 0	Grau 0	Grau 0

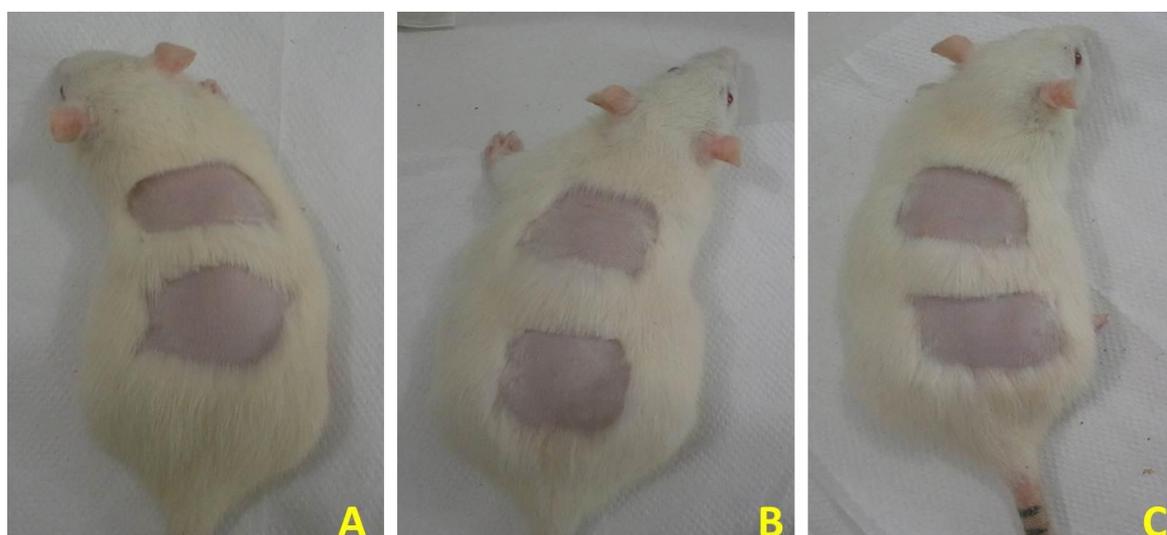


Figura 14 – Dorso dos animais um dia após única aplicação. Parte superior utilizada como controle, na parte inferior foram aplicadas as substâncias testadas. (A) Óleorresina de *C. paupera* pura; (B) Gel de *C. paupera* 10% e (C) Fonoforese (Gel 10% + US).

Foto: Helen Lima

Dessa forma, a partir dos resultados e segundo o protocolo 404/2002 da OECD, tanto a oleorresina testada na forma pura, quanto administrada na forma de gel a 10% e através da fonoforese foram classificadas como não irritantes/não corrosivas após uma única aplicação.

5.2.2.2 Teste de aplicação de doses repetidas diariamente

Após a aplicação das substâncias testadas por 6 dias, foi possível observar que a aplicação do gel de copaíba 10% (Figura 15B) e da fonoforese (Figura 15C) não produziram

eritema ou edema, sendo considerados como grau 0 (Tabela 6). Resultado semelhante foi obtido por Estevão et al. (2009) que ao utilizarem a oleorresina da espécie *C. langsdorffii* na forma de pomada a 10% também não constatarem sinais de irritação local ou alergias em decorrência de sua utilização durante 8 dias consecutivos. Lima et al. (2011) utilizaram creme vaginal a 2,5% em ratas gestantes durante todo o período gestacional e também não observaram sinais de irritação ou toxicidade. Lima (2014) utilizou por 22 dias creme vaginal a base de *C. duckei* (28 mg/kg) e também não relatou presença de irritação na mucosa.

Já o uso continuado da oleorresina em sua forma *in natura* gerou um grau 2 (Tabela 6). A partir do quinto dia foi possível observar um processo de hiperemia bem delimitado e 24 horas após a sexta aplicação observou-se a formação de pequenas lesões de continuidade da pele, em alguns pontos onde a oleorresina provavelmente deve ter ficado mais concentrada (Figura 15A). A substância foi considerada irritante, porém, não corrosiva, pois as lesões produzidas apresentaram caráter reversível após a suspensão de sua aplicação.

Tabela 6 – Classificação do edema e eritema/escaras no dorso dos animais após diferentes modalidades de administração da oleorresina de *C. paupera* – 6 aplicações

Animais	Aplicação diária					
	<i>C. paupera pura</i>		Gel de <i>C. paupera</i> 10%		Fonoforese	
	Eritema/ Escaras	Edema	Eritema/ Escaras	Edema	Eritema/ Escaras	Edema
Teste 1						
1	Grau 2	Grau 0	Grau 0	Grau 0	Grau 0	Grau 0
Teste 2						
1	Grau 2	Grau 0	Grau 0	Grau 0	Grau 0	Grau 0
2	Grau 2	Grau 0	Grau 0	Grau 0	Grau 0	Grau 0
3	Grau 2	Grau 0	Grau 0	Grau 0	Grau 0	Grau 0

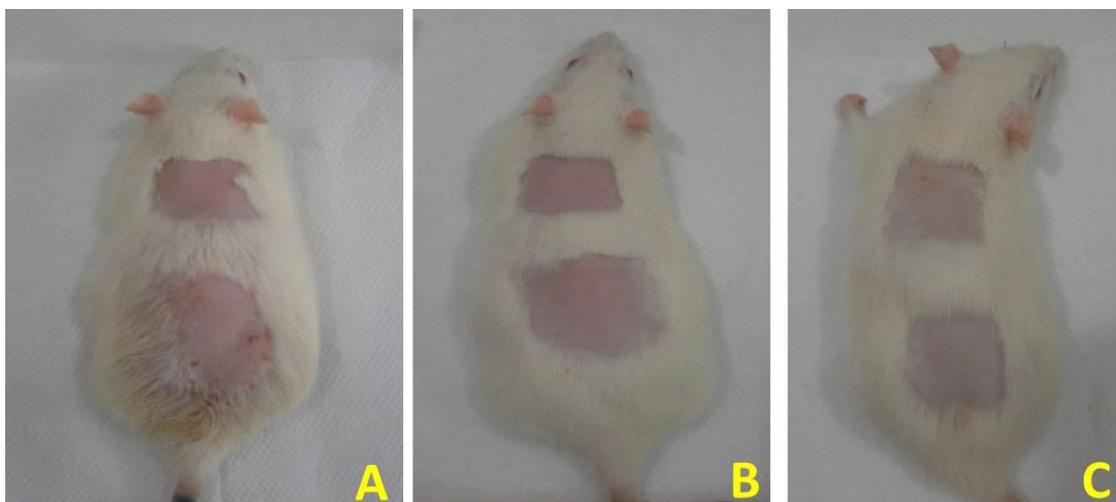


Figura 15 – Dorso dos animais após 6 dias de aplicação. Parte superior utilizada como controle, na parte inferior foram aplicadas as substâncias testadas. (A) Óleorresina de *C. paupera* pura, dorso do animal apresentando sinais de irritação; (B) Gel de *C. paupera* 10% e (C) Fonoforese (Gel 10% + US)

Foto: Helen Lima

Carvalho et al. (2005) administraram a oleorresina *in natura* da espécie *C. duckei* por 7 dias em ratos e nos seus resultados não perceberam irritação na pele, nem sinais de processo inflamatório local em decorrência do uso do óleo. Brito et al. (2006) aplicaram por 14 dias a oleorresina de *C. officinalis* pura sobre o membro posterior de ratos e também não observaram presença de irritação ou lesão na pele dos animais. Lima (2014) administrou a oleorresina da espécie *C. duckei* também na sua forma *in natura* (40 mg/kg) por 22 dias através da via vaginal e não relatou nenhum sinal de irritação na mucosa ao final do estudo.

Já Vieira et al. (2008) ao promoverem uma incisão cirúrgica no dorso de camundongos e tratar por via tópica com oleorresina pura de *C. langsdorffii* observaram que após 5 dias, o dorso dos animais apresentava edema e hiperemia maior que o grupo controle, que estava sendo tratado apenas com óleo mineral estéril, sugerindo assim, que houve irritação e aumento no processo inflamatório local em decorrência do uso da oleorresina.

Essa diferença entre os resultados obtidos pelo uso da oleorresina da *in natura* e na forma de gel 10% pode ter sido gerada pela característica oleosa da substância, que dificulta sua absorção e distribuição para tecidos mais profundos, associado ao fato de estar muito concentrada quando administrada na sua forma pura. Além disso, a oleorresina possui em sua composição uma fração volátil e uma fração resinosa, sendo esta última, considerada irritante para a pele e mucosas (GIESBRECHT, 2011; RIO, 2001).

A caracterização química da oleorresina utilizada nesse estudo foi feita somente da fração volátil (óleo essencial), composta pelos sesquiterpenos, porém, sabe-se que de maneira geral, a fração diterpênicas da oleorresina pura pode variar aproximadamente de 10% a 30%, dependendo da espécie e condições ambientais (RAMOS, 2006). Portanto, um índice maior na quantidade de diterpenos em algumas espécies pode gerar um processo irritativo mais significativo (RIO, 2001), explicando assim, porque algumas espécies geram irritação e outras não, mesmo quando administradas *in natura* por mais de 5 dias consecutivos.

A partir disso, pode-se constatar que a oleorresina de *C. paupera* procedente da Floresta Nacional do Tapajós, quando utilizada *in natura*, por mais de 5 dias é considerada irritante segundo o protocolo 404/2002 da OECD e sugere-se que seu uso dentro desses parâmetros deve ser evitado.

5.3 ANÁLISE DO TECIDO MUSCULAR APÓS TRAUMA INDUZIDO

Neste estudo, foi testada a ação da oleorresina de *C. paupera* sobre a fase inflamatória aguda da lesão muscular. Durante a realização do teste, após o processo de lesão, os animais

foram observados diariamente e nenhum apresentou lesão de continuidade na pele ou sinais macroscópicos de irritação que sugerissem infecção, ou que fossem gerados pelo veículo utilizado na formulação do gel de tratamento.

Dentre as formas de tratamento que poderiam ser utilizadas, foi observado no teste de irritação dérmica que a oleorresina gerou irritação na pele após o quinto dia, dessa forma, ela não foi usada como tratamento em sua forma *in natura*.

Como avaliação do teste, inicialmente foi feita a análise do grupo controle negativo, formado por animais que não sofreram nenhum tipo de lesão, assim como, nenhum tipo de tratamento, com o intuito de avaliar o tecido muscular normal (Figura 16).

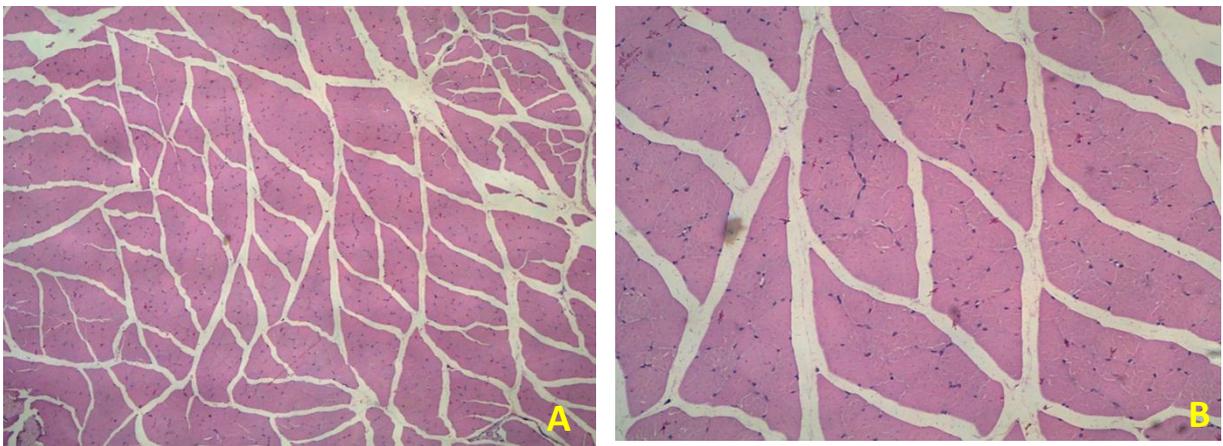


Figura 16 – Tecido muscular que não foi submetido ao trauma, nem ao tratamento. (A) Aumento de 4x; (B) Aumento de 10x.

Foto: Helen Lima

O que se pode observar através da análise histológica foram células agrupadas, formando feixes musculares, assim como, a presença de múltiplos núcleos na periferia das células, dados esses que corroboram os parâmetros de normalidade do tecido muscular (ALFREDO, 2008).

5.3.1 Análise do tecido muscular 2 dias após a lesão

A graduação da análise qualitativa em graus (0 a 3) está expressa na Figura 17. Através da análise do tecido muscular foi possível observar uma ação mais eficiente nos grupos ultrassom e fonoforese no segundo dia, visto que geraram redução significativa dos parâmetros edema, necrose e infiltrado inflamatório quando comparados ao grupo controle, porém, não foi possível observar diferença estatística entre esses dois grupos de tratamento em nenhum dos parâmetros avaliados. Já o gel de *C. paupera* a 10% gerou redução do edema.

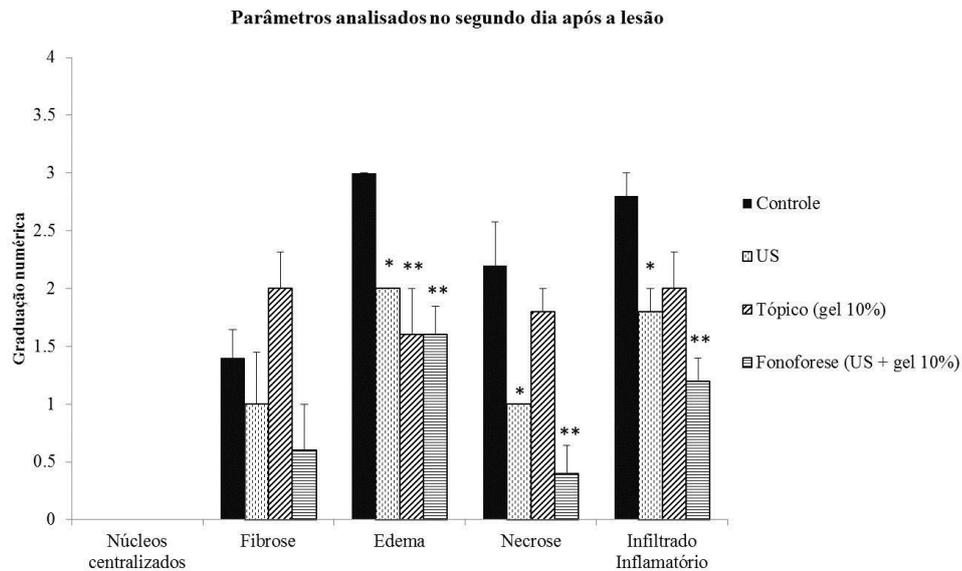


Figura 17 – Análise quantitativa dos parâmetros analisados no segundo dia após o trauma. Os resultados estão expressos em médias \pm erro padrão, $n = 5/\text{grupo}$. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, quando comparados com o grupo controle, ANOVA, seguido de teste Tukey.

Através da análise qualitativa foi possível observar no tecido muscular do grupo controle uma extensa área de edema, onde é possível verificar espaço entre as células que deveriam estar agrupadas, infiltrado inflamatório, assim como áreas de necrose, em que a célula muscular perdeu sua estrutura e função. Também é possível observar formação de hematomas no tecido (Figura 18).

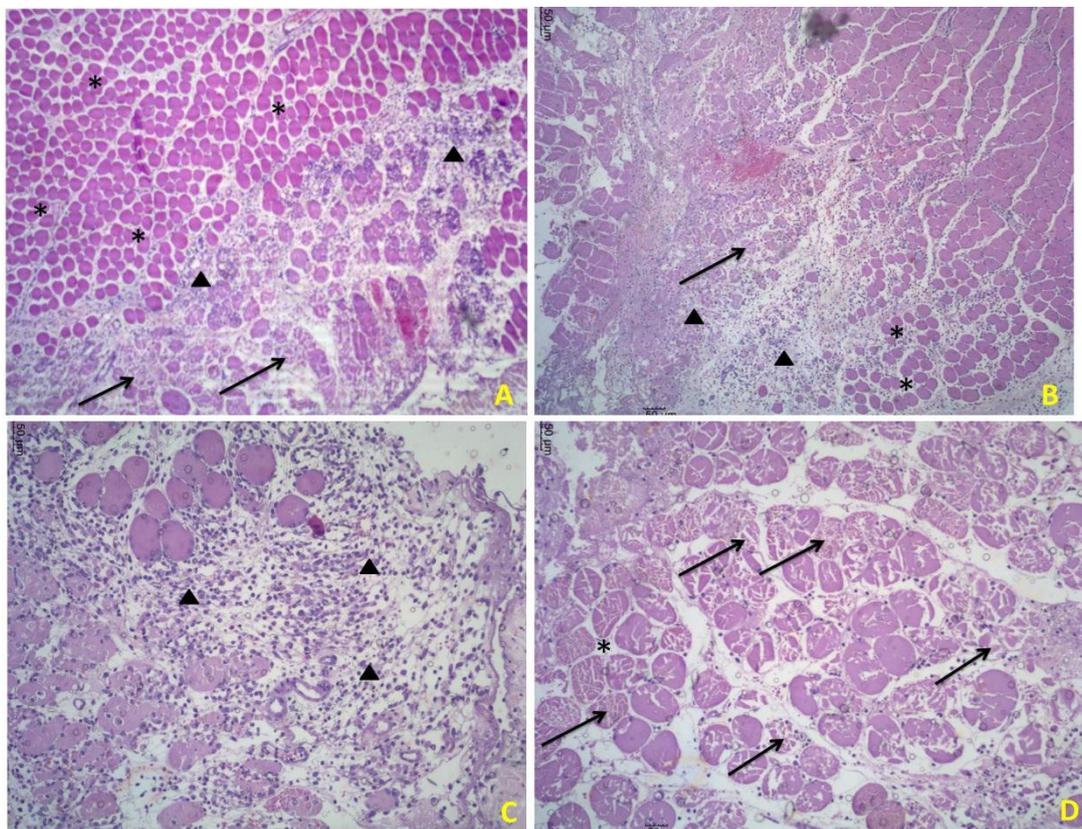


Figura 18: Grupo controle - tecido muscular no segundo dia após o trauma. (A) e (B) - aumento de 4x, (C) e (D) - aumento de 10x. Triângulos indicam áreas de infiltrado inflamatório; Setas longas áreas de necrose; (*) áreas de edema.

O grupo tratado com o US apresentou, como é possível observar na Figura 19, menor extensão das áreas de edema, assim como menor quantidade de infiltrado inflamatório. Além disso, observou-se menos áreas com necrose celular.

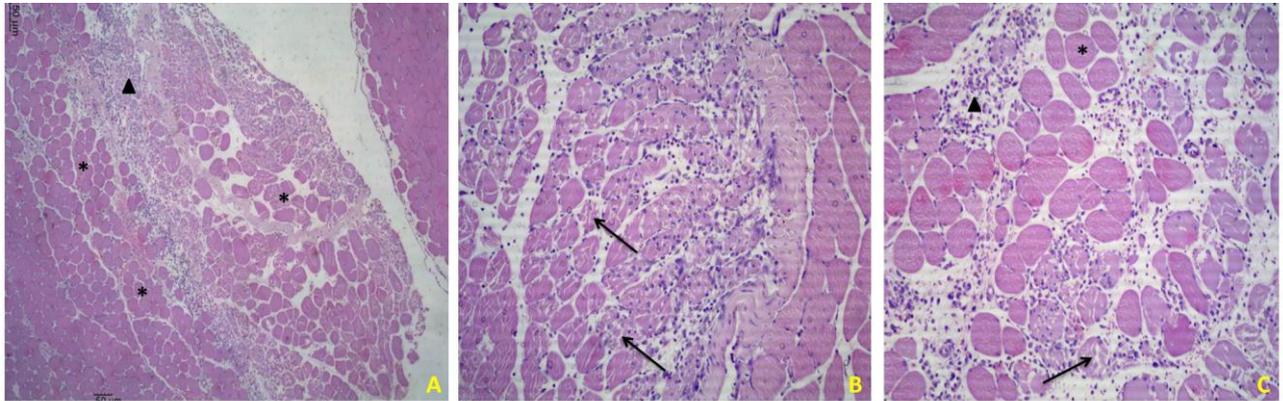


Figura 19: Grupo Ultrassom - tecido muscular no segundo dia após o trauma. (A) - aumento de 4x, (B) e (C) – aumento de 10x. Triângulos indicam área de infiltrado inflamatório; Setas longas necrose; (*) áreas de edema.

Na Figura 20, observa-se o tecido muscular após o tratamento com o gel de *C. paupera* 10%, tendo sido realizada única aplicação da substância. Foi possível verificar que houve apenas a redução do edema tecidual quando comparado ao grupo controle.

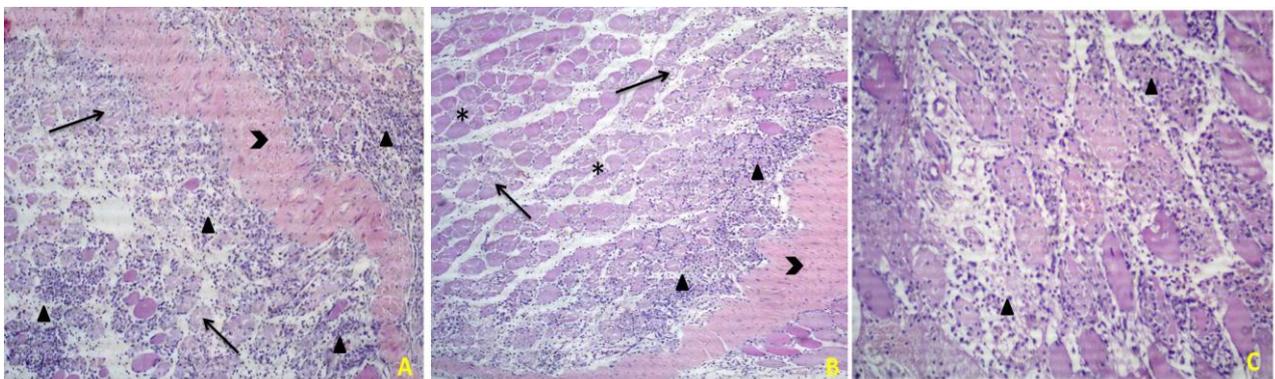


Figura 20: Grupo gel *C. paupera* 10% - tecido muscular no segundo dia após o trauma. (A) e (B) - aumento de 4x, (C) – aumento de 10x. Triângulos indicam infiltrado inflamatório; Setas longas áreas de necrose; (*) áreas de edema; Cabeça de seta área de fibrose.

Já no grupo fonoforese (Figura 21), assim como no grupo US, houve redução do edema, infiltrado inflamatório e necrose, porém, não houve diferença estatística entre essas duas formas de tratamento. Dessa forma, não é possível afirmar se a ação foi decorrente do aumento da penetração do gel de copaíba ou se ocorreu apenas a ação do US.

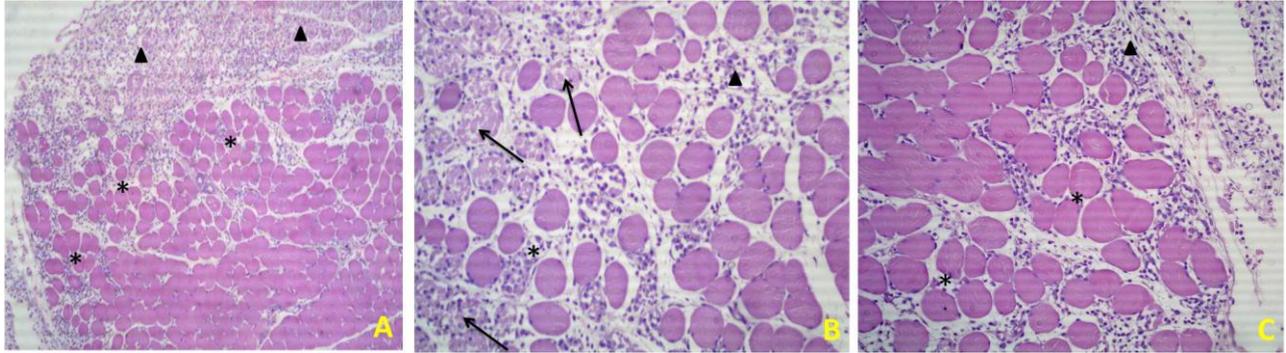


Figura 21: Grupo Fonoforese - tecido muscular no segundo dia após o trauma. (A) - aumento de 4x, (B) e (C) – aumento de 10x. Triângulos indicam infiltrado inflamatório, setas longas áreas de necrose, (*) áreas de edema.

5.3.2 Análise do tecido muscular 7 dias após a lesão

A graduação dos parâmetros qualitativos avaliados no sétimo dia após a lesão estão expressos na figura 22. Foi possível observar que o grupo tratado com o US terapêutico apresentou redução da fibrose, edema e infiltrado inflamatório quando comparado ao grupo controle. O grupo tratado com o gel de copaíba 10% apresentou melhora no edema, assim como, redução do infiltrado inflamatório. Já o grupo fonoforese apresentou melhora do tecido apenas no parâmetro fibrose.

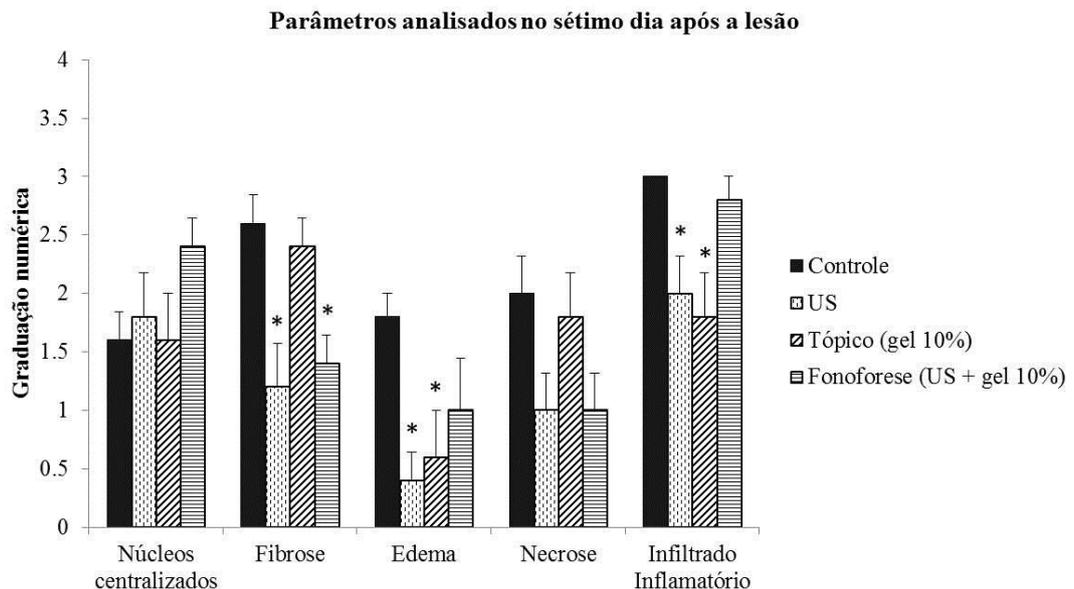


Figura 22 – Análise quantitativa dos parâmetros analisados no sétimo dia após o trauma. Os resultados estão expressos em médias \pm erro padrão, $n= 5$ /grupo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, quando comparados com o grupo controle, ANOVA, seguido de teste Tukey.

No tecido muscular do grupo controle (Figura 23), verificou-se que mesmo no sétimo dia, as áreas de edema e infiltrado inflamatório ainda permanecem extensas. Além disso, há formação de grande quantidade de tecido fibrótico, sugerindo assim redução da capacidade funcional do músculo.

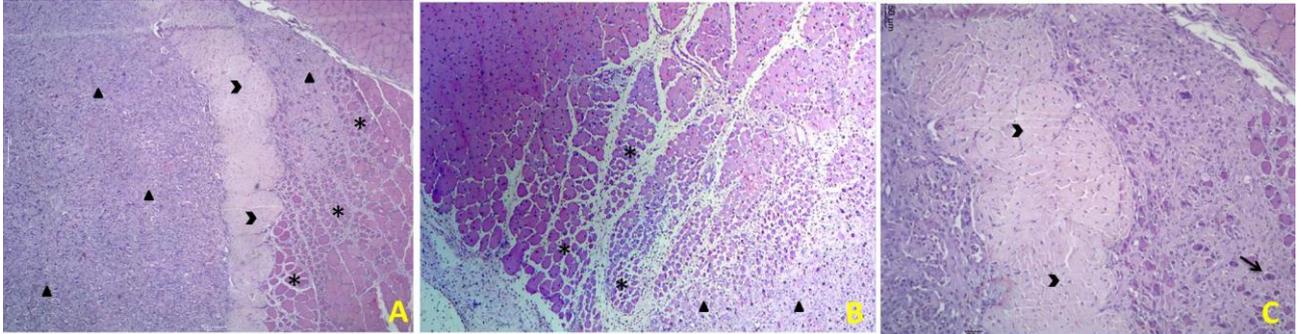


Figura 23: Grupo Controle - tecido muscular no sétimo dia após o trauma. (A) e (B) - aumento de 4x. (C) – aumento de 10x. Triângulo indica infiltrado inflamatório; Cabeça de seta: fibrose; (*) Edema; Setas curtas: células com núcleo centralizado.

No grupo US (figura 24) foi possível observar áreas menores de fibrose e edema, assim como, persistência, em menor quantidade, de infiltrado inflamatório. O tecido apresenta-se de forma mais organizada, indicando aceleração da recuperação tecidual quando comparado ao grupo não tratado.

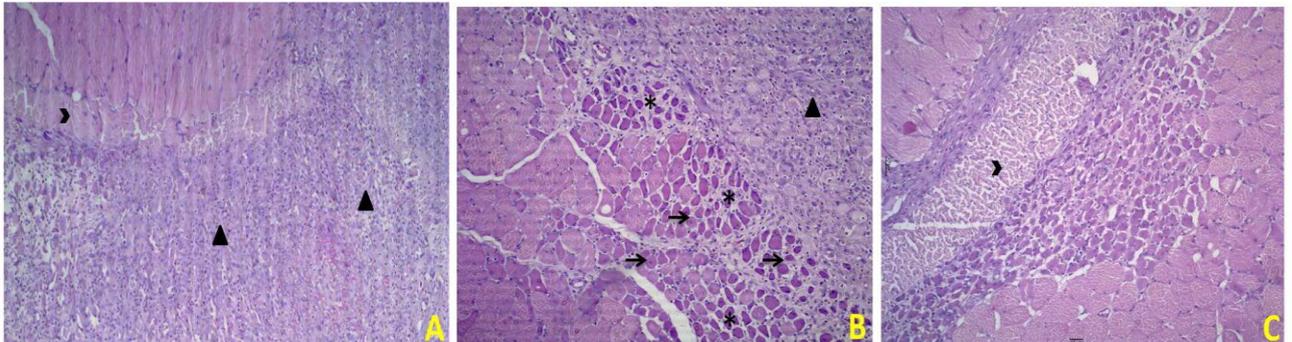


Figura 24: Grupo Ultrassom - tecido muscular no sétimo dia após o trauma. (A) - aumento de 4x. (B) e (C) – aumento de 10x. Triângulo indica infiltrado inflamatório; Cabeça de seta: fibrose, (*) edema; Setas curtas: células com núcleo centralizado.

No grupo tratado apenas com o gel de copaíba a 10%, pode-se verificar que as áreas de edema e de infiltrado inflamatório foram menores (Figura 25).

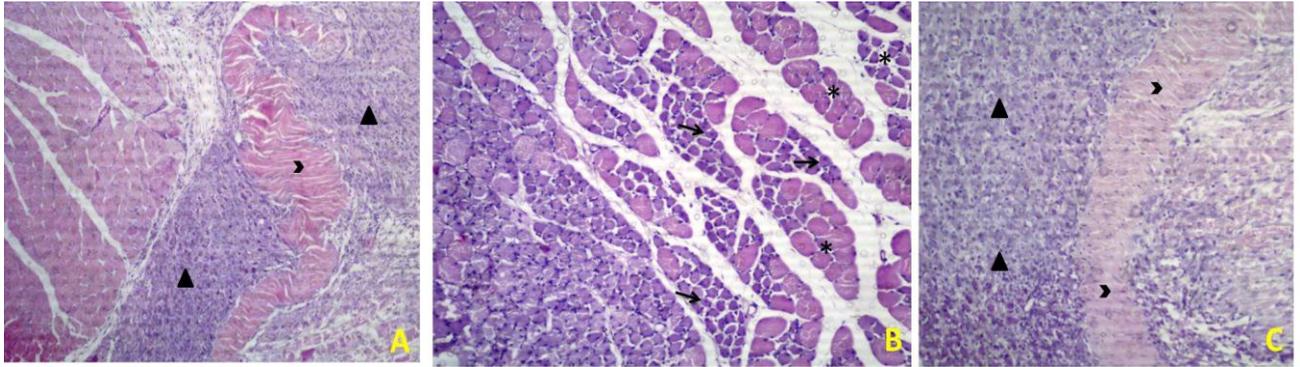


Figura 25: Grupo gel de *C. paupera* 10% - tecido muscular no sétimo dia após o trauma. (A) - aumento de 4x. (B) e (C) – aumento de 10x. Triângulos indicam infiltrado inflamatório; Cabeça de seta: fibrose; (*) edema; Setas curtas: células com núcleo centralizado.

Assim como no grupo US, o grupo fonoforese (Figura 26) apresentou menor área de fibrose, porém, nos demais parâmetros, não houve diferença quando comparado ao grupo controle.

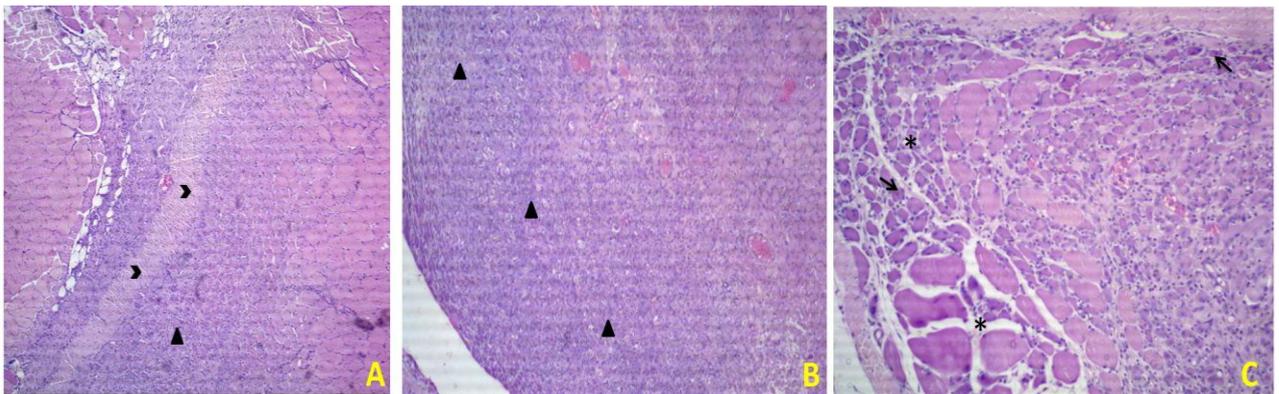


Figura 26: Grupo Fonoforese - tecido muscular no sétimo dia após o trauma. (A) e (B) - aumento de 4x. (C) – aumento de 10x. Triângulos indicam infiltrado inflamatório; Cabeça de seta – fibrose; (*) Edema; Setas curtas: células com núcleo centralizado.

Os dados encontrados no grupo controle corroboram a literatura, já que na fase inicial da inflamação tecidual comumente são evidenciados sinais de intensa resposta celular, edema em decorrência do extravasamento de líquido dos vasos, e necrose tecidual, caracterizando assim a fase de degeneração do processo. Além disso, a associação de grandes áreas de necrose, com a baixa eficiência da fagocitose nos primeiros dias pós lesão, tem como consequência, a maior formação de tecido fibrótico, assim como, organização menos consistente do tecido (BASSOLI, 2001; JARVINEN et al., 2007; PIOVESAN, 2010; SILVA; MACEDO, 2011).

O grupo US apresentou melhora dos sinais agudos do processo inflamatório tanto no segundo, quanto no sétimo dia de avaliação. Na literatura, o US terapêutico é recomendado

como tratamento físico alternativo, pois atua otimizando o processo inflamatório, principalmente gerado em lesões musculares. Os resultados obtidos neste estudo podem ser justificados pelos seus efeitos biológicos, que podem aparecer ainda nas primeiras 24 horas após o início do tratamento (BERTOLINE et al., 2012; FARCIC et al., 2012).

Segundo Maia-Filho et al. (2011) ao penetrarem nos tecidos, as ondas ultrassônicas provocam vibração celular, produzindo o aumento da permeabilidade da membrana, do movimento das partículas e taxa de fagocitose, acelerando assim, a velocidade de difusão iônica e conseqüentemente aceleração do curso normal da inflamação. Como consequência disso, no segundo dia após a lesão, o tecido já apresentava menos edema e infiltrado inflamatório. Como o edema gera compressão e necrose celular, sua redução tende a gerar menor quantidade de necrose (ROCHA; CAVALLIERI, 2007). Essa menor produção de necrose no grupo US, associada à aceleração de sua remoção podem ter contribuído para a menor formação de tecido fibrótico e conseqüentemente um processo de recuperação mais eficiente e organizado no sétimo dia.

Os dados encontrados foram semelhantes aos estudos de Matheus et al. (2008) e Piedade et al. (2008) que ao fazerem uso do US terapêutico pulsado em lesão muscular induzida, também obtiveram como resposta aumento das propriedades mecânicas dos músculos e recuperação muscular mais eficiente quando comparadas aos grupos sem tratamento.

O grupo tratado apenas com o gel de *C. paupera* a 10% apresentou já no segundo dia após a lesão, redução do edema tecidual. Mostrando-se mais eficiente quando aplicado diariamente, pois no sétimo dia, o tecido tratado apresentava-se com menos edema e menor infiltrado inflamatório. A ação anti-inflamatória dá oleorresina de outras espécies de copaíba já vem sendo relatada na literatura, e está relacionada principalmente aos compostos β -Cariofileno e β -Bisaboleno, tido o primeiro como sendo antiedematogênico e anti-inflamatórios e o segundo como anti-inflamatório e analgésico (LUCCA, 2013; VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002).

A partir dos dados obtidos, pode-se sugerir que o gel utilizado neste estudo apresentou potencial anti-inflamatório, contribuindo assim, indiretamente para a melhora na recuperação do tecido, pois um processo inflamatório prologando e exacerbado pode gerar danos secundários, com lesão e morte celular. Neto et al. (2005) analisaram a recuperação tecidual de ratos após tratamento com oleorresina de *C. reticulata* por 15 dias e constataram que a oleorresina não teve ação sobre fatores de crescimento que estimulem a proliferação celular,

porém, sugeriu que os efeitos benéficos encontrados no tecido foram decorrentes de sua ação anti-inflamatória.

Em relação aos grupos tratados pela técnica de fonoforese, sabe-se que o uso do US como facilitador para a entrega de substância por via transdérmica é uma prática com eficiência cientificamente comprovada, porém, os resultados ainda apresentam alta variação, pois dependem tanto dos parâmetros adequados do aparelho, como das propriedades físico-químicas (lipofilicidade, peso molecular) da substância aplicada (ALFREDO et al., 2008; MAIA-FILHO et al., 2011; RICOLDY et al., 2010; SOUZA et al., 2013).

Neste estudo, a fonoforese gerou melhora do edema, necrose e infiltrado inflamatório no segundo dia após o trauma, porém, no sétimo dia de tratamento, houve apenas melhora na formação de fibrose quando comparada ao grupo controle. Resultado semelhante foi obtido por Alfredo et al. (2009) ao utilizarem a associação do US com gel de *Arnica montana*. Os autores constataram que após 3 dias de tratamento, o tecido muscular dos animais submetidos a lesão e tratados com a fonoforese apresentou resultado inferior aos grupos tratados isoladamente com US ou com o gel arnica. Estes, quando utilizados de forma separada apresentaram melhora da organização do tecido e redução do processo inflamatório respectivamente.

Esta ineficácia da fonoforese no sétimo dia após o trauma pode ter ocorrido pela interação dos efeitos pró-inflamatórios do US, com a ação farmacológica anti-inflamatória do gel de *C. paupera* 10%. Segundo Souza et al. (2013) a influência da permeação do fármaco está relacionada ao número de exposições ao US, havendo então, no sétimo dia maior interação entre os tratamentos, o que pode ter gerado inibição de ambos efeitos terapêuticos, demonstrando assim, que as propriedades físico-químicas da substância podem interferir na eficiência da técnica.

A ação biológica do US é tida como pró-inflamatória pois gera aumento da permeabilidade celular e difusão iônica, assim como indução da desgranulação dos mastócitos, liberando assim, mediadores químicos inflamatórios (ALFREDO et al., 2008; MAIA-FILHO, et al., 2011; SILVEIRA, 2010). Já a oleorresina de *C. paupera* ainda não possui um mecanismo de ação totalmente esclarecido, porém, há relatos que sua ação esteja relacionada com a inibição de receptores de histamina e serotonina, mediadores químicos importantes na fase imediata da inflamação, reduzindo assim esse processo (GOMES et al., 2010).

Já a formação de menor quantidade de tecido fibroso no sétimo dia pode ter ocorrido pela eficiência do uso do US nos primeiros dias de tratamento, visto que produziu menor quantidade de tecido necrótico.

Brito et al 2006, testaram o uso tópico, através da técnica fonoforese, da oleorresina de *C. officinalis in natura* sobre o tecido muscular após miosite induzida, e constataram que no segundo, quinto, sétimo e décimo quarto dia de tratamento, não houve diferença histológica significativa entre os grupos tratados e o controle. Indicando assim, que a oleorresina não gerou aceleração na recuperação do tecido inflamado. Esses dados diferem dos encontrados neste estudo ao avaliar o segundo dia após a lesão, porém, é importante ressaltar que os parâmetros do aparelho utilizado foram diferentes, pois o autor usou a modalidade de aplicação contínua, sendo que neste estudo, foi utilizada a modalidade pulsada, por ser a mais adequada para processos inflamatórios na fase aguda (ALFREDO et al., 2008; CAMARGO, 2006; PIEDADE et al., 2008).

A partir desses resultados, é possível sugerir que o gel de *C. paupera* a 10% gerou melhora no processo de recuperação do tecido lesionado em decorrência da redução do edema e do infiltrado inflamatório, e que o uso da técnica fonoforese com o intuito de auxiliar na penetração da substância não foi eficaz, produzindo uma resposta menos eficiente quando comparada com os grupos em que foram administrados os tratamentos US e gel de copaíba 10% isoladamente.

5.4 TESTE DE EDEMA DE PATA

Além da avaliação histológica, a literatura sugere que para uma análise mais completa da ação de uma substância sobre os tecidos em um processo inflamatório, é necessário também avaliações macroscópicas da evolução dos sinais flogísticos (BRITO et al., 2006). Dentre os testes para essa finalidade, foi utilizado o de edema de pata induzido.

Neste estudo, o modelo de edema de pata induzido por carragenina foi realizado utilizando-se duas formas de administração da oleorresina. O tratamento em um grupo se deu por via oral através de gavagem e no outro por via tópica utilizando a oleorresina *in natura* e na forma de gel a 10%, com o intuito de avaliar a ação das duas formas mais comuns de utilização do recurso natural na medicina popular (GARCIA; YAMAGUCHI, 2012; MACIEL; PINTO; VEIGA JUNIOR, 2002).

5.4.1 Tratamento por via oral

Após a realização do teste com tratamento realizado por via oral, obteve-se os resultados expressos na Figura 27 e 28.

Volume do edema após tratamento por via oral

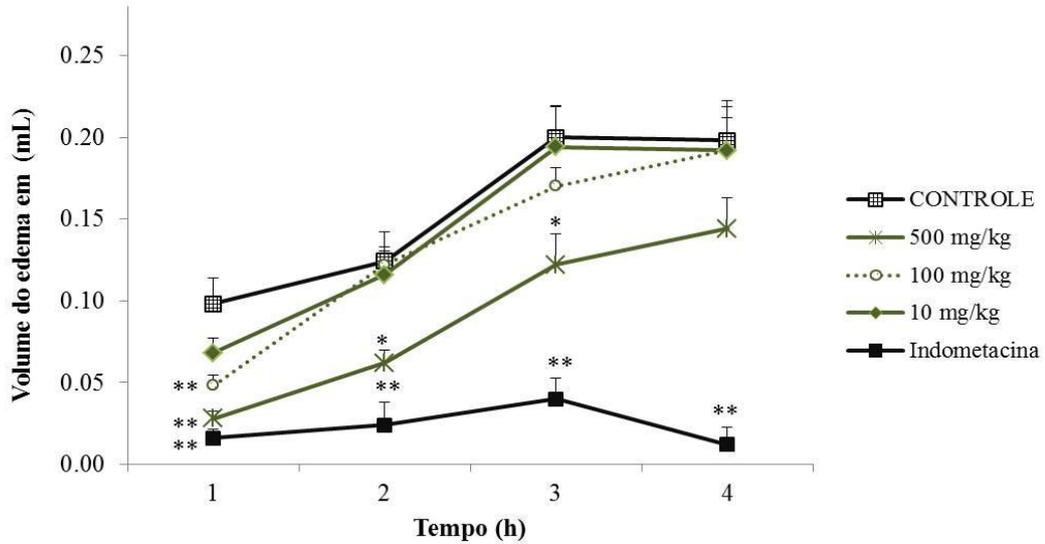


Figura 27 – Volume do edema em função do tempo. Os resultados estão expressos em médias \pm erro padrão, $n=5$ /grupo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, quando comparados com o grupo controle, ANOVA, seguido de teste Tukey.

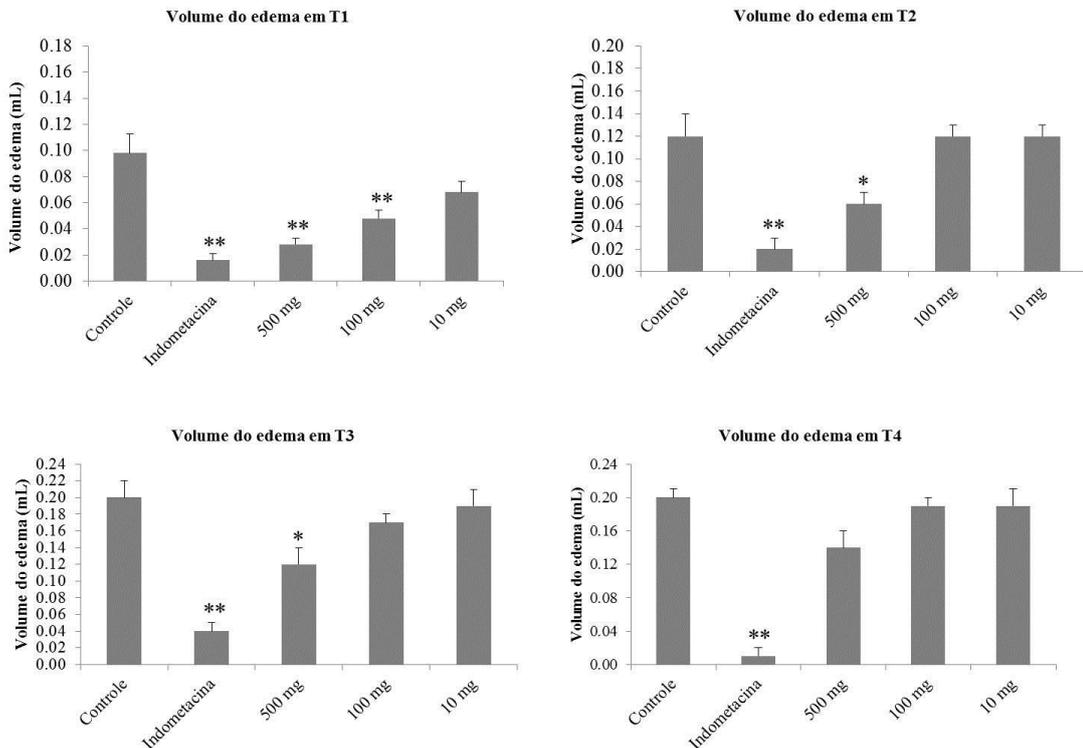


Figura 28 – Comparação do volume do edema (mL) durante as diferentes horas de avaliação (1ª, 2ª, 3ª e 4ª) após a aplicação dos diferentes tratamentos por via oral. Os resultados estão expressos em médias \pm erro padrão, $n=5$ /grupo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, quando comparados com o grupo controle, ANOVA, seguido de teste Tukey.

Em todos os grupos, percebeu-se que o pico de inflamação ocorreu na terceira hora, como esperado, pois é o período de maior atividade das prostaglandinas (MOURA, 2010).

O tratamento padrão (indometacina 10 mg/kg) classicamente usado para este tipo de teste, conseguiu inibir o edema em todas as horas avaliadas (1^a, 2^a, 3^a e 4^a): 80%, 80%, 80% e 95% respectivamente. Essa ação antiedematogênica corrobora os dados da literatura visto que esse fármaco possui como mecanismo de ação a inibição do processo inflamatório, atuando principalmente sobre a enzima ciclo-oxigenase e conseqüentemente a produção de prostaglandinas e tromboxanos (CAMARGO, 2006).

Em relação aos grupos tratados com o óleo de copaíba, constatou-se que na primeira hora após a aplicação da carragenina, a dose de 100 mg/kg e 500 mg/kg inibiram em 50% e 72% o edema, respectivamente, quando comparadas ao grupo controle. Na segunda e terceira hora, apenas a dose de 500 mg/kg conseguiu inibir significativamente o edema (50%).

A dose de 10 mg/kg não inibiu o edema em nenhuma das horas avaliadas, assim como nenhuma dose foi capaz de inibir o edema na quarta hora.

Veiga Junior et al. (2001) analisaram 8 amostras de óleos comerciais de copaíba por cromatografia gasosa e espectrometria de massas e detectaram adulteração da maioria dos óleos. Ao realizarem o teste de edema de pata pré-tratando os animais com os óleos comerciais, detectaram que apenas três conseguiram inibir o edema gerado pela carragenina. Os óleos que promoveram a inibição tinham como componentes majoritários: óleo 1 (β -bisaboleno e β -bergamoteno), óleo 2 (β -cariofileno e β -bergamoteno) e óleo 3 (β -cariofileno e β -bergamoteno). Ao serem utilizadas frações da oleorresina, o resultado foi menor que o do óleo bruto, sugerindo ação sinérgica entre os compostos.

Ao utilizarem a oleorresina da espécie *C. multijuga* de dois períodos sazonais distintos, na dose de 30 mg/kg por via intraperitoneal em ratos, Veiga Junior et al. (2006) constataram que houve redução significativa do edema de pata induzido por carragenina e bradicinina, e sugeriram que β -cariofileno foi o responsável por essa ação, visto que foi o composto majoritário tanto na oleorresina do período seco (29,6%), quanto do período chuvoso (58,4%).

Ramos (2006) realizou o teste de edema de pata em camundongos. Utilizou oleorresina de *Copaifera sp.* isolando sua fração volátil (75,01%), assim como encapsulando essa fração (10%) em goma árabe. Verificou após o tratamento por via oral de 100 mg/kg, que houve redução significativa do edema em ambos os grupos quando comparados ao controle, porém, que não houve diferença estatística entre as duas formas de tratamento. Assim como em estudos semelhantes, o componente majoritário da oleorresina utilizada no

estudo foi o β -cariofileno com 51,02% quando relativo a oleorresina e 70,01% quando relativo a fração volátil isolada.

Muniz et al. (2010) realizaram o teste de edema de pata em camundongos para verificar a ação anti-inflamatória da oleorresina de *C. reticulata* nas doses 10, 100 e 500 mg/kg. Na primeira hora houve inibição significativa do edema em todas as doses testadas, já na terceira hora apenas as doses de 100 e 500 mg/kg inibiram o edema quando comparadas ao grupo controle. Pela inibição do edema ter ocorrido de forma mais significativa na terceira hora, o autor sugeriu que o mecanismo de ação da oleorresina seja sobre a atividade das prostaglandinas. A espécie utilizada por este autor tem tradicionalmente como componente majoritário o composto β -cariofileno (40, 9%), tido como responsável pela ação antiedematogênica, em decorrência disso, pode-se justificar a ação mais eficiente desta oleorresina, compara com a *C. paupera*, mesmo em doses menores.

Gomes et al. (2010) ao realizarem o teste de edema de pata utilizando como agentes flogísticos: a carragenina, serotonina e histamina e tratando com frações de *C. multijuga*, sugeriram, após resultados positivos, que a ação do sinergismo entre os compostos pode gerar o bloqueio dos receptores destes mediadores (serotonina e histamina) imediatos do processo inflamatório.

Por estar presente como composto majoritário e em altas quantidades na oleorresina dos estudos mencionados, o β -cariofileno vem sendo indicado como o responsável pela ação antiedematogênica do gênero *Copaifera*. A partir disso, pode-se justificar a oleorresina utilizada nesse estudo não apresentar resultados tão satisfatórios com doses menores que 500 mg/kg. Isso pode ter ocorrido, pois o composto β -cariofileno nesta espécie não está presente em grandes quantidades, representando apenas 20,94% da oleorresina.

A inibição do edema que ocorreu na primeira hora com a dose 100 mg/kg e até a terceira hora com a dose 500 mg/kg pode ser justificada pelo mecanismo de ação do β -cariofileno estar relacionado a inibição de histamina e serotonina, como sugeriu Gomes et al. (2010), visto que estes são mediadores imediatos do processo inflamatório, sendo responsáveis pelo aumento do edema principalmente nas primeiras duas horas após a administração do agente flogístico.

5.4.1 Tratamento por via tópica

Neste estudo, através da administração por via tópica para se testar a ação anti-edematogênica da oleorresina de *C. paupera*, pode-se constatar que houve diferença estatística significativa apenas entre o grupo controle (gel carbopol neutro) e o grupo controle positivo (fármaco padrão) em todas as horas avaliadas.

O diclofenaco diatilamônico é um anti-inflamatório não esteroidal muito utilizado tanto para lesões agudas, quanto crônicas, atua reduzindo a ação da enzima ciclo-oxigenase e consequentemente inibindo a produção principalmente de prostaglandinas. Seu uso tópico gera uma menor quantidade de efeitos adversos quando comparado com a administração por via oral, porém, o aumento de sua ação está relacionado ao tempo que permanece em contato com a pele (CARVALHO et al., 2013; SILVA, 2014).

Não foi observada atividade anti-edematogênica em nenhuma das formas de tratamento por via tópica com a oleorresina de *C. paupera* (Figura 29 e 30). Isso pode ter ocorrido pela dificuldade de sua penetração na pele, visto que o estrato córneo trata-se de uma barreira importante que regula a passagem de agentes externos, em decorrência disso, a permeação tende a ser lenta, ocorrendo aproximadamente cerca de noventa e dois minutos após o contato com a pele (LUCCA, 2013; VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002).

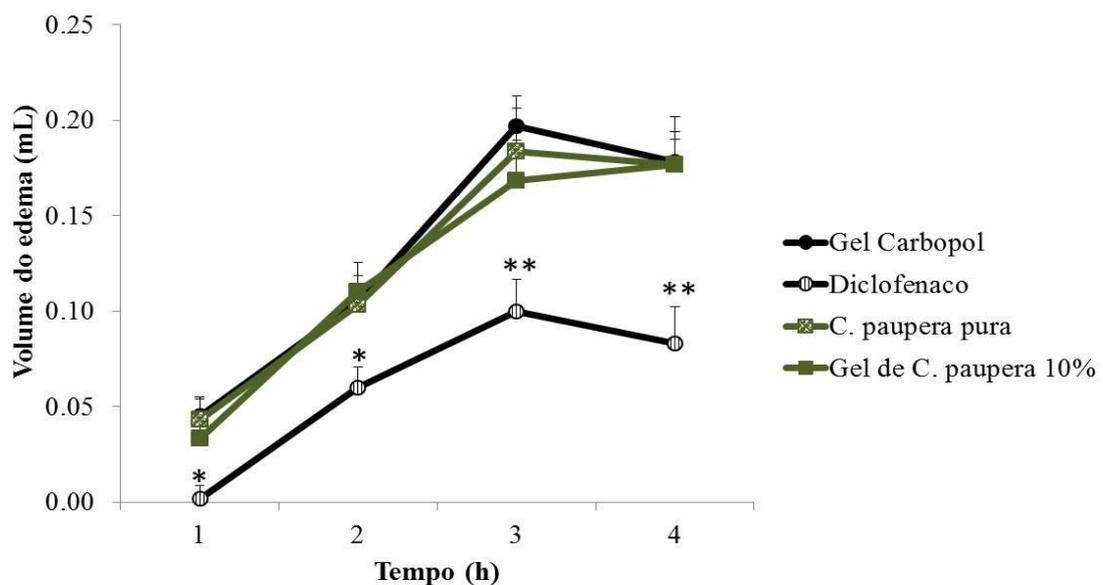


Figura 29 – Volume do edema (mL) em função do tempo (h). Os resultados estão expressos em médias \pm erro padrão, $n = 6$ /grupo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, quando comparados com o grupo controle, ANOVA, seguido de teste Tukey.

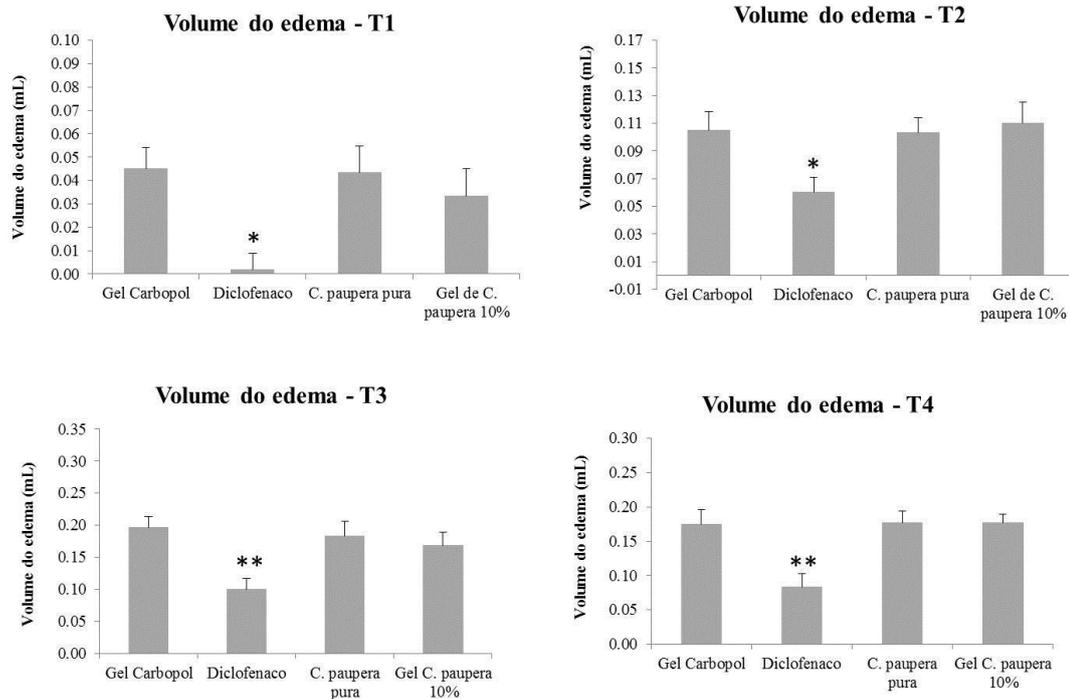


Figura 30 – Comparação do volume do edema (mL) durante as diferentes horas de avaliação (1^a, 2^a, 3^a e 4^a) após a aplicação dos diferentes tratamentos por via tópica. Os resultados estão expressos em médias \pm erro padrão, n= 6/grupo. *p < 0,05, **p < 0,01, quando comparados com o grupo controle, ANOVA, seguido de teste Tukey.

Carvalho et al. (2005) ao realizarem o teste de ação antiedematogênica com a oleorresina da espécie *C. duckei* por via tópica, constataram que das três doses testadas (517, 1035 e 1802 mg/kg) apenas a mais alta (1802 mg/kg) conseguiu inibir o edema (18%) quando comparado ao grupo controle.

Silva (2014) realizou o teste de edema de pata pré-tratando os animais por via tópica com a oleorresina *in natura* e na forma de microemulsão (6,10% e 10,6%). Como resultado, a microemulsão de 6,10% foi a que obteve resposta mais significativa, apresentando inibição do edema superior ao grupo controle positivo (diclofenaco dietilamônico). Os demais grupos apresentaram efeito apenas na terceira hora de avaliação. O autor sugere que o efeito da oleorresina está relacionado com a capacidade de penetração da substância na pele e não apenas com a dose administrada. Visto que a quantidade de β -cariofileno era muito maior na oleorresina *in natura* 114,33 mg/mL, do que nas microemulsões (12,9 e 8,38 mg/mL). Porém, ele justifica que a maior quantidade de tensoativos da microemulsão de 6,10% facilitou a permeação do β -cariofileno, enquanto as outras substâncias precisaram de mais tempo em contato para a penetração.

Lucca et al. (2015) testaram a capacidade de penetração/permeação do β – cariofileno através da utilização tópica da oleorresina de *C. multijuga* pura e através de nanoemulsão

(copaíba a 20%), ao final detectaram que a oleorresina pura não penetrou nos tecidos após única aplicação, ficando retida no estrato córneo, já a nanoemulsão conseguiu penetrar até tecidos mais profundos, atingindo a derme.

A partir disso, percebe-se que as características físicas da oleorresina são o principal fator na dificuldade de permeação, visto que substâncias altamente hidrofílicas ou hidrofóbicas tem maior dificuldade de penetração na pele, tendo assim, pouca ação quando aplicada diretamente na sua forma *in natura* (HAROUTIUNIAN; DRENNAN; LIPMAN, 2010; LUCCA, 2013; LUCCA et al., 2015).

6. CONCLUSÃO

A partir deste estudo, é possível concluir que a oleorresina de *Copaifera paupera* possui baixo índice de toxicidade e pode auxiliar na recuperação do tecido muscular lesionado quando administrada diariamente durante o período inflamatório, além disso, também possui ação antiedematogênia. Indicando assim, importante potencial anti-inflamatório.

REFERÊNCIAS

AGNE, J.E. **Eletrotermoterapia: teoria e prática**. Santa Maria, Pallotti, 2004.

ALCÂNTARA, L.I. **Avaliação dos níveis de gama-glutamil transpeptidase sérica em pacientes hepatopatas e sua utilização como marcador bioquímico para consumo de álcool**. Dissertação (Mestrado em Toxicologia). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Tibeirão Preto/USP. Ribeirão Preto, 2007.

ALFREDO, P. P. **Estudo experimental dos efeitos da sonoforese com *Arnica montana* sobre o processo de regeneração do músculo esquelético em ratos wistar**. Dissertação (Mestrado em Ciências). Faculdade de Medicina/USP, 2008.

ALFREDO, P. P. et al. **Análise qualitativa dos efeitos da sonoforese com *Arnica montana* sobre o processo inflamatório agudo do músculo esquelético de ratos**. Fisioterapia e Pesquisa, São Paulo, v.15, n.3, p. 273-9, jul./set. 2008.

ALFREDO, P. P. et al. **Effects of phonophoresis with *Arnica montana* onto acute inflammatory process in rat skeletal muscles: An experimental study**. Ultrasonics, v. 49, p. 466–471, 2009.

ALMEIDA, M. Z. **Plantas medicinais**. 3 ed., p. 221, Salvador: EDUFBA, 2011.

ANVISA. **O que devemos saber sobre medicamentos**. 2010.

ARTILHEIRO, P. P. et al. **Análise comparativa dos efeitos do ultrassom terapêutico e laser de baixa potência sobre a proliferação de células musculares durante a diferenciação celular**. Fisioterapia em Movimento, Curitiba, v. 25, n. 1, p. 21-29, 2012.

BASSOLI, D. A. **Avaliação dos efeitos do ultra-som pulsado de baixa intensidade na regeneração de músculos esqueléticos com vistas à aplicabilidade em clínica fisioterapêutica**. Dissertação (Mestre em Bioengenharia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. São Carlos, 2001.

BERTOLINE, G. R. F. et al. **Comparação do ultrassom pulsado e contínuo no reparo tendíneo de ratos**. Fisioter Pesq.; v. 19, n. 3, p. 242-247, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. – Brasília: Ministério da Saúde, 2009.

BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo, Patologia**. 8.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

BRITO, M. V. H. et al. **Efeito dos óleos de andiroba e copaíba na miosite induzida em ratos**. Revista Paraense de Medicina. v. 20, n. 2, 2006.

CABRAL, I. E. (rev. téc.). **Administração de medicamentos**. Rio de Janeiro: Reichmann & Afonso Editores, 2002.

CAMARGO, L. C. S. **Efeito anti-inflamatório do extrato de *Zingiber officinale* aplicado por fonoforese sobre o edema de pata de ratos.** Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade do Vale do Paraíba. São José dos Campos, 2006.

CARVALHO, J. C. T. **Topical antiinflammatory and analgesic activities of *Copaifera duckei* dwyer.** *Phytother. Res.* v. 19, p. 946 – 950, 2005.

CARVALHO, R. L. P. et al. **Effects of low-level laser therapy (lllt) and diclofenac (topical and intramuscular) as single and combined therapy in experimental model of controlled muscle strain in rats.** *Photochemistry and Photobiology*, v. 89, p. 508 – 512, 2013.

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

CERUTTI, D.G.U. **Estudo dos efeitos do ultra-som na veiculação de fitoterápicos através da análise da degradação da *Arnica montana*.** Dissertação (Mestrado em Ambiente e desenvolvimento) – UNIVATES. Lajeados, 2009.

CEUA UNINOVE. **Métodos anestésicos e eutanásia.** 2012. Disponível em: <http://www.uninove.br/PDFs/Publicacoes/MANUAL%20CEUA_ANESTESIA_EUTANASIA_%20UNINOVE%202012.pdf>. Acesso em: 14 jul. 2013.

COELHO, C. F. **Avaliação do efeito anti-inflamatório do óxido nítrico administrado por via inalatória no modelo experimental de edema de pata induzido por carragenina em camundongos.** Tese (Doutorado em Ciências Biomédicas). Universidade de São Paulo. 2009.

COSTA, J. P. et al. **Avaliação da toxicidade aguda e das alterações histopatológicas em camundongos tratados com fitol.** *Rev Ciênc Farm Básica Apl.*, v. 33, n. 3, p. 421-428, 2012.

DEUS, R. J. A.; ALVES, C. N.; ARRUDA, M. S. P. **Avaliação do efeito antifúngico do óleo resina e do óleo essencial de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne).** *Rev. Bras. Pl. Med.*, Botucatu, v.13, n.1, p.1-7, 2011.

ESTEVIÃO, L. R. M, et al. **Neoangiogênese de retalhos cutâneos em ratos tratados com óleo de copaíba.** *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v. 44, n. 4, p. 406-412, abr. 2009.

FARCIC, T. S. **Aplicação do ultrassom terapêutico no reparo tecidual do sistema musculoesquelético.** *Arquivos Brasileiros de Ciências da Saúde*, v.37, n. 3, p. 149-153, Set/Dez 2012.

FERNANDES, T. L., PEDRINELLI, A., HERNANDEZ, J. A. **Lesão muscular – fisiopatologia, diagnóstico, tratamento e apresentação clínica.** *Rev Bras Ortop.*, v. 46, n. 3, p. 247-55, 2011.

FERREIRA, A. D. et al. **Alterações hematológicas induzidas por medicamentos convencionais e alternativos.** *Rev. Bras. Farm.* v. 94, n. 2, p. 94-101, 2013.

FREITAS, et al. **Effect of therapeutic pulsed ultrasound on parameters of oxidative stress in skeletal muscle after injury.** *Cell Biology International*, v. 31, p. 482-488, 2007.

GARCIA, R. F.; YAMAGUCHI, M. H. **Óleo de copaíba e suas propriedades medicinais: revisão bibliográfica.** Revista Saúde e Pesquisa, v. 5, n. 1, p. 137-146, jan./abr. 2012.

GIESBRECHT, P. C. P. **Efeito da pomada de óleo de copaíba em queimadura cutânea em ratos.** Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Centro Universitário Vila Velha, 2011.

GOMES, et al. **Characterization of the antinociceptive and anti-inflammatory activities of fractions obtained from *Copaifera multijuga* Hayne.** Journal of Ethnopharmacology, v. 128 p. 177-183, 2010.

HAROUTIUNIAN, S.; DRENNAN, D. A.; LIPMAN, A. G. **Topical NSAID therapy for musculoskeletal pain.** Pain Medicine. v. 11, p. 535–549, 2010.

HOLTERMAN, C. E., RUDNICKI, M.A. **Molecular regulation of satellite cell function.** Seminars in Cell & Developmental Biology, v. 16, p. 575–584, 2005.

JUNIOR, F. A. A. et al. **Efeito do óleo de copaíba nas aminotransferases de ratos submetidos à isquemia e reperfusão hepática com e sem pré condicionamento isquêmico.** Acta Cirúrgica Brasileira. v. 20, n. 1, 2005.

KOEKE, P. U. et al. **Comparative study of the efficacy of the topical application of hydrocortisone, therapeutic ultrasound and phonophoresis on the tissue repair process in rat tendons.** Ultrasound in Medicine and Biology, v. 31, n. 3, p. 345–350, 2005.

KUMAR, V. et al. **Patologia Robbins e Cotran: bases patológicas das doenças.** Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

KVIST, L.P. et al. **Identification and evaluation of Peruvian plants used to treat malaria and leishmaniasis.** J. Ethnopharmacol, v. 106, p 390-402, 2006.

LAMEIRA, O.A; PINTO, J. E. B. P. **Plantas medicinais: do cultivo, manipulação e uso à recomendação popular.** Belém, Embrapa Amazônia Oriental, 2008.

LEANDRO, L. M. et al. **Chemistry and biological activities of terpenoids from copaiba (*Copaifera* spp.) oleoresins.** Molecules. v. 17, p. 3866-3889, 2012.

LENZ, Q.F. **Determinação da atividade anti-inflamatória e antioxidante de formulações semissólidas contendo nanocápsulas de nimesulida.** Dissertação (Mestrado em nanociências). Centro Universitário Franciscano, Santa Maria, RS, 2009.

LIMA, A. P. **Análise bioquímica e histológica da toxicidade do *Symphytum officinale* fitoterápico e homeopático em fígado e rins de ratos.** Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) – Universidade Estadual Paulista, 2009.

LIMA, C. S. et al. **Pré-clinical validation of a vaginal cream containing copaiba oil (reproductive toxicology study).** Phytomedicine. 18, 1013–1023, 2011.

LIMA, C. M. et al. **Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério da Universidade Tiradentes.** Scientia Plena v. 10, 2014.

LIMA, C. S. **Estudo da toxicidade não clínico em ratos submetidos ao tratamento com óleo-resina de *Copaifera duckei* dwyer (subcrônico e reprodutivo)**. Tese (Doutorado em Biodiversidade Tropical) – Universidade Federal do Amapá, 2014.

LUCCA, L. G. **Avaliação da permeação cutânea de nanoemulsão contendo óleo de copaíba incorporada a hidrogéis**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

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

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A.C.; VEIGA JUNIOR, V. F. **Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares**. Quim. Nova, Vol. 25, No. 3, 429-438, 2002.

MAIA-FILHO, A. L. M. et al. **Efeito do gel da babosa (*Aloe barbadensis* Mill.) associado ao ultrassom em processo inflamatório agudo**. Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu, v. 13, n. 2, p. 146 -150, 2011.

MARTINS, K. et al. **Interspecific differences in the oleoresin production of *Copaifera* L. (*Fabaceae*) in the Amazon rainforest**. Annals of forest Science. v. 70, n. 3, p. 319-328. 2012.

MARTINS-DA-SILVA, R. C. V., PEREIRA, J. F., LIMA, H. C. **O gênero. *Copaifera* (*Leguminosae-Caesalpinioideae*) na Amazônia Brasileira**. Rodriguésia, 59, p. 455-476, 2008.

MASSON, D. S. et al. **Atividade antimicrobiana do óleo-resina de copaíba (*Copaifera langsdorffii*) em bactérias de significância clínica em úlceras cutâneas**. Rev. Bras. Pl. Med., Campinas, v. 15, n. 4, p. 664-669, 2013.

MATHEUS, J. P. C. et al. **Efeitos do ultra-som terapêutico nas propriedades mecânicas do músculo esquelético após contusão**. Rev Bras Fisioter. v. 12, n. 3, p. 241-7, 2008.

MCBRIER, N. M. et al. **Reliability and Validity of a Novel Muscle Contusion Device**. Journal of Athletic Training. v. 44, n. 03. p. 275–278. 2009.

MEDEIROS, J. F. et al. **Ensaio toxicológicos clínicos da casca do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis*, f. *flavicarpa*), como alimento com propriedade de saúde**. Revista Brasileira de Farmacognosia. v. 19. Abr./Jun, 2009.

MELO, M. G. D. et al. **Valores de referência Hematológicos e Bioquímicos de Ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério central da Universidade Federal de Sergipe**. Scientia Plena. v. 8, n. 4, 2012.

MOURA, W. R. A. **Ensaio farmacológico das atividades antiinflamatória, citotoxicidade e toxicidade aguda da *Copaifera luetzelburgii*, harm e *sida santaremnensis*, monteiro**. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Piauí, 2010.

MUNIZ, J. W. C. **Estudo da ação anti-inflamatória do óleo-resina da *Copaifera reticulata* em modelos farmacológicos experimentais em camundongos.** Tese (Doutorado no em Neurociências e Biologia Celular) – UFPA. Belém, 2009.

MUNIZ, J. W. C. et al. **Atividade anti-inflamatória do óleo-resina da copaífera reticulata em modelo inflamatório de edema de pata.** Disponível em <<http://files.bvs.br/upload/S/0101-5907/2009/v23n1/a2037.pdf>> Acesso em: 25 jun. 2014.

NASCIMENTO, M. E. et al. **Chemical variability of the volatiles of *Copaifera langsdorffii* growing wild in the Southeastern part of Brazil.** Biochemical Systematics and Ecology. v. 43, p. 1-6, 2012.

NETO, A. T. C. et al. **Análise comparativa entre o óleo-resina de copaíba e o digluconato de clorexidina no processo de cicatrização tecidual. Estudo histológico em dorso de ratos.** Revista de Odontologia da UNESP. v. 34, n. 2, p. 107-112, 2005.

NOGUCHI, A. et al. **Níveis séricos de aminotransferases, bilirrubinas e gama-glutamil transpeptidase após a administração de óleo de copaíba em ratos.** Acta Cir. Bras. vol.17 no.2 São Paulo Mar./Apr. 2002.

NOGUEIRA, E. O. et al. **Avaliação do efeito do óleo-resina de copaíba (*Copaifera sp.*) na proliferação celular *in vitro*.** Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci., São Paulo, v. 49, n. 4, p. 293-300, 2012.

OECD (Organization for economic co-operation and development). **Guideline for testing of chemicals: 423 - acute oral toxicity-acute toxic class method,** 2001.

OECD (Organization for economic co-operation and development). **Guideline for testing of chemicals: 404 - acute dermal irritation/corrosion,** 2002.

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

PELIZZARI, C. et al. **Concentração plasmática de diclofenaco sódico em cães, submetidos à fonoforese.** Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v. 64, n. 6, p. 1449-1455, 2012.

PERTILLE, A., MACEDO, A. B., OLIVEIRA, C. P. V. **Avaliação da regeneração muscular em animais idosos após tratamento com laser de baixa intensidade.** Rev Bras Fisioter, São Carlos, v. 16, n. 6, p. 495-501, nov./dez. 2012.

PIEIDADE, M. C. B. et al. **Effect of ultrasound therapy on the repair of Gastrocnemius muscle injury in rats.** Ultrasonics. v. 48, p. 403–411, 2008.

PIERI, F. A., MUSSI, M. C., MOREIRA, M. A. S. **Óleo de copaíba (*Copaifera sp.*): histórico, extração, aplicações industriais e propriedades medicinais.** Rev. bras. plantas med., Botucatu, v. 11, n. 4, 2009.

PIOVESAN, R. F. **Efeito do anabolizante decanoato de nandrolona na expressão de marcadores miogênicos e no processo de reparo muscular após criolesão.** Dissertação (Mestrado em Ciências da Reabilitação) – Universidade Nove de Julho. 2010.

RAMOS, M. F. S. **Desenvolvimento de microcápsulas contendo a fração volátil de copaíba por spray-drying: estudo da estabilidade e avaliação farmacológica.** Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP, 2006.

REYNEL, C. et al. **Árboles útiles de la Amazonía Peruana un manual con apuntes de identificación, ecología y propagación de las especies.** Disponível em: <<http://www.greentrack-travel.com/uploads/9/2/9/7/9297216/arboles-peruana.pdf>>. Acesso em: 17 jun. 2013.

RIBEIRO, R. **Efeito do ultra-som terapêutico pulsado na proliferação e atividade gelatinolítica de células musculares.** Dissertação (Mestrado em ciências da reabilitação) - Universidade Nove de Julho. Programa de Pós-graduação em Ciências da Reabilitação. São Paulo, 2009.

RICOLDY, D. S. et al. **Efeito do ultrassom associado ao gel de calêndula sobre a atividade reparadora em lesões musculares experimentais.** Acta Scientiarum. Health Sciences Maringá, v. 32, n. 2, p. 135-140, 2010.

RIGAMONTE – AZEVEDO, O.C.; WADT, P.G.S.; WADT, L.H.O. **Potencial de produção de óleo-resina de copaíba (*Copaifera* spp) de populações naturais do sudoeste da Amazônia.** Sociedade de Investigações Florestais, Viçosa-MG, v. 30, n. 4, p. 583-591, 2006.

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

RIO, R.G.W. **Atividade anti-inflamatória, toxicidade e aspectos químicos do óleo-resina de copaíba, proveniente de diferentes espécies, e de suas respectivas frações.** Tese. Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP, 2001.

ROCHA, R.S.B.; CAVALLIERI, A.G. **Lesão, Plasticidade e Reabilitação do Sistema Muscular.** R. bras. Ci. e Mov. v.15, n. 2, p. 81-85, 2007.

SACHETTI, C.G. et al. **Avaliação da toxicidade aguda e potencial neurotóxico do óleo-resina de copaíba (*Copaifera reticulata* Ducke, Fabaceae).** Rev. Bras. Farmacogn. Braz. J. Pharmacogn. v. 19, n. 4. Out./Dez. 2009.

SACHETTI, C.G. et al. **Developmental toxicity of copaiba tree (*Copaifera reticulata* Ducke, Fabaceae) oleoresin in rat.** Food and Chemical Toxicology, 2011.

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

_____ **Effect of Brazilian copaiba oils on *Leishmania amazonensis***. Journal of Ethnopharmacology. v. 120, p. 204–208, 2008.

SILVA, D. T. C. **Avaliação da atividade anti-inflamatória e mutagênica de microemulsão tópica contendo óleo de copaíba**. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Farmácia) – Universidade Estadual da Paraíba. 2014.

SILVA, P. **Farmacologia**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

SILVEIRA, P. C. L. et al. **Effects of therapeutic pulsed ultrasound and dimethylsulfoxide (dms) phonophoresis on parameters of oxidative stress in traumatized muscle**. Ultrasound in Med. & Biol., v. 36, n. 1, p. 44–50, 2010.

SILVEIRA, P. F.; BANDEIRA, M. A. M.; ARRAIS, P. S. D. **Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade**. Rev. Bras. Farmacogn. Braz J. Pharmacogn. v. 18 n. 4: Out./Dez. 2008.

SOUZA, J. et al. **Effect of phonophoresis on skin permeation of commercial anti-inflammatory gels: sodium diclofenac and ketoprofen**. Ultrasound in Medicine and Biology. 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301562913000823>>, acesso em: 10 jul. 2013.

SOUZA, J.; GOTTFRIED, C. **Muscle injury: Review of experimental models**. v. 23, p. 1253–1260, 2013.

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

TASLEEM, F. et al. **Analgesic and anti-inflammatory activities of *Piper nigrum* L**. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine. v. 7, p. 461–S468, 2014.

TINCUSI, B. M. et al. **Antimicrobial terpenoids from the oleoresin of the peruvian medicinal plant *Copaifera paupera***. Planta Med, n. 68, p. 808–812, 2002.

VALADARES, M. C. **Avaliação de toxicidade aguda: estratégias após a “Era do teste DL50”**. Revista Eletrônica de Farmácia. v 3, n. 2, p. 93–98, 2006.

VEIGA JUNIOR, V. F. et al. **Phytochemical and antioedematogenic studies of commercial copaiba oils available in Brazil**. Phytother. Res. v. 15, p. 476–480, 2001.

VEIGA JUNIOR, V. F. et al. **The inhibition of paw edema formation caused by the oil of *Copaifera multijuga* Hayne and its fractions**. Journal of pharmacy and pharmacology. v. 58, p. 1405–1410, 2006.

VEIGA JUNIOR, V. F. et al. **Constituintes das sementes de *Copaifera officinalis*L**. Acta Amaz. Manaus, v. 37, n. 1, 2007.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C. **O GÊNERO** *Copaifera* L. Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro – RJ. *Quim. Nova*, v. 25, n. 2, p. 273-286, 2002.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C. **Plantas Mediciniais: cura segura?** *Quim. Nova*, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M.. **Plantas medicinais: cura segura?**. *Quím. Nova*, São Paulo, v. 28, n. 3, Junho 2005.

VIEIRA, R. C. et al. **Influência do óleo de *Copaifera langsdorffii* no reparo de ferida cirúrgica em presença de corpo estranho.** *Pesq. Vet. Bras.* v. 28, n. 8, p. 358-366, 2008.

VIRIATO, E. P. et al. **Study of high dilutions of copaiba oil on inflammatory process.** *Int J High Dilution Res.* v. 8, n. 26, p. 9-14, 2008.

WANG, Y. et al. **Antinociceptive and anti-inflammatory activities of extract and two isolated flavonoids of *Carthamus tinctorius* L.** *Journal of Ethnopharmacology.* v. 151, p. 944–950, 2014.

WINTER, C. A.; RISLEY, E. A.; NUSS, G. W. **Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs.** Disponível em: <http://ebm.sagepub.com/content/111/3/544>. Visualizado em 06 mai. 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Regulatory situation of herbal medicines.** A worldwide review, Geneva, 1998.

XU, Q. et al. **Anti-inflammatory and analgesic activity of aqueous extract of *Flos populi*.** *Journal of Ethnopharmacology.* v. 152, p. 540–545, 2014.

YANG, J. H. et al. **Anti-inflammatory effects by transdermal application of triamcinolone acetonide gel using phonophoresis in rats.** *International Journal of Pharmaceutics.* n. 302, p. 39–46, 2005.

ZOGHBI, M. G. B.; MARTINS-DA-SILVA, R. C. V.; TRIGO, J. T. **Volatiles of Oleoresins of *Copaifera paupera* (Herzog) Dwyer, *C. piresii* Dwyer and *C. pubiflora* Benth. (Leguminosae).** *Journal of Essential Oil Research.* v. 21, 2009.

ANEXOS

ANEXO I – Certificado de aprovação no CEUA – UFOPA



UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ - UFOPA
 PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO TECNOLÓGICA
 COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA/UFOPA

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “**Avaliação Anti-inflamatória e de Células Satélites em ratos: Estudo do Óleorresina de *Copaifera paupera* (Herzog) Dwyer Associado ao Ultrassom Terapêutico**”, protocolado sob o numero Nº 01001/2014, utilizando 90 (noventa) Ratos heterogênicos, sob a responsabilidade da professora Dra. **Elaine Cristina Pacheco de Oliveira**, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da comissão de ética no uso de animais da Universidade Federal do Oeste do Pará.

Santarém, 07 de março de 2014.



Antonio Humberto Mitterbach
PRESIDENTE CEUA - UFOPA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ - UFOPA

Antonio Humberto Mitterbach
 Presidente da Comissão de Ética
 no Uso de Animais - CEUA/UFOPA
 Port. nº 15, de 11/01/2013

ANEXO II - Protocolo de classificação OECD 423 para toxicidade aguda com dose inicial de 2000 mg/kg

ANNEX 2d: TEST PROCEDURE WITH A STARTING DOSE OF 2000 MG/KG BODY WEIGHT

